SEM@FORO NUM. 68 | DICIEMBRE 2019

Efectores de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella enterica*

Joaquín Bernal Bayard y Francisco Ramos Morales

jbbayard@us.es
framos@us.es

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
Avda Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla.

De izquierda a derecha: Sara Martos Martínez de Morentin, Joaquín Bernal Bayard, Juan Luis Araujo Garrido, Manuel Benito López González, Francisco Ramos Morales, Julia Aguilera Herce, Andrea Rodríguez Hirtle

Muchas bacterias patógenas Gram negativas poseen sistemas de secreción tipo III (T3SS) relacionados con la virulencia. Se trata de aparatos relacionados evolutivamente con el flagelo semejantes a jeringuillas de tamaño minúsculo capaces de inyectar proteínas de las bacterias en las células del organismo eucariótico al que infectan. Estas proteínas, denominadas efectores, suelen interferir con vías de transducción de señales de la célula hospedadora para posibilitar la entrada o la supervivencia del patógeno. En muchos casos se desconoce la función concreta que realiza cada efector. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es una bacteria capaz de infectar numerosas especies animales. Mientras que en ratones produce una enfermedad sistémica potencialmente mortal semejante a la fiebre tifoidea, en humanos da lugar a gastroenteritis. Su virulencia depende en gran medida de dos T3SS (T3SS1 y T3SS2) que están codificados en dos islas de patogenicidad denominadas SPI1 y SPI2, respectivamente. Entre los dos secretan más de 40 efectores (Ramos-Morales, 2012). *Salmonella* es un patógeno intracelular que utiliza diversas vías para entrar en las células hospedadoras. Los efectores del T3SS1 son fundamentales para la invasión de células no fagocíticas como las epiteliales del intestino. Una vez dentro de la célula eucariótica, *Salmonella* se instala en una vacuola. El establecimiento de este nicho de supervivencia y replicación depende de efectores del T3SS2, aunque también participan efectores del sistema codificado en la SPI1.

Nuestro grupo se inició en el año 2004 con el objetivo de estudiar efectores de los T3SS de *Salmonella* para tratar de entender la contribución específica de algunos de ellos a la virulencia de esta bacteria. Hemos trabajado principalmente con cuatro efectores: SlrP, SteA, SrfJ y SseK1.

SlrP posee un dominio con varios motivos de repeticiones ricas en leucina (LRR) que suelen estar implicados en interacciones pro-

teína-proteína. En la región carboxilo terminal tiene otro dominio denominado NEL que está presente en otros efectores que forman parte de una nueva familia de proteínas con actividad ligasa de ubicuitina. Nuestro grupo demostró que SlrP posee esta actividad y que es capaz de interaccionar con la tiorredoxina humana (Trx), ubicuitilarla y provocar una caída de su actividad (Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2009). La estructura tridimensional del complejo formado por SlrP y Trx la resolvimos en colaboración con el grupo de la doctora S. Nessler (Orsay, Francia). Las dos proteínas forman un heterotetrámero en el que las dos moléculas de SlrP interaccionan con las dos de Trx, con una por medio del dominio LRR antes mencionado, con la otra a través de una región conectora existente entre el dominio LRR y el dominio NEL (Zouhir *et al.,* 2014). SlrP interacciona también con la proteína ERdj3, una chaperona del retículo endoplásmico que se une a proteínas mal plegadas y contribuye a su correcto plegamiento (Bernal-Bayard *et al.,* 2010). El efecto de ambas interacciones podría explicar el aumento en la tasa de muerte celular que hemos observado en los cultivos de células HeLa que expresan SlrP. Por otro lado, estudiamos también las condiciones de expresión y secreción de SlrP (Cordero-Alba & Ramos-Morales, 2014).

En el caso de SteA analizamos las condiciones que afectan a la síntesis de este efector, su secreción al medio de cultivo y su translocación a las células hospedadoras. El estado redox celular contribuye a la regulación transcripcional de *steA* a través de una vía reguladora que incluye al oxidante periplásmico DsbA, el péptido de membrana interna MgrB y el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP (Cardenal-Muñoz & Ramos-Morales, 2013). Además se llevó a cabo un análisis transcriptómico en células HeLa transfectadas establemente con el gen del efector SteA. La expresión de SteA en estas células epiteliales, a través de la modificación de diferentes vías de transducción de señales, dio lugar a una alteración de la morfología celular y una disminución de la tasa de muerte celular espontánea, las uniones intercelulares y la velocidad de migración celular (Cardenal-Muñoz *et al.,* 2014).

SrfJ, una proteína de *Salmonella* que presenta similitud con la glucosilceramidasa humana, es un efector del T3SS2. El gen *srfJ* está regulado positivamente por PhoP a través del sistema de dos componentes SsrA/SsrB y negativamente por IolR, el represor de los genes implicados en la utilización de mioinositol como fuente de carbono (Cordero-Alba *et al.,* 2012). Esto nos llevó a analizar posibles hospedadores donde la respuesta al mioinositol pudiera ser relevante. Encontramos que *srfJ* se expresa a partir de dos promotores, uno que responde a las señales intravacuolares y es activo cuando *Salmonella* infecta células de mamífero, y otro que responde a mioinositol y que se expresa cuando *Salmonella* coloniza plantas (Aguilera-Herce *et al.,* 2017). Nos interesa ahora incidir en la posible actividad glucosilceramidasa de este efector.

SseK1 forma parte de una familia de efectores que catalizan la transferencia de N-acetilglucosamina a residuos de arginina de ciertas proteínas hospedadoras. Nuestro grupo ha demostrado que SseK1 tiene un papel en la virulencia de *Salmonella* y puede translocarse a las células hospedadoras tanto a través del T3SS1 como a través del T3SS2, aunque con diferentes patrones y cinéticas dependiendo del tipo celular específico. Además, el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP regula directamente y de manera positiva la expresión del gen *sseK1* (Baisón-Olmo *et al.,* 2015).

Recientemente, hemos desarrollado un aspecto aplicado del estudio de los T3SS consistente en el diseño de una vacuna viva contra *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello empleamos una estirpe atenuada de *S. enterica* serovar Typhimurium en la que hemos expresado el antígeno PcrV de *P. aeruginosa* en fusión con el efector SseJ de *Salmonella*. Los ratones inmunizados con esta vacuna que después fueron infectados con *P. aeruginosa* presentaron una reducción en la carga bacteriana en bazo y pulmones y en los niveles de citoquinas proinflamatorias en suero y además mejoraron significativamente su supervivencia (Aguilera-Herce *et al.,* 2019).

Actualmente nos estamos centrando en la identificación y análisis de posibles nuevos sustratos de las actividades enzimáticas de los efectores SlrP, SseK1 y SrfJ y en la implementación del pez cebra como modelo de hospedador para estos estudios.

REFERENCIAS

Aguilera-Herce, J., Zarkani, A. A., Schikora, A. & Ramos-Morales, F. (2017). Dual Expression of the *Salmonella* Effector SrfJ in Mammalian Cells and Plants. *Front Microbiol* **8**, 2410. Frontiers.

Aguilera-Herce, J., García-Quintanilla, M., Romero-Flores, R., McConnell, M. J. & Ramos-Morales, F. (2019). A Live *Salmonella* Vaccine Delivering PcrV through the Type III Secretion System Protects against *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere* **4**, e00116-19 (M. F. Pasetti, Ed.). American Society for Microbiology Journals.

Baisón-Olmo, F., Galindo-Moreno, M. & Ramos-Morales, F. (2015). Host cell type-dependent translocation and PhoP-mediated positive regulation of the effector SseK1 of *Salmonella enterica*. *Front Microbiol* **6**, 396.

Bernal-Bayard, J. & Ramos-Morales, F. (2009). Salmonella type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**, 27587–95.

Bernal-Bayard, J., Cardenal-Muñoz, E. & Ramos-Morales, F. (2010). The *Salmonella* type III secretion effector, *Salmonella* leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* **285**, 16360–8.

Cardenal-Muñoz, E. & Ramos-Morales, F. (2013). DsbA and MgrB regulate steA expression through the two-component system PhoQ/PhoP in Salmonella enterica. *J Bacteriol* **195**, 2368–78.

Cardenal-Muñoz, E., Gutiérrez, G. & Ramos-Morales, F. (2014). Global impact of Salmonella type III secretion effector SteA on host cells. *Biochem Biophys Res Commun* **449**, 419–424.

Cordero-Alba, M. & Ramos-Morales, F. (2014). Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **196**, 3912–22.

Cordero-Alba, M., Bernal-Bayard, J. & Ramos-Morales, F. (2012). SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IolR. *J Bacteriol* **194**, 4226–36.

Ramos-Morales, F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biol* **2012**, 1–36.

Zouhir, S., Bernal-Bayard, J., Cordero-Alba, M., Cardenal-Muñoz, E., Guimaraes, B., Lazar, N., Ramos-Morales, F. & Nessler, S. (2014). The structure of the Slrp-Trx1 complex sheds light on the autoinhibition mechanism of the type III secretion system effectors of the NEL family. *Biochem J* **464**, 135–44.