

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

Francisco Ramos Morales, Joaquín Bernal Bayard, Elena Cardenal Muñoz, Mar Cordero Alba, Fernando Baisón Olmo, Julia Aguilera Herce

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

[framos@us.es](mailto:framos@us.es)



**Foto de grupo.** Integrantes pasados y actuales del grupo. De arriba abajo y de izquierda a derecha: Francisco Ramos Morales, Joaquín Bernal Bayard (actualmente en el Instituto Pasteur de París como postdoc), Elena Cardenal Muñoz (actualmente en la Universidad de Ginebra como postdoc), Mar Cordero Alba (pendiente de la lectura de su tesis), Fernando Baisón Olmo (tesis en curso) y Julia Aguilera Herce (recién incorporada).

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 y 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 30 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 y su objetivo ha sido, desde el principio, el estudio de efectores de los T3SS de *Salmonella* para tratar de entender la contribución específica de algunos de ellos a la virulencia de esta bacteria. El primer efector que estudiamos fue SlrP. Esta proteína posee un dominio con varios motivos de repeticiones ricas en leucina que suelen estar implicados en interacciones proteína-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 ubiquitina. Nuestra primera contribución fue la demostración de que SlrP posee esta actividad y de que es capaz de interactuar y ubiquitinar a la tioredoxina huma-

na (Trx) (Bernal-Bayard y Ramos-Morales, 2009). Aunque la ubiquitinación se asocia a veces con la degradación de la proteína ubiquitinada a través del proteasoma, ésta no parece ser la consecuencia en este caso puesto que no se observó un descenso en la cantidad de Trx en células humanas HeLa transfectadas con SlrP. En cambio, sí se detectó una caída en el nivel de su actividad. Mediante un escrutinio por el sistema de doble híbrido en levaduras fue posible detectar una segunda diana de SlrP en células humanas. Se trata de la proteína ERdj3, una chaperona del retículo endoplásmico que se une a proteínas mal plegadas y contribuye a su correcto plegamiento. La interacción con SlrP compite con la de los sustratos desnaturalizados y así interfiere con la función de esta chaperona de una manera independiente de ubiquitinación (Bernal-Bayard *et al.*, 2010). Ambos efectos, la bajada de actividad redox y la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo, podrían explicar el aumento en la tasa de muerte celular que hemos observado en los cultivos de células HeLa que expresan SlrP.

Recientemente hemos resuelto, en colaboración con el grupo de la doctora S. Nessler (Orsay, Francia), la estructura tridimensional del complejo formado por SlrP y Trx (Zouhir *et al.*, 2014). Las dos proteínas forman un heterotetrámero en el que las dos moléculas de SlrP interactúan 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. Curiosamente, la estructura predijo que es el segundo tipo de interacción el más importante para mantener la estabilidad del complejo. Esto se confirmó mediante el uso de mutantes puntuales alterados en los residuos relevantes para la interacción. Además, el modelo permitió acotar las dianas más probables de ubiquitinación en la Trx. Experimentalmente probamos que una de ellas, la lisina en posición 94, es efectivamente ubiquitinada en presencia de SlrP. Se estudió también la expresión y la secreción de SlrP (Cordero-Alba y Ramos-Morales, 2014). Aunque *slrP* se expresó en diferentes medios, la máxima expresión se obtuvo en condiciones que imitan el ambiente intravacuolar. La translocación tuvo lugar por medio de los dos T3SS dependiendo del tipo celular hospedador y el tiempo de infección. La búsqueda de reguladores de *slrP* reveló que este gen está regulado por LeuO, Lon y el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP. Por último, en un análisis transcriptómico y proteómico de células HeLa transfectadas establemente con el gen del efector SlrP se encontró expresión diferencial de un total de 83 genes del hospedador. Este hallazgo servirá de punto de partida para posteriores investigaciones.

El segundo efector que hemos estudiado es SteA. Tiene en común con SlrP el ser uno de los pocos efectores que son sustratos de los dos T3SS de *Salmonella*. Se analizaron las condiciones que afectan a la síntesis de este efector, su secreción al medio de cultivo y su translocación a las células hospedadoras (Cardenal-Muñoz y Ramos-Morales, 2011). 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 y Ramos-Morales, 2013). Por último 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).

Otro aspecto que hemos abordado en nuestros estudios ha sido el intento de identificación de nuevos efectores. Esto nos ha llevado a dos resultados interesantes. Por un lado, al reconocimiento de que PipB2, una proteína conocida como efector del T3SS2, puede ser también secretado por el T3SS1 (Baisón-Olmo *et al.*, 2012). Por otro lado, a la demostración de que SrfJ, una proteína de *Salmonella* que presenta similitud con la glucosilceramidasa humana, es un efector del T3SS2 (Cordero-Alba *et al.*, 2012). El gen *srfJ* está regulado positivamente por PhoP a través del sistema de dos componentes SsrA/SsrB y negativamente por IoIR, el represor de los genes implicados en la utilización de mioinositol como fuente de carbono.

Actualmente nos planteamos seguir profundizando en el estudio de estos y otros efectores y comenzar a usar los conocimientos adquiridos en un aspecto aplicado como es la generación de vacunas vivas basadas en la secreción del antígeno de interés a través de los T3SS de *Salmonella*.

## REFERENCIAS

- Baisón-Olmo F, Cardenal-Muñoz E y Ramos-Morales F. (2012). PipB2 is a substrate of the *Salmonella* pathogenicity island 1-encoded type III secretion system. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 240-246.
- Bernal-Bayard J y Ramos-Morales F. (2009). *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* 284: 27587-27595.
- Bernal-Bayard J, Cardenal-Muñoz E y 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: 16360-16368.
- Cardenal-Muñoz E y Ramos-Morales F. (2011). Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector SteA. *PLoS One* 6: e26930.
- Cardenal-Muñoz E y Ramos-Morales F. (2013). DsbA and MgrB regulate *steA* expression through the two-component system PhoQ/PhoP in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 195: 2368-2378.
- Cardenal-Muñoz E, Gutiérrez G y 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, Bernal-Bayard J y Ramos-Morales F. (2012). SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IoIR. *J Bacteriol* 194: 4226-4236.
- Cordero-Alba M y Ramos-Morales F. (2014). Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 196:3912-3922.
- Ramos-Morales F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. ISRN Cell Biology Article ID 787934.
- Zouhir S, Bernal-Bayard J, Cordero-Alba M, Cardenal-Munoz E, Guimaraes B, Lazar N, Ramos-Morales F y Nessler S. (2014). The Structure of the SlrP-hTrx1 Complex Sheds Light on the Autoinhibition Mechanism of the Type III Secretion System Effectors of the NEL Family. *Biochem J* 464:135-144.