

Macrogrupo de Genética Bacteriana

JOAQUÍN BERNAL BAYARD, ROBERTO BALBONTÍN Y FRANCISCO RAMOS MORALES

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

✉ jbbayard@us.es | rbbalbontin@us.es | framos@us.es

El macrogrupo de Genética Bacteriana engloba tres grupos de investigación, liderados por los investigadores principales Joaquín Bernal Bayard, Roberto Balbontín y Francisco Ramos Morales, e incluye a los investigadores postdoctorales Javier Ramos Guelfo, Isela Serrano Fujarte, Cristina Velázquez Suárez, Andrea Simone Bullones Bolaños y Francine Amaral Piubeli y al investigador predoctoral Diego Antonio Pedraza Delgado.

➤ Grupo de sistemas de secreción tipo III en *Salmonella* (Francisco Ramos Morales y Andrea Simone Bullones Bolaños)

Muchas bacterias patógenas Gram negativas poseen sistemas de secreción tipo III (T3SS) relacionados con la virulencia que funcionan como minúsculas jeringuillas capaces de inyectar proteínas efectoras en células eucariotas. Los efectores interfieren con vías de transducción de señales del hospedador para facilitar la entrada o supervivencia del patógeno. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es un patógeno intracelular que utiliza diversas vías para infectar numerosas especies animales. Mientras produce enfermedad sistémica potencialmente mortal en ratones, causa gastroenteritis en humanos. Su virulencia depende principalmente de dos T3SS codificados en las islas de patogenicidad SPI1 y SPI2, que secretan más de 40 efectores (Ramos-Morales, 2012).

Iniciado en 2004, nuestro grupo estudia efectores de los T3SS de *S. enterica* para entender su contribución específica a la virulencia. Actualmente nos centramos en tres efectores de la familia NEL de ligasas de ubiquitina: SlrP, SspH1 y SspH2. Estos efectores poseen un dominio con motivos de repeticiones ricas en



Macrogrupo de genética bacteriana. De izquierda a derecha: Isela Serrano, Joaquín Bernal, Francisco Ramos, Javier Ramos, Roberto Balbontín, Francine Piubeli, Andrea Bullones, Cristina Velázquez y Diego Pedraza.

leucina (LRR) implicados en interacciones proteína-proteína y un dominio NEL carboxilo terminal con actividad ligasa de ubiquitina. Nuestro grupo demostró que SlrP posee esta actividad y que es capaz de interactuar con la tiorredoxina humana (Trx), ubicuítarla y provocar una caída de su actividad (Bernal-Bayard and 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) (Zouhir *et al.*, 2014). SlrP interactúa también con la proteína SNRPD2, un componente del complejo de corte y empalme de intrones en el ARNm eucariótico. Por otro lado, estudiamos también las condiciones de expresión y secreción de SlrP y realizamos un estudio comparativo de los tres efectores NEL analizando sus patrones de expresión, regulación, translocación, función en invasión y proliferación intracelular, y

capacidad para interactuar y ubicuítar proteínas específicas del hospedador (Bullones-Bolaños *et al.*, 2024).

Actualmente estamos aplicando técnicas novedosas para la identificación de nuevos sustratos para los tres efectores de la familia y tratando de implementar el pez cebra como modelo de hospedador para algunos de estos estudios.

➤ Grupo de secreción tipo VI en *Salmonella* (Joaquín Bernal Bayard, Isela Serrano Fujarte y Cristina Velázquez Suárez)

S. enterica codifica también un T6SS, una compleja máquina molecular que inyecta efectores en hospedadores eucarióticos u otras bacterias competidoras. El agrupamiento génico del T6SS, localizado en

la SPI6, incluye genes que codifican componentes necesarios para ensamblar una maquinaria funcional y proteínas reguladoras cuya función está por determinar.

Nuestro trabajo aborda varios vacíos críticos en el conocimiento actual del T6SS. Investigamos su función biológica dual: por un lado, su papel en la competencia bacteriana (Sana *et al.*, 2016) y, por otro lado, su participación en el proceso de infección (Mulder *et al.*, 2012). Un aspecto central de nuestra investigación es entender las condiciones que desencadenan la expresión del sistema, así como los mecanismos de regulación que operan a varios niveles. Esto nos permite comprender cuándo y cómo *Salmonella* decide activar esta nanomáquina.

Utilizamos enfoques multidisciplinarios que combinan técnicas de biología molecular, bioquímica y microscopía para caracterizar elementos accesorios del sistema previamente no identificados investigando su papel en la regulación postraduccional del T6SS. Paralelamente, aplicamos aproximaciones de biología sintética para generar cepas con sistemas inducibles. Estas herramientas nos permiten activar el T6SS de manera controlada, proporcionando un sistema experimental para realizar estudios funcionales. Este enfoque integral nos permite no solo avanzar en el conocimiento fundamental del T6SS, sino también identificar potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.

➤ Grupo de Genética y Evolución Bacterianas (Roberto Balbontín, Javier Ramos Guelfo y Diego Antonio Pedraza Delgado)

En el Laboratorio de Genética y Evolución Bacterianas estudiamos la fisiología, interacciones, evolución y virulencia bacterianas aplicando diversos enfoques, principalmente Genética Directa, Inversa y Molecular. Nuestra investigación se centra en los efectos fenotípicos y genotípicos del desequilibrio en la homeostasis

de híbridos ARN-ADN formados durante la transcripción, conocidos como *R-loops*, en *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*. También nos interesan las interacciones intraespecíficas mediadas por cooperación, y las dinámicas de abuso de la misma (Özkaya *et al.*, 2017, 2018).

Hemos observado que la depleción genética o química de la principal ribonucleasa encargada de eliminar los *R-loops*, llamada RNasa HI, dispara el coste en eficacia biológica causado a *E. coli* por mutaciones de resistencia a rifampicina y/o estreptomycin, ocasionando su extinción en competiciones *ex vivo* y en el intestino de ratón, incluso a alta frecuencia inicial de mutantes resistentes (Balbontín *et al.*, 2021). Esto abre la puerta a la utilización de la RNasa HI como diana en estrategias antirresistencia. Además, hemos descubierto que la motilidad, la formación de biopelículas, la expresión de genes asociados a la patogénesis, y la virulencia de *S. enterica* se ven severamente limitadas en ausencia de la RNasa HI (Jiménez-Espadafor *et al.*, 2025), lo que genera la posibilidad de utilizar esta proteína como diana en estrategias antivirulencia.

Referencias

- Balbontín, R., Frazão, N., and Gordo, I. (2021). DNA Breaks-Mediated Fitness Cost Reveals RNase HI as a New Target for Selectively Eliminating Antibiotic-Resistant Bacteria. *Mol Biol Evol* 38, 3220–3234. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab093>
- Bernal-Bayard, J., and Ramos-Morales, F. (2009). *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* 284, 27587–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.010363>
- Bullones-Bolaños, A., Martín-Muñoz, P., Vallejo-Grijalba, C., Bernal-Bayard, J., and Ramos-Morales, F. (2024). Specificities and redundancies in the NEL family of bacterial E3 ubiquitin ligases of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Front Immunol* 15, 1328707. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1328707>
- Jiménez-Espadafor, J., Ortiz-Padilla, M., Pedraza-Delgado, D. A., Bernal-Bayard, J., Ramos-Morales, F., and Balbontín, R. (2025). Lack of RNase HI affects virulence in *Salmonella enterica*. 2025.01.19.633779. <https://doi.org/10.1101/2025.01.19.633779>
- Mulder, D. T., Cooper, C. A., and Coombes, B. K. (2012). Type VI secretion system-associated gene clusters contribute to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 80, 1996–2007. <https://doi.org/10.1128/IAI.06205-11>
- Özkaya, Ö., Balbontín, R., Gordo, I., and Xavier, K. B. (2018). Cheating on Cheaters Stabilizes Cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Biol* 28, 2070–2080.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.093>
- Özkaya, Ö., Xavier, K. B., Dionisio, F., and Balbontín, R. (2017). Maintenance of Microbial Cooperation Mediated by Public Goods in Single- and Multiple-Trait Scenarios. *J Bacteriol* 199, e00297–17, JB.00297–17. <https://doi.org/10.1128/JB.00297-17>
- Ramos-Morales, F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biol* 2012, 1–36. <https://doi.org/10.5402/2012/787934>
- Sana, T. G., Flaughnatti, N., Lugo, K. A., Lam, L. H., Jacobson, A., Baylot, V., et al. (2016). *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E5044–5051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608858113>
- Zouhir, S., Bernal-Bayard, J., Cordero-Alba, M., Cardenal-Muñoz, E., Guimaraes, B., Lazar, N., et al. (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. <https://doi.org/10.1042/BJ20140587>

.....