

## Sistemas de Secreción Tipo IV bacterianos Biología y aplicaciones

Dolores Lucía Guzmán-Herrador, Sara Samperio, Carlos Andrés Parra, Matxalen Llosa



Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Universidad de Cantabria, Santander.  
Web: <https://web.unican.es/ibbttec/Paginas/Groups/T4SS.aspx>



Foto de grupo: de izquierda a derecha, Pablo Guridi, Sara Samperio, Matxalen Llosa, y Dolores Guzmán.

El equipo dirigido por la Dra. Matxalen Llosa, Catedrática de Genética de la Universidad de Cantabria, es uno de los 10 grupos que fundaron en 2007 el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), un Centro Mixto entre la Universidad de Cantabria, el CSIC, y el Gobierno Regional.

Nuestros intereses científicos se centran en la comunicación bacteriana mediada por los Sistemas de Secreción Tipo IV (T4SS). Estos complejos macromoleculares, al igual que otras familias de sistemas de secreción, son capaces de translocar sustratos específicos a través de las membranas de bacterias gram-negativas. Lo que les diferencia del resto de sistemas y les dota de mayor interés es su plasticidad, siendo capaces de secretar tanto proteínas como ADN y complejos nucleoproteicos, tanto al medio extracelular

como a otra célula receptora, ya sea procarionta o eucariota. Esto se traduce en una enorme versatilidad biológica: los T4SS forman parte de las maquinarias conjugativas para mediar transferencia genética horizontal entre bacterias, están involucrados en la secreción de factores de virulencia a células animales, juegan también un papel en relaciones simbióticas entre bacterias y células de plantas, inyectan toxinas a bacterias competidoras, y son capaces de secretar-importar ADN del medio extracelular. Estas características les convierten en un interesante objeto de estudio tanto desde el punto de vista biológico como biotecnológico y biomédico. Basándonos en el conocimiento molecular que tenemos de estos procesos, nuestro grupo pretende también utilizar estos sistemas para desarrollar herramientas de introducción e integración sitio-específica de ADN en células humanas.

Una parte de nuestro trabajo se centra en el estudio comparativo de T4SS pertenecientes a sistemas conjugativos y a bacterias patógenas. Nuestros modelos de estudio son el T4SS del plásmido conjugativo R388, y el T4SS VirB/D4 de *Bartonella henselae*, que contribuye a la virulencia del patógeno en células humanas. Nuestro principal objetivo es descifrar la base molecular del reclutamiento de sustratos específicos por distintos T4SS, con especial énfasis en la transferencia de ADN.

Un resultado muy significativo del grupo ha sido demostrar que se pueden intercambiar los sustratos entre T4SS involucrados en conjugación y virulencia. Así, hemos mostrado que los complejos nucleoproteicos que se transfieren a través de los T4SS durante la conjugación bacteriana, consistentes en la

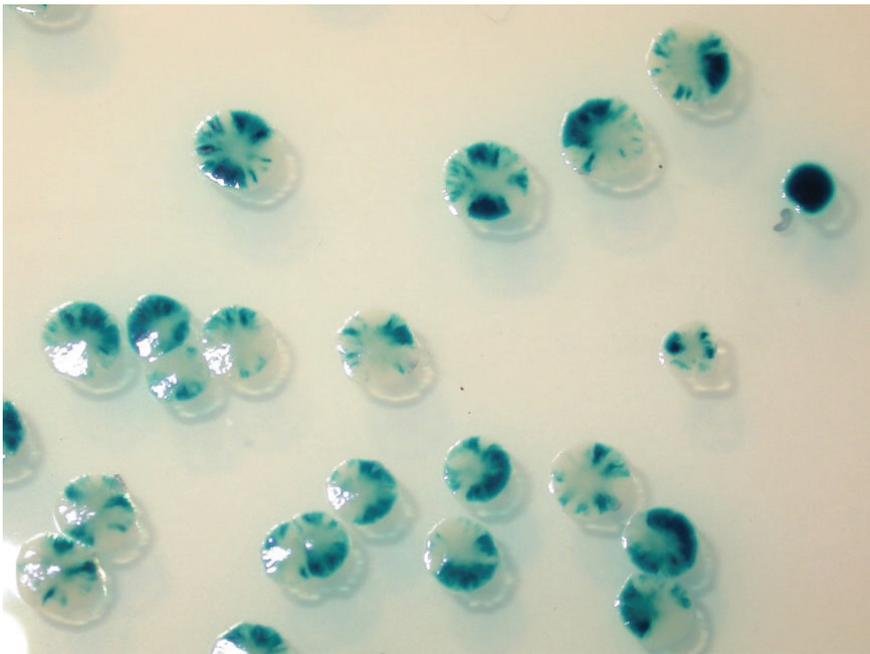


Figura: colonias bacterianas reflejando eventos de recombinación sitio-específica.

relaxasa conjugativa covalentemente unida a la hebra de ADN transferido, pueden ser reconocidos y translocados por los T4SS implicados en la virulencia de los patógenos humanos *B. henselae*, *Legionella pneumophila* o *Coxiella burnetii*. Es decir, que los T4SS de estos patógenos pueden secretar, en lugar de sus sustratos naturales, moléculas de ADN como si fuesen sistemas conjugativos.

Este resultado se pudo observar con una manipulación mínima o nula de los sistemas naturales, lo que argumenta que posiblemente refleje un fenómeno natural, y pueda ocurrir transferencia horizontal de ADN entre patógenos y sus células huésped, mediada por T4SS. Nuestro objetivo actual es demostrar si esta transferencia genética en efecto ocurre en la naturaleza, y descubrir el papel biológico que pueda cumplir, bien sea contribuyendo a la virulencia del patógeno que codifica el T4SS, o contribuyendo a posibles relaciones simbióticas del microbioma con su huésped.

La vertiente aplicada de esta línea consiste en manipular los T4SS de distintas bacterias patógenas para que secreten moléculas de ADN de interés in vivo directamente a las células humanas de elección, que serían distintas dependiendo del tropismo del patógeno de elección.

Otra línea de trabajo se centra en la caracterización de relaxasas conjugativas, las proteínas que procesan y pilotan el ADN a la célula receptora durante la conjugación. Nuestro modelo es la relaxasa del sistema conjugativo de R388, TrwC. Esta proteína, además de su papel en la conjugación, tiene actividad de recombinasa e integrasa sitio-específica en la bacteria receptora, actividad que hemos caracterizado en bacterias y estamos ensayando en células humanas. Uno de nuestros retos es dilucidar cuál sería el rol biológico de esta inesperada actividad, que curiosamente comparten algunas, pero no todas las relaxasas conjugativas analizadas. Nuestros datos indican que, si bien la proteína inicia las reacciones de recombinación/integración con alta especificidad de secuencia por su diana específica, la diana en la célula receptora es más laxa. Esto nos lleva a pensar que tal sistema podría proporcionar al plásmido conjugativo un sistema de colonización de huéspedes no permisivos (i.e. bacterias a las que el plásmido puede conjugar, pero donde no podría replicar), promoviendo su integración en el genoma receptor.

Al tener puesto a punto el ensayo de transferencia de ADN a través de T4SS de patógenos humanos, también hemos estudiado la actividad de TrwC y otras relaxasas tras ser transferidas a células humanas, para

descubrir que la relaxasa potencia en dos órdenes de magnitud la integración en el genoma humano del ADN transferido desde la bacteria. Esta integración no es sitio-específica, aunque estamos elaborando distintas estrategias para que así lo sea. Aunque aún estamos en el estadio de prueba de concepto, las aplicaciones potenciales son enormes.

## SELECCIÓN DE 10 PUBLICACIONES DE LOS ÚLTIMOS 10 AÑOS

Exchange of functional domains between a bacterial conjugative relaxase and the integrase of the human adeno-associated virus. Agúndez L, Zárate-Pérez F, Meier AF, Bardelli M, **Llo-sa M\***, Escalante CR, Linden RM, Henckaerts E. PLoS ONE 2018 13 (7): e0200841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200841>.

Coupling proteins in Type IV Secretion. **Llo-sa M\***, Alkorta I. In: S Backert & E Grohmann (Eds). "Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria". Curr Topics Microbiol Immunol 2017 413:143-168. Doi: 10.1007/978-3-319-75241-9\_6.

DNA delivery and genomic integration into mammalian target cells through Type IV A and B secretion systems of human pathogens. Guzmán-Herrador DL, Steiner S, Alperi A, González-Prieto C, Roy CR, **Llo-sa M\***. Front Microbiol. 2017 Aug 22; 8:1503. doi: 10.3389/fmicb.2017.01503

The Conjugative Relaxase TrwC Promotes Integration of Foreign DNA in the Human Genome. González-Prieto C, Gabriel R, Dehio C, Schmidt M, **Llo-sa M\***. Appl Environ Microbiol. 2017 83:e00207-17. doi: 10.1128/AEM.00207-17.

A Functional oriT in the Ptw Plasmid of Burkholderia cenocepacia Can Be Recognized by the R388 Relaxase TrwC. Fernández-González E, Bakioi S, Gomes MC, O'Callaghan D, Vergunst AC, Sangari FJ, **Llo-sa M\***. Front Mol Biosci. 2016 May 3;3:16. doi: 10.3389/fmolb.2016.00016.

Chloramphenicol Selection of IS10 Transposition in the cat Promoter Region of Widely Used Cloning Vectors. González-Prieto C, Agúndez L, **Llo-sa M\***. PLoS ONE. 2015 Sep 16;10(9):e0138615. doi: 10.1371/journal.pone.0138615.

A translocation motif in relaxase TrwC specifically affects recruitment by its conjugative type IV secretion system. Alperi A, Larrea D, Fernández-González E, Dehio C, Zechner EL, **Llo-sa M\***. J Bacteriol. 2013 Nov;195(22):4999-5006. doi: 10.1128/JB.00367-13.

HUH site-specific recombinases for targeted modification of the human genome. González-Prieto C, Agúndez L, Linden RM, **Llo-sa M\***. Trends Biotechnol. 2013 May;31(5):305-12. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.02.002.

New perspectives into bacterial DNA transfer to human cells. **Llo-sa M**, Schröder G, Dehio C. Trends Microbiol. 2012 Aug;20(8):355-9. doi: 10.1016/j.tim.2012.05.008.

Bacterial Type IV secretion systems in human disease. **Llo-sa M**, Roy C, Dehio C (2009). Mol. Microbiol. 73(2):141-151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06751.x.