

# Sistemas de Secreción Tipo IV bacterianos. Biología y Aplicaciones

MATXALEN LLOSA, DOLORES L. GUZMÁN-HERRADOR, ANDREA FERNÁNDEZ-GÓMEZ, PABLO GURIDI-FERNÁNDEZ, JOSEPHINE HOTTEN

Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Santander (España)

✉ matxalen.llosa@unican.es

🌐 <https://web.unican.es/ibbtec/es-es/sobre-el-ibbtec/equipo/directorio/detalle-miembro?d=MatxalenLlosaLAB>



Foto de grupo. De izquierda a derecha, Josephine Hotten, Pablo Guridi, Matxalen Llosa, Dolores Guzmán y Andrea Fernández.

El equipo dirigido por 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 y el CSIC.

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

cos, tanto al medio extracelular como a otra célula receptora, ya sea procariota o eucariota (Bleves y cols, 2020). 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 simbóticas 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. Uno de nuestros objetivos es aprovechar su promiscuidad para lle-

gar a virtualmente cualquier tipo celular. Basándonos en el conocimiento molecular que tenemos de estos procesos, pretendemos también utilizar estos sistemas para desarrollar herramientas de introducción de ADN y proteínas en bacterias silvestres de difícil manejo. Como primer paso, estamos ampliando el abanico de bacterias silvestres susceptibles de ser modificadas por conjugación desde *E. coli* (Fig. 1; Samperio y cols, 2001).

Nuestro trabajo se centra también en descifrar la base molecular del reclutamiento de sustratos. Hace tiempo demostramos que se pueden intercambiar los sustratos entre T4SS involucrados en conjugación y virulencia (Llosa y cols, 2012): complejos nucleoproteicos consistentes

en la 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* (Guzmán-Herrador y cols., 2017). Este resultado se pudo observar con una manipulación mínima de los sistemas naturales, lo que argumenta que posiblemente refleje un fenómeno natural. 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. Con este objetivo, hemos puesto a punto un sistema de detección y análisis de integración de ADN bacteriano en el genoma de células humanas infectadas por bacterias, y estamos estudiando el patrón de integración y el potencial mecanismo subyacente. La capacidad de T4SS de bacterias patógenas de transferir complejos nucleoproteicos abre también la puerta al uso de T4SS para enviar ADN de interés in vivo directamente a las células humanas de elección, que serían distintas dependiendo del tropismo del patógeno de elección. Más aún, hemos visto que el ADN guiado por la relaxasa es más proclive a ser integrado en el genoma receptor (González-Prieto y cols., 2017).

El grupo es también experto en el estudio de relaxasas conjugativas (Guzmán-Herrador y Llosa, 2019). Fuimos pioneros en mostrar que estas proteínas son translocadas a las células receptoras, donde son funcionales y necesarias para concluir el proceso conjugativo (Draper y cols 2005). Estamos analizando en bacterias el conjunto de proteínas que se transfiere por conjugación aparte de la relaxasa, y los requisitos para que estas proteínas se secreten. La vertiente aplicada de esta línea de trabajo consiste en manipular las señales de secreción para customizar la secreción heteróloga (Guzmán-Herrador y cols., 2023). Utilizando las relaxasas conjugativas como drivers para transferir otras proteínas de interés directamente a la célula receptora de la conjugación, hemos enviado nucleasas Cas y editores de bases fusionados a relaxasas conjugativas, y mostramos que estas proteínas de fusión son activas en las células receptoras. Esto permite enviar maquinaria de información genética a cualquier bacteria receptora de conju-

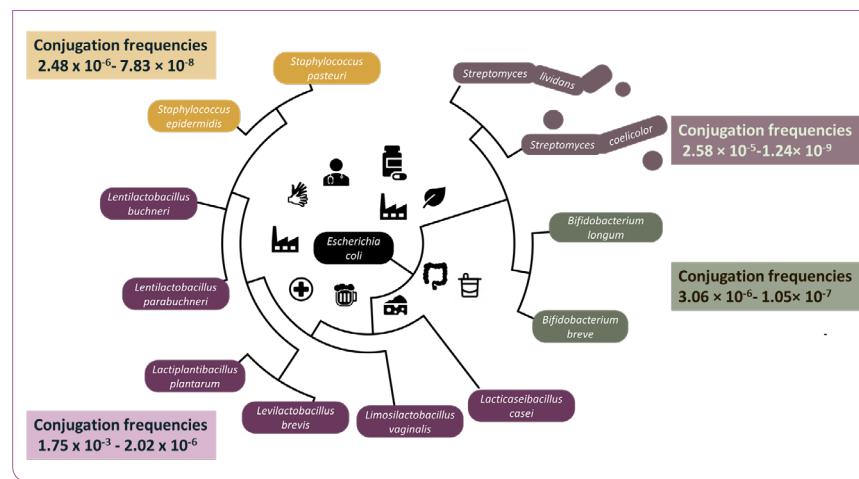


Figura 1. Bacterias Gram-positivas de interés biotecnológico y biomédico que hemos modificado mediante conjugación desde *E. coli*.

gación sin necesidad de adaptarla a las señales de expresión de la receptora, y sin el riesgo de sobreexpresar nucleasas que conllevaría actividad off-target y toxicidad (Guzmán-Herrador y cols., 2024).

Por último, una reciente línea de investigación se centra en crear herramientas para monitorizar la transferencia horizontal de plásmidos en entornos naturales. La base es la creación de plásmidos movilizables capaces de almacenar la información de las células que visitan mediante la adquisición de espaciadores en su propio array. Estos plásmidos permitirán seguir la trayectoria de elementos genéticos móviles individuales dentro de mezclas complejas de bacterias en muestras naturales, lo que aportará valiosa información sobre la diseminación de plásmidos en la naturaleza, incluyendo la información que codifican, como resistencias a antibióticos.

## Referencias citadas

- Bleves S, Galán J, Llosa M.** (2020). Bacterial injection machines: evolutionary diverse but functionally convergent. *Cell Microbiol.* 22(5):e13157. <https://doi.org/10.1111/cmi.13157>
- Draper O, César CE, Machón C, de la Cruz F, Llosa M.** (2005). Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in the recipient cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16385-16390.
- González-Prieto C, Gabriel R, Dehio C, Schmidt M, Llosa M.** (2017). The conjugative relaxase TrwC promotes integra-
- tion of foreign DNA in the human genome. *Appl Environ Microbiol.* 83:e00207-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00207-17>
- Guzmán-Herrador DL, Llosa M.** (2019). The secret life of conjugative relaxases. *Plasmid* 104:102415. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.102415>
- Guzmán-Herrador DL, Fernández-Gómez A, Llosa M.** (2023). Recruitment of heterologous substrates by bacterial secretion systems for transkingdom translocation. *Front Cell Infect Microbiol.* 13:1146000. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1146000>
- Guzmán-Herrador DL, Fernández-Gómez A, Depardieu F, Bikard D, Llosa M.** (2024). In vivo delivery of functional Cas:DNA nucleoprotein complexes into recipient bacteria through a Type IV Secretion System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 121(43):e2408509121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2408509121>
- Llosa M, Schröder G, Dehio C.** (2012). New perspectives into bacterial DNA transfer to human cells. *Trends Microbiol.* 20(8): 355-359.
- Samperio S, Guzmán-Herrador DL, May-Cuz R, Martín MC, Álvarez MA, Llosa M.** (2021). Conjugative DNA Transfer from *E. coli* to Transformation-Resistant Lactobacilli. *Front Microbiol.* 12:606629. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.606629>