

Arquitectura molecular del complejo Tap3-Tke5: descifrando la secreción de armas biológicas en *Pseudomonas putida*

CARMEN VELÁZQUEZ^{1,2}, MAIALEN ZABALA-ZEARRETA¹, PATRICIA BERNAL³, DAVID ALBESA-JOVÉ^{1,2}

¹Instituto Biofisika (CSIC, UPV/EHU), Leioa, España.

²Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, España.

³Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

✉ pbernal@us.es | david.albesa@ehu.es

La bacteria del suelo *Pseudomonas putida* KT2440 es un organismo de gran interés biotecnológico por su papel como agente de biocontrol, capaz de eliminar fitopatógenos mediante el uso de potentes Sistemas de Secreción de Tipo VI (T6SS, por sus siglas en inglés). Entre su arsenal destaca la toxina Tke5, un miembro de la familia BTH_I2691 (también conocida como VasX) que actúa formando poros en las membranas de bacterias competidoras. Sin embargo, los mecanismos que permiten el reclutamiento y la exportación de estas grandes toxinas multidominio han permanecido en gran medida desconocidos hasta ahora.

En este estudio, presentamos la estructura del complejo formado por Tke5 y su proteína adaptadora específica, Tap3, resuelta mediante criomicroscopía electrónica (cryo-EM) a una resolución de 2.8 Å. Esta estructura revela que Tap3 adopta un pliegue único en forma de herradura compuesto por dos dominios que atrapan la toxina para cargar con ella el sistema de secreción. Un hallazgo fundamental es el papel del bucle Tap3-Loop31-50, que protruye desde el dominio N-terminal de la proteína adaptadora y representa más del 50% de la superficie de interacción con la toxina.

La caracterización estructural de Tke5 muestra una organización en tres regiones principales: un dominio MIX (Clan II) N-terminal, una región central alfa-helicoidal y un dominio RBD (dominio de unión a receptor) C-terminal rico en láminas beta. Mediante disección funcional, demostramos que el dominio MIX es el responsable directo de la unión con Tap3, facilitando así la carga de la toxina en la maquinaria de secreción. Además, determinamos que la región alfa-helicoidal central es, por sí sola, suficiente para provocar la muerte celu-

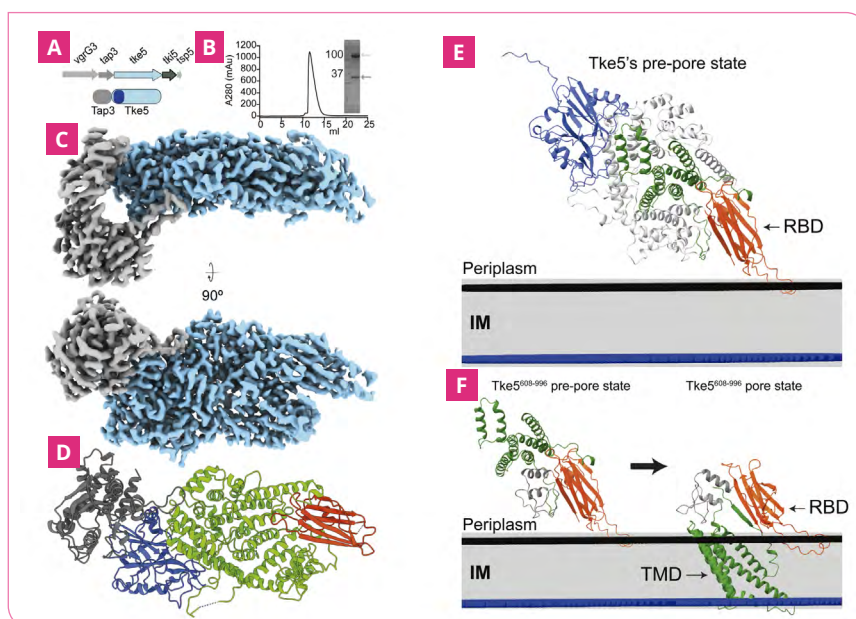


Figura 1. Caracterización estructural del complejo Tap3-Tke5 y modelo de interacción con la membrana celular. A) Esquema de la organización genética de vgrG3, tap3, tke5, tki5 y tsp5. B) Cromatograma de filtración en gel del complejo Tap3-Tke5 purificado. C) Densidad por criomicroscopía electrónica (cryo-EM) del complejo Tap3-Tke5, mostrada de forma perpendicular al eje más largo del complejo y rotada 90° en el sentido de las agujas del reloj. D) Representación en diagramas de cintas (o "cartoon") de la estructura atómica de Tap3-Tke5, mostrada de forma perpendicular al eje más largo del complejo. E y F) Modelo de la interacción de Tke5 con la membrana interna de una bacteria diana. Tras su liberación en el espacio periplásmico a través del T6SS, se hipotetiza que Tke5 interactúa inicialmente con la membrana interna a través de su dominio de unión al receptor rico en láminas beta C-terminal (RBD, residuos 864-996, mostrado en rojo) insertando en la membrana el dominio formado por hélices transmembranas (mostrado en verde).

lar, identificándola como el módulo tóxico esencial responsable de la formación del poro. Por su parte, el dominio RBD C-terminal actúa como un sensor de membrana que, aunque no es esencial para la toxicidad, facilita la adhesión a la membrana citoplasmática diana.

Finalmente, nuestro trabajo confirma que la proteína inmunitaria Tki5 protege a

la célula productora neutralizando específicamente la toxicidad de la región alfa-helicoidal. Estos resultados proporcionan la primera visión a nivel atómico del reclutamiento de efectores dependientes de MIX y definen un modelo mecánico para la familia de toxinas BTH_I2691, fundamental para el desarrollo de estrategias avanzadas de protección de cultivos en una agricultura sostenible.