

**Universidad de Cantabria**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Biología Molecular**



**La interfase molecular entre los Sistemas de  
Secreción Tipo IV y sus sustratos**

**Delfina Larrea**

**Febrero, 2013**



**University of Cantabria**

**School of Medicine**

**Molecular Biology Department**



**The molecular interface between the Type IV  
Secretion Systems and their substrates**

**Delfina Larrea  
February, 2013**



Dña. **Matxalen Llosa Blas**, Profesora Titular de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

**CERTIFICA:** Que Dña. **Delfina Larrea** ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título "La interfase molecular entre los Sistemas de Secreción Tipo IV y sus sustratos".

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado, al objeto de poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, a 7 de Febrero de 2013

Fdo. Matxalen Llosa Blas



El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria bajo la dirección de la Doctora Matxalen Llosa Blas.

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias a la beca Jae-Predoc bajo la tutela del Doctor Manuel Espinosa Padrón del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid) durante el período 2008-2012

Durante esta tesis se ha realizado una estancia de 3 meses en el laboratorio del Dr. Javier Diaz Nido (CBMSO, Universidad Autónoma de Madrid) y otra de 4 meses en el laboratorio del Dr. Eric Schon (MNC, Columbia University, New York, USA). Ambas estancias se realizaron gracias a ayudas de la beca JAE-Predoc para estancias breves.



**A mi mamá**



Pensar que hace NADA, estaba en el aeropuerto cargada de maletas y con toda la ilusión del mundo, y ya me encuentro escribiendo los agradecimientos de Una Tesis. Me gustaría dejar en estas páginas mis "MUCHÍSIMAS GRACIAS" de todo corazón a todos los que de algún modo contribuyeron a este trabajo, que esta Biblia no es sólo mía!...seguro que se me pasa más de uno... y más de un error ( y de cualquier clase)... estoy re cansada!

Quiero agradecer a mi directora de tesis **Matxalen** por su excelentísima dirección. Gracias por haberme dado la oportunidad de venir a España a hacer mi tesis. Gracias por preocuparte por mi en todos estos años, desde el principio hasta el final, a nivel profesional pero por sobre todas las cosas a nivel personal. Gracias por enseñarme, escuchar " mis ideas un poco locas" y guiarme en este mundo que elegimos - El DE LA CIENCIA- del cual disfruto cada día más.....gracias por todas las oportunidades y gracias por animarme a ir a NYC cuando ya casi me hacía a un lado. Estas son solo unas pocas GRACIAS....

Gracias al Dr. **Manuel Espinosa** mi tutor de beca. Gracias, Manolo por tantos favores, gracias por presentarme a tantas personas relacionadas a este mundo en los Plasmid, REDEEX etc. Mi directora y yo te lo re agradecemos. Gracias por este último favor junto con la Dra. Itziar Alkorta.

Mi muy especial reconocimiento a mis compañeras de laboratorio **ANABEL, CORAL Y ESTHER** y a la recién llegada **ELENA**. Muchas gracias por toda VUESTRA (bien no?) colaboración en esta tesis y por los ánimos, día a día. Pero no puedo dejar pasar todo el esfuerzo y el tiempo que han dedicado a la corrección de este manuscrito, gracias por las sugerencias también- gracias por enseñarme español " el de verdad" - Muchas gracias!

**Héctor**, muchas gracias por enseñarme tanto en mis comienzos y responder mis preguntontas sin reírte. Gracias por los catálogos ☺ , estamos en ello, gracias en fin (la del fin).

Y llegamos a **Leti**, amiga mía gracias por todo, no me alcanzarían las páginas de esta tesis para recordar todos los momentos que hemos pasado juntas. Sin embargo, al parecer algo llamado AMÉRICA, nos ha unido. Gracias por prestarme un poquito de tu mamá, papá, hermanas (Jaira y Miri) y amigas (Nere). Hoy puedo decir que tengo familia Española a la que voy a extrañar mucho. Gracias por ayudarme en todo (ya lo sabes), aconsejarme y darme esos abrazitos cuando estaba en crisis de extrañitis aguda... ..te deseo lo mejor en esta nueva etapa ☺. Gracias por enseñarme a clonar, gracias por las charlas sobre ciencia, gracias por esos pitis de las 7 de la tarde, gracias por incluirme en tus planes siempre.

Muchas gracias a TODOS los grupos del **Departamento de Biología Molecular**. Todos me han dado una mano para que esta tesis llegue a su puerto.

Gracias al grupo Fernando de la Cruz por haberme hecho un lugarcito durante mis comienzos y siempre que fue necesario, muchas gracias a todos. Gracias Elena por enseñarme a realizar los ensayos ATPasa y responder todas mis dudas con tanta paciencia, no lo olvido, gracias!. Gracias Iñaki y Gabi por responder a mis preguntas sobre proteínas y algún que otro anticuerpo. Mapi, gracias por hacerme un lugar en tu casa, por las dudas resueltas, por las referencias, por preguntar "¿que tal vas?" gracias por todo (sos un libro abierto) GENIA. Gracias Matí y Sandra por siempre estar dispuestas a buscar los fósiles, esperarme para mandar los DNAs a secuenciar o enseñarme a preparar la P11 (entre miles de cosas). Gracias Sheila, Carlos y Ana.

Muchas gracias Dolo por contribuir en la escritura de esta tesis desde sus comienzo con los tipos de letras, insertar figura, hasta el final .....QUE ESTRÉS. Gracias Jesús y Ramón Merino. Gracias Manolo de micro por enseñarme esa ruta tan bonita por Cantabria, preguntarme siempre como estoy, socorrerme con yerba mate o darme un alfajor. Gracias a los de Micro.

Gracias, Gerardo por tus consejos con las PROTEÍNAS en general y la ultracentrífuga! Bioquímicos todos también gracias, Manu (Ex-Dolo) y Fonso gracias por el rodillo para los WB y esa técnica en general. Pieros, Ana, Lore, Javi, Gracias a los de inmuno, (Jorge,

Marcos, Fer, Maigui etc). Gracias a los Pasos ( Vero, Rebe y técnicas ) gracias por los tubitos de la ultra y los de colores que me gustan tanto.. eso para vos Vero.

Gracias a los genéticos: Inma cuantas tardes de sol y cuantas alícuotas de TrwA y TrwB, gracias!. Yera y Juan ( ex genético): esas horas que dedicábamos al deporte y a la playa. Alejandro y Jorge: gracias con todo lo relacionado a proteínas, y gracias. Gracias Raúl y David. Por los buenos momentos sobre todo al comienzo. Gracias Sandrita. En fin gracias a todos.

Cris, guacha! Te fuiste a Madrid! Gracias a Santi por todo lo que han hecho por mi.

Gracias Félix por enseñarme a jugar al squash... quizás algún día vuelva a las canchas a vencer!!.. Gracias Matxalen y Félix por dejarme ser la canguro de los niños. Sin duda los voy a extrañar mogollón.

Gracias EMILIO, CARMEN y CHARO. También a los administrativos del CIB en Madrid.

Gracias Sara Pérez-luz por interesarte en la conjugación, y por enseñarme los "BACs".

Thanks to Dr. Eric Schon, Estela, Kevin, Marc and Marta. I miss you all.....I love NYC! Gracias, Estela por ayudarme tanto en esa estancia y ahora. Gracias Bea y Manolo..

A mis Argentos, empezando por los que tengo más cerca: Vero y Fer, gracias chicas por estar ahí siempre, las quiero. Rafa, GRACIAS por preocuparte por mi y por estar siempre, desde que llegue a Santander. Lina y Lucho, GRACIAS por darme un hogar, por adoptarme como hija ( un poco mayor) y aguantarme en este momento. Chicos gracias por hacerme sentir como en casa. Augusto, GRACIAS por todo lo que has aguantado sin tener que hacerlo. Gracias por estar conmigo en este momento tan importante .....ya lo sabes.

A mi ex directora de tesina Fernanda Izaquirre Gracias por la carta de referencia, y por interesarte por mi Tesis. Gracias Javi Adur que desde cualquier lugar del mundo siempre tengo tus noticias. Gracias Gaby.

Gracias Raúl mi amigo y compañero de estudio (Vos sí que me has aguantado) y como ya dijiste " Este año es el año de hacernos Doctores" vos en allá y yo acá.

A mis amigos de Argentina, AGUS, Margui y Mila. Mane, groso te quiero. Gracias por mostrar a Leti y a mí Ibiza (Plan burbuja ..un antes y un después) sin duda. Siempre presentes... mis amigas de Hockey (que hago sin ustedes en Paraná?) Lucha, Mica , Caro, Mariel, Pauli, chufa todas. A los que han estado siempre a miles de Km ....GRACIAS.

A vos ....ya sabes, gracias por estar SIEMPRE (no me iba a olvidar nunca).

Gracias **A mi Familia,**

Gracias **Mamá** por todo. Por animarme y ayudarme a llevar a cabo mis proyectos, uno importante era mi tesis. Gracias por animarme a venir a España, aunque más de una lágrima, se que te ha costado. Gracias al ángel que me cuida y me guía y a vos por inculcarme los valores que hoy tengo. Gracias A mis Hermanos, **Paula y Esteban**, los amo. Gracias **Ricardo** ya sabes lo mucho que te quiero, gracias por ayudar a mamá y por ser parte de nuestra familia que ya somos un montón!. Gracias Tío Armando y Tía Dorita- por por tanto cariño. Gracias a los infaltables, Nono y YiYa. Gracias Abuela Mina (los santos están cansados de escucharte). Jorge, también para vos Gracias (se que vas a llorar).

No me quiero extender más en mi lista de gracias, pero no quiero de dejar de dar las Gracias a España por tratarme tan bien (no lo suelo decir), pero lo siento.

**GRACIAS TOTALES**

**Delfi**

# Índice

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>1. Introducción</b>	3
<b>1.1. Conjugación bacteriana</b>	5
1.1.1. Generalidades	5
1.1.2. Mecanismo general conjugativo	7
1.1.3. El sistema conjugativo del plásmido R388	10
1.1.3.1. La región <i>Mpf</i>	11
1.1.3.2. La región <i>Dtr</i>	12
<b>1.2. Los Sistemas de Secreción Tipo IV (T4SS)</b>	16
1.2.1. Clasificación de los T4SS de acuerdo a su función	16
1.2.2. Componentes de los T4SS	17
1.2.2.1. ATPasas citoplasmáticas	19
1.2.2.2. <i>Core complex</i>	21
1.2.2.3. Proteínas formadoras del <i>pilus</i>	22
1.2.3. Ruta de translocación del sustrato	23
1.2.4. Señales de translocación (TS) del sustrato	24
1.2.4.1. TS en efectores de T4SS involucrados en patogenicidad	25
TS en el C-terminal	25
TS internas	26
Chaperoninas involucradas en la translocación	26
1.2.4.2. TS de relaxasas	27
TS de relaxasas para los T4SS conjugativos	27
TS de relaxasas para T4SS involucrados en patogenicidad	29
1.2.5. Relación entre los T4SS conjugativos y los implicados en patogenicidad	29
1.2.5.1. Similitud entre el T4SS (Trw) de <i>Bartonella henselae</i> ( <i>Bh</i> ) y del plásmido conjugativo R388	30

<b>1.3. Proteínas acopladoras de T4SS (T4CP)</b>	32
1.3.1. Generalidades de las T4CP	32
1.3.2. TrwB, la T4CP del plásmido R388	35
1.3.2.1 Estructura de TrwB $\Delta$ N70	36
1.3.2.2. Análisis <i>in vitro</i> de TrwB $\Delta$ N70	38
1.3.2.3. Interacciones proteína –proteína de TrwB	40
1.3.2.4. Dominios funcionales de TrwB	40
<b>1.4. Motores moleculares hexaméricos de la familia RecA/AAA+</b>	45
1.4.1. Hidrólisis del nucleótido trifosfato	46
1.4.2. Unión al sustrato y estado oligomérico	48
1.4.3. Motores moleculares con los que TrwB presenta mayor similitud	49
1.4.3.1. Complejo F1-ATPasa bovino	50
1.4.3.2. La proteína portal P4 del fago phi 12	51
1.4.3.3. Translocadores de ADN anclados a membrana	53
<b>1.5. La conjugación como un mecanismo universal de transferencia de ADN</b>	57
1.5.1. Conjugación a plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (At)	57
1.5.2. Conjugación a levaduras mediada por <i>E. coli</i>	58
1.5.3. Conjugación a células de mamífero mediada por <i>E. coli</i>	59
1.5.4. Conjugación entre bacterias y mitocondrias aisladas	60
<b>2. Planteamiento y objetivos</b>	63
<b>3. Metodología</b>	67
<b>3.1. Cepas de bacterias y levaduras utilizadas en este trabajo</b>	69
3.1.1. Cepas de <i>E. coli</i>	69
3.1.2. Cepas de <i>S. Cerevisiae</i>	70
<b>3.2. Plásmidos</b>	71
3.2.1. Plásmidos usados en este trabajo	71
3.2.2. Plásmidos construidos para este trabajo	76
<b>3.3. Métodos de biología molecular</b>	79
3.3.1. Extracción de ácidos nucleicos	79
3.3.1.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	79
3.3.1.2. Extracción de BACs a partir de <i>E. coli</i>	79

3.3.1.3. Extracción de ADN plasmídico a partir de levaduras	80
3.3.1.4. Extracción de ARN total	80
3.3.2. Amplificación de ADN por PCR	81
3.2.1. RT-PCR	81
3.2.2. PCR mutagénica	82
3.3.3 Construcción de plásmidos	82
3.3.3.1. Digestiones con enzimas de restricción	84
3.3.3.2. Ligaciones	84
3.3.4. Reacción de circularización de ARN	85
3.3.5. Secuenciación de ADN	85
3.3.6. Electroforesis de ADN	85
3.3.6.1. Electroforesis de ADN plasmídico en geles de agarosa	85
3.3.6.2. Electroforesis de campo pulsado	86
<b>3.4. Métodos microbiológicos</b>	87
3.4.1. Medios de cultivo y conservación	87
3.4.1.1. Cultivo de <i>E. coli</i>	87
3.4.1.2. Cultivo de levaduras	87
3.4.2. Introducción de ADN por transformación	88
3.4.2.1. Transformación de <i>E. coli</i> por TSB	88
3.4.2.2. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	88
3.4.2.3. Transformación de levaduras	89
3.4.3. Manipulación de BACs	90
3.4.4. Conjugaciones	91
3.4.4.1. Conjugación de <i>E. coli</i> a <i>E. coli</i>	91
3.4.4.2. Conjugación de <i>E. coli</i> a levaduras	96
3.4.4.3. Conjugación de bacterias a mitocondrias aisladas	97
<b>3.5. Métodos de biología celular</b>	100
3.5.1. Cultivos celulares	100
3.5.2. Aislamiento de mitocondrias	100
3.5.3. Ensayos de inmunofluorescencia	101

<b>3.6. Métodos bioquímicos</b>	102
3.6.1. Purificación de proteínas	102
3.6.2. Visualización y cuantificación de proteínas	103
3.6.2.1. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-PAGE	103
3.6.2.2. Detección de proteínas por Western blot	103
3.6.2.3. Cuantificación del número de moléculas de TrwB por célula	106
3.6.2.4. Cuantificación de proteínas	106
3.6.3. Ensayo de actividad ATPasa	107
3.6.4. Ensayos de retardo en geles de agarosa	108
3.6.5. Ensayos de interacción TrwB –TrwA	109
<b>3.7. Programas informáticos</b>	110
<b>4. Resultados y discusión</b>	111
<b>4.1. Relación estructural entre la proteína acopladora y el T4SS</b>	113
4.1.1. Estudios previos	115
4.1.2. Efecto del replicón en los niveles de proteínas Trw	116
4.1.3. Influencia de los mutantes <i>trw</i> de R388 en los niveles de TrwC	117
4.1.4. Influencia de los mutantes <i>trw</i> de R388 en los niveles de TrwB	117
4.1.5. Influencia de los mutantes <i>trw</i> de R388 en los niveles de las proteínas del T4SS de R388	120
4.1.6. Modelo de ensamblaje del T4SS de R388	122
4.1.7. Complementación estructural de los mutantes de las proteínas Trw de R388 por el sistema Trw de <i>Bt.</i>	126
<b>4.2. Análisis estructura/función de la proteína acopladora TrwB</b>	129
4.2.1. Optimización de los ensayos de conjugación en diferentes condiciones	129
4.2.1.1. Efecto del nivel de expresión de <i>trwB</i> en conjugación	132
4.2.1.2. Efecto del T4SS de pKM101	134

4.2.1.3. Efecto de la expresión de <i>trwB</i> sobre la translocación de la relaxasa TrwC	137
4.2.2. Efecto de los mutantes de TrwB en la translocación del sustrato	139
4.2.3. Caracterización de los residuos del ICH del hexámero de TrwB afectados en conjugación	142
4.2.3.1. Construcción de mutantes	143
4.2.3.2. Caracterización <i>in vivo</i> de los mutantes	143
4.2.3.3. Caracterización <i>in vitro</i> de los mutantes del ICH de TrwB	147
Interacción con TrwA y ADN	147
Ensayos de actividad ATPasa	149
Optimización del ensayo	149
Determinación de la actividad ATPasa de TrwBΔN70 y mutantes	151
4.2.4. Recapitulación de los datos obtenidos para los mutantes	154
4.2.4.1. Modelo de translocación del sustrato por TrwB	155
4.2.4.2. El ICH de TrwB y su relación con otros motores moleculares	158
<b>4.3. Determinación de la señal de translocación (TS) de la relaxasa TrwC</b>	160
4.3.1. Diseño de un ensayo triparental para la determinación de la TS de TrwC	160
4.3.1.1. construcción de proteínas de fusión entre TrwC y TaxC	161
4.3.1.2. Ensayos triparentales de conjugación con la fusión TaxC-TrwC	162
4.3.2. Determinación de la TS de TrwC mediante ensayos CRAFT	165
4.3.2.1. Análisis de secuencia de la posible TS de TrwC	166
4.3.2.2. Diseño de mutantes puntuales en la posible TS de TrwC	168
4.3.2.3. Diseño de fusiones Cre-TrwC	169
4.3.2.4. Estabilidad de las fusiones Cre-TrwC	171
4.3.2.5. Ensayos CRAFT para la determinación de la TS de TrwC	174

<b>4.4. La interfase entre el T4SS y la célula receptora : conjugación a levaduras y mitocondrias</b>	183
4.4.1. Transferencia de BACs de bacterias a levaduras por conjugación	183
4.4.1.1. Ensayos de conjugación a levaduras	184
4.4.1.2. Construcción de BACs conjugativos	187
4.4.1.3. Conjugación de BACs a levaduras	190
4.4.2. Conjugación a Mitocondrias	194
4.4.2.1. Construcción de plásmidos	195
4.4.2.2. Optimización de la reacción de circularización de ARN	199
4.4.2.3. Ensayos de conjugación a mitocondrias aisladas	201
<b>5. Recapitulación y perspectivas</b>	205
<b>6. Conclusiones</b>	219
<b>7. Bibliografía</b>	223
<b>8. English Version</b>	239
<b>9. Anexo: publicaciones</b>	261

## Abreviaturas

aa	Aminoácido
AAD	Dominio todo alfa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina 5'-difosfato
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
<i>At</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BAC	Bacterial artificial chromosome
BFS	Suero fetal bovino
<i>Bh</i>	<i>Bartonella henselae</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>Bt</i>	<i>Bartonella tribocorum</i>
Cm	Cloranfenicol
CRAFT	Cre recombinase assay for protein translocation
C-terminal	Dominio C-terminal
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
<i>Dtr</i>	Replicación y transferencia de ADN
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
<i>FNX</i>	<i>frataxina</i>
Gm	Gentamicina
His	Histidina
h-mt-ARN <sup>Arg</sup>	ARN de transferencia de arginina mitocondrial humano
ICH	Canal interno
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Log	Variación de un orden de magnitud
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
<i>Mpf</i>	Formación del par conjugativo
NBD	Región de unión a nucleótidos
Neo	Neomicina
<i>nic</i>	Mella inicial en el <i>oriT</i>
N-terminal	Dominio N-terminal
NTP	Nucleótido 5'-trifosfato
Nx	Ácido nalidíxico
o/n	(overnight) toda la noche
<i>oriT</i>	Origen de transferencia
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato
p/v	Relación 1:1 peso:volumen

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>P<sub>lac</sub></i>	Promotor lactosa
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SD	Secuencia Shine-Dalgarno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Sm	Estreptomicina
RLX	Relaxosoma
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
T4CP	Proteína acopladora de Sistemas de Secreción tipo IV
T4SS	Sistemas de Secreción Tipo IV
T7RNAP	ARN Polimerasa del fago T7
T7t	Terminador de la transcripción para la polimerasa T7
TA	Temperatura ambiente
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-diamina
TMD	Dominio transmembrana
Trp	Triptófano
Tra <sup>-</sup>	Fenotipo no conjugativo
Tra <sup>+</sup>	Fenotipo conjugativo
TrwA-h	TrwA-histidina
TS	Señal de translocación
Tp	Trimetroprin
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

# **1. Introducción**



## **1.1. Conjugación bacteriana**

### **1.1.1. Generalidades**

La conjugación es el mecanismo de transferencia horizontal de ADN más ubicuo en el mundo procariota (Halary *et al.*, 2010). La transferencia horizontal de información genética es responsable de la existencia de un reservorio de genes móviles en procariotas (de la Cruz & Davies, 2000).

La conjugación bacteriana es un proceso mediante el cual se transfiere un elemento genético desde una célula donadora a una célula receptora existiendo un contacto físico entre ambas células. Dicho contacto está mediado por una estructura que se conoce como "aparato conjugativo" (de la Cruz & Lanka, 1998, Zechner *et al.*, 2000).

Las bases moleculares del proceso conjugativo han sido ampliamente estudiadas, puesto que es el sistema que participa en mayor grado en la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos, vías metabólicas, propiedades simbióticas y otros elementos genéticos móviles (de la Cruz & Davies, 2000, van der Meer & Sentchilo, 2003, Frost *et al.*, 2005, Ding & Hynes, 2009, Allen *et al.*, 2010). La conjugación además está implicada en el establecimiento de procesos sociales, promueve la formación de biofilms (Ghigo, 2001) y dirige la cooperación microbiana (Nogueira *et al.*, 2009).

Una característica de la conjugación, que contribuye a su relevancia biológica, es que presenta un amplio rango de huésped en comparación con otros mecanismos de transferencia genética horizontal como son la transformación (captación de ADN libre del medio exterior) o transducción (transferencia de ADN por medio de virus bacteriófagos) (Frost *et al.*, 2005). La transferencia de ADN por conjugación puede ocurrir entre diferentes reinos (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987, Heinemann & Sprague, 1989) (ver sección 1.5).

El ADN transferido en general es un plásmido autotransmisible o movilizable (requiere la ayuda del primero) y no requiere de la existencia de un fenómeno de recombinación posterior para estabilizarse en la célula receptora. Sin embargo también puede ocurrir la transferencia de secuencias cromosómicas mediante plásmidos que se integran en el cromosoma, formando así una cepa Hfr (*high frequency of recombination*), o por elementos integrativos/conjugativos (EIC,

anteriormente conocidos como transposones conjugativos), que codifican las proteínas necesarias para su escisión del ADN en la cepa donadora y para su transferencia conjugativa e integración en el genoma de la cepa receptora (Salyers *et al.*, 1995).

Los plásmidos conjugativos se pueden encontrar en bacterias Gram positivas como es el caso de *Streptomyces* (Grohmann *et al.*, 2003), sin embargo el mayor conocimiento que tenemos proviene de los plásmidos encontrados en Gram negativas, y en particular en la familia de *Enterobacteriaceas*. Seis grupos de plásmidos autotransmisibles han sido ampliamente caracterizados en esta familia y utilizados para establecer un modelo general de conjugación. De ellos, los más estudiados son IncF (plásmidos: F, R1 y R100), IncI (R64), IncN (pKM101), IncW (R388), IncP (RP4 y RK2) e IncX (R6K) (Couturier *et al.*, 1988). Existe además otro grupo de plásmidos llamados no autotransmisibles o movilizables, los cuales requieren de la presencia de un plásmido autotransmisible para ser movilizados por conjugación. En este grupo encontramos los plásmidos RSF1010 y R1162 (IncQ), y a los plásmidos ColE1 y CloDF13 (Francia *et al.*, 2004). Los plásmidos se clasifican también por su rango de huéspedes, amplio rango de huésped: IncN, IncP, IncW, o limitado rango de huésped: IncF, IncI (de la Cruz *et al.*, 2010).

La maquinaria conjugativa produce un apéndice llamado *pilus* que sirve para establecer un contacto físico con la célula receptora. Se han descrito dos tipos de *pili*: *F-like pilus*, el producido por los plásmidos del grupo IncF, largo y flexible o el *P-like pilus* producido por los plásmidos del grupo IncP, cortos y rígidos. Como consecuencia de estas características los plásmidos del grupo IncP conjugan con una eficiencia mayor en medio sólido en comparación a un medio líquido (Lawley *et al.*, 2003).

La conjugación puede ocurrir en el citoplasma celular de células eucariotas. *Salmonella enterica serovar typhimurium*, una bacteria invasiva, es capaz de intercambiar genes dentro de células de intestino humanas en cultivo (Ferguson *et al.*, 2002). En este trabajo se utilizaron los plásmidos RP4 (IncP) y F (IncF) y se encontró que ambos plásmidos eran capaces de conjugarse intracelularmente con frecuencias comparables. Realizando los correspondientes controles negativos demostraron que la transferencia de ADN ocurría por conjugación.

Más adelante, se describió una cepa bacteriana de *Escherichia coli* (*E. coli*) que era capaz de invadir células humanas en cultivo, y escapar del fagosoma

teniendo acceso al citoplasma. Demostraron además que estas bacterias invasivas eran capaces de conjugarse con otras bacterias residentes en el citoplasma celular (Lim *et al.*, 2008). Los autores de este trabajo ponen énfasis en una posible utilización de este tipo de bacterias para transferir ADN por conjugación a mitocondrias *in vivo*, es decir, desde dentro de la célula eucariota.

La conjugación es empleada en los laboratorios de biología molecular para introducir ADN en una bacteria deseada. Por otra parte, los componentes de un sistema conjugativo podrían ser utilizados como una herramienta biotecnológica para enviar ADN a diferentes tipos celulares (Llosa & de la Cruz, 2005).

### **1.1.2. Mecanismo general conjugativo**

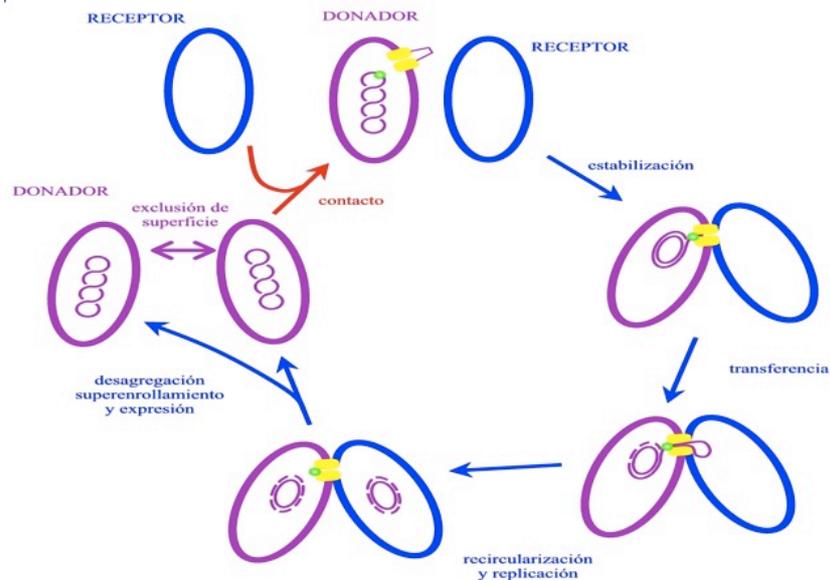
La conjugación puede considerarse como la suma de dos procesos: la replicación del ADN por círculo rodante (RCR) y la secreción de macromoléculas (Llosa *et al.*, 2002). En los plásmidos conjugativos la región *Dtr* (*DNA transfer replication*) codifica para los componentes del relaxosoma encargados del procesamiento del ADN durante la conjugación bacteriana y la proteína acopladora T4CP (*Type 4 Coupling Protein*). La relaxasa, uno de los componentes del relaxosoma, muestra similitud de secuencia con los sistemas de replicación por RCR (Waters & Guiney, 1993). La región *Mpf* (*Mating pair formation*), codifica proteínas plasmídicas que componen el sistema de transporte de macromoléculas a través de la membrana. Éstas son responsables del contacto físico entre células. Estas proteínas pertenecen a la familia de los sistemas de secreción Tipo IV (T4SS) (Christie, 2001). Ambos pasos, se conectan a través de la T4CP.

Podemos imaginar la maquinaria conjugativa de bacterias Gram negativas compuesta por tres módulos funcionales, que ensamblados constituyen una maquinaria operativa:

1. El sistema de secreción (T4SS), que constituye el canal de secreción del ADN
2. La proteína acopladora (T4CP), que pone en contacto el T4SS y el sustrato
3. El relaxosoma, responsable del procesamiento del sustrato a transferir: la relaxasa unida a una hebra de ADN.

Cada uno de ellos serán explicados en detalle en ésta y en las secciones 2 y 3.

El mecanismo general de conjugación está esquematizado en la **Figura 1**.



**Figura 1.** La célula donadora y la receptora contactan físicamente. Luego se inicia la transferencia del ADN plasmídico. Finalizada la transferencia y replicadas ambas hebras de ADN se obtienen dos células donadoras (Hernando, 2001).

1-La célula donadora y la receptora establecen un contacto físico mediante una estructura multiproteica sintetizada en la donadora en la que participan las proteínas de la región *Mpf*.

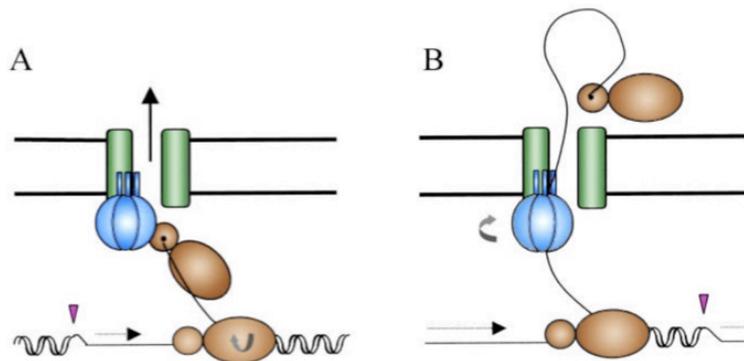
2. La proteína piloto o relaxasa se une a una región específica del ADN llamada origen de transferencia (*oriT*) y realiza un corte de sólo una hebra donde forma un enlace covalente con el extremo 5' de la misma. Posteriormente se produce una apertura del ADN, y el complejo relaxasa-ADN de cadena simple es transferido a la célula receptora a través del T4SS y con la participación de la T4CP.

3. El ADN cadena simple en la célula receptora es recircularizado y duplicado. Al final del proceso el ADN es superenrollado.

4. Los determinantes de exclusión de superficie de la bacteria receptora impiden que sea objeto de un nuevo proceso de conjugación por parte del mismo plásmido. Al final del proceso se obtienen dos células donadoras capaces de comenzar un nuevo ciclo de conjugación.

El modelo más aceptado para el transporte del ADN a través del T4SS es el denominado "shoot and pump" (disparo y bombeo) basado en el modelo del plásmido conjugativo R388 (Llosa *et al.*, 2002) (**Figura 2**). Este modelo propuso que la relaxasa unida covalentemente al extremo 5' de la cadena de T-ADN era el sustrato del T4SS.

Se considera que hay dos pasos en la movilización del ADN: A) En el primer paso se secreta la relaxasa, que sería el sustrato proteico reconocido por el T4SS; el ADN sería arrastrado por la proteína de una manera pasiva. B) En un segundo paso, catalizado por la T4CP, el ADN sería bombeado activamente a través del T4SS.



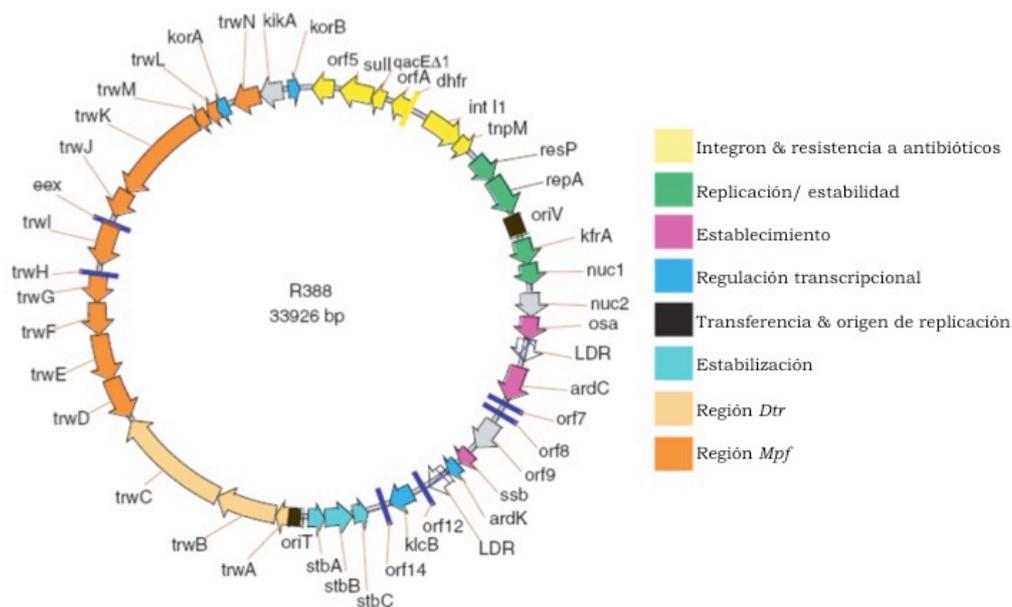
**Figura 2.** Representación del modelo "shoot and pump". Las líneas negras horizontales representan la membrana bacteriana, los cilindros verdes representan el T4SS. La relaxasa en marrón y en azul se representa la T4CP anclada a la membrana. El ADN se indica en una línea negra, mientras que la nueva hebra replicada de ADN está indicada por la línea negra. En rosa, el sitio de corte en el *oriT*. Las flechas curvadas representan un consumo de ATP. A) La T4CP une el relaxosoma con el T4SS; un monómero de la relaxasa unido covalentemente al ADN es el sustrato que se transporta a través del T4SS. B) la T4CP bombea el ADN desde la célula hacia el exterior (Llosa *et al.*, 2002).

Mientras el ADN es bombeado a través del T4SS, en la célula donadora la hebra de ADN que no ha sido cortada y transportada va siendo utilizada como molde en una replicación por círculo rodante (RCR). Se desconoce si la replicación

de la hebra transferida a la célula receptora ocurre a la vez que va entrando en la célula receptora o si la replicación ocurre tras la recircularización del ADN transferido.

### 1.1.3. El sistema conjugativo del plásmido R388

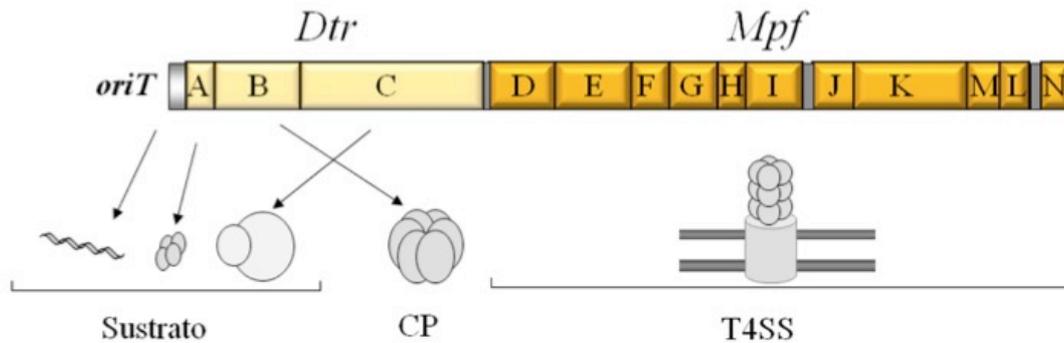
En esta tesis hemos utilizado como modelo el plásmido conjugativo R388, del grupo IncW (**Figura 3**). Éste es un grupo de plásmidos autotransmisibles pequeños (30-40 Kb). Generan un *pilus* conjugativo grueso y rígido, que les permite conjugarse en medio sólido, y tienen un amplio rango de huéspedes. R388 fue aislado originalmente en cepas de *E. coli* (Ward & Grinsted, 1982).



**Figura 3.** Representación del plásmido conjugativo R388. En código de color se señalan las regiones involucradas en las diferentes actividades (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006).

Casi la mitad del plásmido codifica genes implicados en la transferencia conjugativa. Dicha región, denominada *TraW*, se divide en dos regiones: la región *Dtr* y la región *Mpf* (**Figura 4**). La región *Dtr* comprende el *oriT* y los genes *trwA*, *trwB* y *trwC*, implicados en el metabolismo conjugativo del plásmido. La región *Mpf* contiene los genes que codifican las proteínas que forman el T4SS (TrwD-TrwN) y

sus reguladores. Ambas regiones pueden ser separadas y aportadas en *trans*, restituyéndose la capacidad de conjugación (Bolland *et al.*, 1990). El único elemento necesario en *cis* es el *oriT*.



**Figura 4.** Región de transferencia del plásmido R388. Relaxosoma: un segmento de ADN que contiene el *oriT*, la proteína accesoria TrwA y la relaxasa TrwC. T4CP: proteína acopladora TrwB. T4SS: se señalan con letras los diferentes componentes del complejo. Imagen adaptada de Llosa & de la Cruz, (2005).

### 1.1.3.1. La región *Mpf*

La región *Mpf* incluye los genes *trwD* a *trwN*, implicados en la formación del T4SS propiamente dicho, incluido el *pilus* conjugativo; el determinante de la exclusión de superficie (función que impide a una bacteria actuar como receptora de un plásmido conjugativo que ya tiene) y una serie de genes *kil-kor* de función reguladora y de estabilidad (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006). Todos los genes *trw* de esta región, salvo *trwN*, están implicados en la formación del *pilus* y son indispensables para la conjugación. Mutaciones en estos genes hacen que las células sean resistentes al fago PRD1, que reconoce este tipo de *pilus* (Bolland *et al.*, 1990).

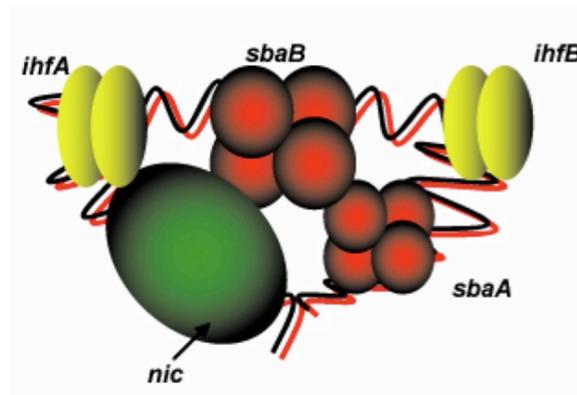
Se ha estudiado la similitud entre el T4SS de R388 y otros T4SS. Esta región puede intercambiarse por la región *Mpf* de plásmidos IncN (pCU1 o pKM101) para movilizar plásmidos con la región *Dtr* de R388. Sin embargo, los genes individuales de la región *Mpf* no son intercambiables entre ambos plásmidos. Lo que sugiere que hay una alta especificidad de reconocimiento entre las proteínas *Mpf* y que el reconocimiento del relaxosoma por el T4SS es más flexible (Bolland *et al.*, 1990,

Llosa *et al.*, 2003). El análisis bioquímico y estructural de los componentes del T4SS de R388 se ha limitado al estudio de TrwD y TrwK (secciones 1.2 y 1.5).

### 1.1.3.2. La región *Dtr*

Esta región de 5,2 kb abarca el *oriT* y el operón *trwABC*, que codifica las proteínas TrwA (proteína accesoria del relaxosoma), TrwB (T4CP), y TrwC (la relaxasa). Ensayos mutagénicos han demostrado que los genes *trwB* y *trwC* son indispensables para la conjugación de R388 (Llosa *et al.*, 1994) y la ausencia de *trwA* produce una disminución de la conjugación de  $10^5$  veces (Moncalián *et al.*, 1997).

Salvo TrwB, que se tratará en el siguiente apartado, el resto de integrantes de la región *Dtr* forman parte del relaxosoma, un complejo nucleoproteico que interviene en el procesamiento del DNA para su transferencia. La **Figura 5** esquematiza la arquitectura propuesta para el relaxosoma del plásmido R388 que está formado por el *oriT*, la relaxasa TrwC, la proteína accesoria TrwA, y el factor de integración IHF codificado por el huésped (Moncalián *et al.*, 1999b). Las proteínas TrwA y TrwC no pueden ser sustituidas por sus homólogas en los plásmidos estrechamente relacionados IncN (R46 y pKM101), lo que indica una alta especificidad en la interacción de éstas con el *oriT* (Llosa *et al.*, 1994b).



**Figura 5.** Arquitectura del relaxosoma del plásmido R388. TrwA está representada en rojo, IHF en amarillo y TrwC en verde. Imagen tomada de Moncalián *et al.*, (1999b)

**oriT**

El *oriT* es definido como la mínima secuencia requerida en una molécula de ADN para que sea transferida eficientemente por conjugación cuando el resto de los componentes están presentes en *trans*. El *oriT* de R388 fue inicialmente descrito como una secuencia de 402 pares de bases (Llosa *et al.*, 1991) y posteriormente delimitado a 330 pares de bases (pb) (César *et al.*, 2006). Contiene las características típicas de *oriTs*: secuencias ricas en A+T, un sitio *nic*, localizado en el nucleótido 176 (Llosa *et al.*, 1995), una secuencia consenso para la unión de IHF, y una serie de repeticiones directas e invertidas que incluyen los sitios de unión de las proteínas TrwA y TrwC (Moncalian *et al.*, 1997).

**TrwA.** Es una proteína de 121 aa (13 kDa) que tetrameriza en solución. Posee dos dominios funcionales, uno N-terminal involucrado en la unión con ADN y uno C-terminal responsable de la tetramerización (Moncalián & de la Cruz, 2004). La secuencia de una cremallera de leucinas podría estar involucrada en las interacciones proteína-proteína en la oligomerización. Debido a la conservación de una serie de residuos polares en el N-terminal, hallados también en la familia de proteínas ribbon-helix-helix (RHH), TrwA fue asignada como un miembro de la misma (Moncalián & de la Cruz, 2004).

TrwA se une específicamente al *oriT* del plásmido R388 en dos sitios, *sbaA* y *sbaB*. La afinidad por el sitio denominado *sbaA* es 10 veces mayor que por el sitio *sbaB*. La unión de TrwA a ambos sitios es importante para obtener altas frecuencias de conjugación. A través de esta unión TrwA lleva a cabo dos funciones en la conjugación del plásmido R388. Por una parte, es un represor transcripcional del operón *trwABC*, lo que se refleja en el hecho de que su sobreexpresión hace que disminuya la frecuencia de conjugación (Moncalian *et al.*, 1997). Por otra parte, aumenta la actividad de relajación de ADN superenrollado por TrwC y la actividad de corte o nicking sugiriendo evidencias directas de su rol en las reacciones de procesamiento del *oriT* (Moncalián *et al.*, 1997, Moncalián *et al.*, 1999b). Además estimula la actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70 *in vitro* (Tato *et al.*, 2007).

*In vivo* se ha observado que su presencia incrementa la recombinación sitio específica mediada por TrwC (César *et al.*, 2006) y la integración sitio específica en la célula receptora (Agúndez *et al.*, 2012).

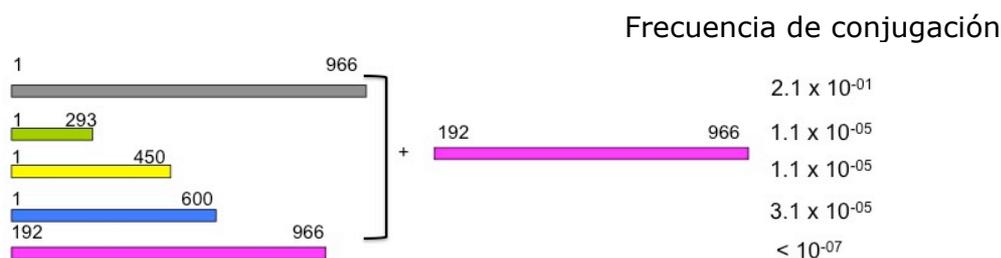
**TrwC.** Es la relaxasa responsable de iniciar y terminar el procesamiento del

ADN durante la conjugación del plásmido R388. Además, TrwC puede ser translocada por conjugación en ausencia de ADN. Dicha translocación depende de la presencia de la proteína acopladora TrwB (Draper *et al.*, 2005). Esta proteína ha sido incluida en la familia de relaxasas MOB<sub>F</sub> (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

Está compuesta por 966 aa, posee un peso molecular de 108 kDa y un punto isoeléctrico de pI=10 (Grandoso *et al.*, 1994). Estructuralmente, TrwC está compuesta por un dominio N-terminal con actividad relaxasa y otro C-terminal con actividad helicasa (Llosa *et al.*, 1996). En el proceso conjugativo, el dominio relaxasa produce el corte de cadena simple en el sitio *nic* contenido en el *oriT*, formando un enlace covalente con el extremo 5' del ADN cortado. El dominio helicasa desenrolla la cadena sencilla que va a ser transferida a la célula receptora en dirección 5'-3'. Se conoce la estructura 3D del dominio relaxasa (Guasch *et al.*, 2003) así como los residuos catalíticos (Y18, Y26) (Grandoso *et al.*, 2000).

El dominio helicasa de TrwC está localizado entre los aa 192-966. Contiene 7 motivos característicos de la familia de las helicasas de ADN (Matson *et al.*, 2001). También posee los motivos Walker A y Walker B, típicos de proteínas con actividad ATPasa. Su actividad helicasa es dependiente de ADN simple cadena y es unidireccional en dirección 5' -3'. La proteína forma dímeros en solución (Grandoso *et al.*, 1994). El posible dominio de dimerización podría localizarse entre los aa 472 al 966 (Llosa *et al.*, 1996). Un mutante de TrwC con una inserción de 24 aa en el motivo helicasa III tiene un efecto dominante negativo en conjugación, lo que sugiere que TrwC actúa en el proceso conjugativo como un multímero seguramente asociado a su función helicasa (Llosa *et al.*, 1996).

Los dominios funcionales de TrwC se representan en la **Figura 6**. Una delección en el C-terminal anula la conjugación, presumiblemente porque afecta a la actividad helicasa. No obstante, la co-expresión en la célula donadora de los fragmentos relaxasa (N348) y helicasa (C774), complementan funcionalmente, obteniéndose frecuencias de conjugación  $10^4$  veces menores que la proteína salvaje (Llosa *et al.*, 1996). Dado que el fragmento relaxasa N348 es inestable (César *et al.*, 2006) se han realizado las mismas complementaciones con fragmentos N-terminales de longitud variable. Como se indica en la Fig. 6, ninguna de las complementaciones resultaba en mayores frecuencias de conjugación (Agúndez, 2011).



**Figura 6.** Se representan los diferentes dominios funcionales de TrwC. En gris TrwC salvaje (gris); dominio relaxasa 1-293 (verde); 1-450 (amarillo); 1-600(azul); dominio helicasa 192-966 (fucsia). Datos tomados de Agúndez, 2010.

Por otra parte, TrwC es activa en la célula receptora, lo que sugiere un papel en la terminación de la conjugación (Draper *et al.*, 2005). Corroborando lo anterior, la expresión de anticuerpos anti-TrwC en la bacteria receptora inhibe el proceso conjugativo (Garcillan-Barcia *et al.*, 2007).

Además de su papel en conjugación, TrwC actúa como una recombinasa sitio específica (Llosa *et al.*, 1994b, César *et al.*, 2006). Una vez transferida por conjugación, TrwC es capaz de promover recombinación sitio específica entre dos secuencias de *oriT* codificadas en un plásmido residente en la célula receptora (Draper *et al.*, 2005).

Además, TrwC puede integrar de manera sitio específica una molécula de ADN que entra por conjugación, en un *oriT* presente en un plásmido localizado en la célula receptora (Draper *et al.*, 2005). Más aún, es capaz de catalizar la misma integración sitio-específica en secuencias humanas que se parecen al *oriT* (Agúndez *et al.*, 2012). Por último el dominio relaxasa de TrwC es capaz de alcanzar el núcleo de células humanas (Agúndez *et al.*, 2011). Las anteriores características, confieren a TrwC un alto potencial biotecnológico para ser utilizada como una integrasa sitio específica en ingeniería genómica de células humanas (Llosa *et al.*, 2012).

La proteína TrwB se detalla en la sección 1.3.

## 1.2. Los Sistemas de Secreción Tipo IV (T4SS)

Los T4SS constituyen una familia de transportadores capaces de secretar macromoléculas al exterior, a través de las membranas bacterianas (Álvarez-Martínez & Christie, 2009). Se encuentran ampliamente distribuidos entre diversos microorganismos; bacterias Gram negativas y positivas, bacterias sin pared celular, cianobacterias, bacteroides, firmicutes, actinobacteria y en arqueas (Guglielmini *et al.*, 2011). Han sido clasificados en dos categorías: T4SSa, aquellos relacionados con el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* (At) VirB/VirD4, o T4SSb, los relacionados con el sistema del plásmido conjugativo ColIb-P9 (Ding *et al.*, 2003).

Los T4SS poseen gran versatilidad en cuanto a la naturaleza del sustrato que transportan, es decir: ADN, proteínas, o complejos nucleoprotéicos, así como en cuanto al destino del sustrato transportado. El ADN puede ser movilizado entre bacterias por conjugación, transportado a/desde el medio, o enviado a células eucariotas. Por su parte, las proteínas pueden ser secretadas al medio extracelular o a la célula eucariota, bien desde el exterior, o una vez que la bacteria la ha infectado, en el caso de los patógenos intracelulares.

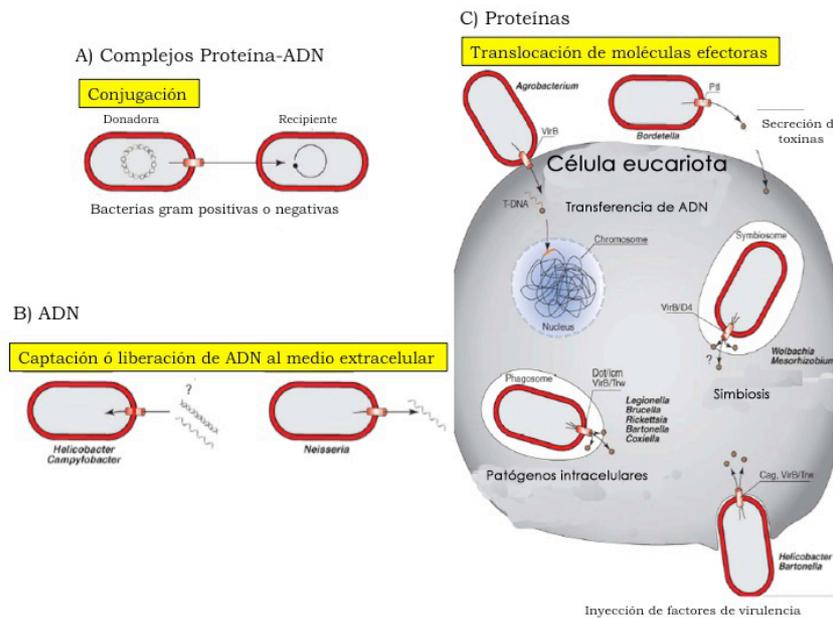
### 1.2.1. Clasificación de los T4SS de acuerdo a su función

Como consecuencia de esta gran versatilidad biológica, podemos clasificar los T4SS en tres grandes grupos:

1-Los T4SS implicados en conjugación forman parte de la maquinaria conjugativa de plásmidos que participan en la transferencia horizontal de ADN entre bacterias.

2-Los T4SS implicados en virulencia son empleados por una gran cantidad de patógenos para infectar células eucariotas. En muchos casos han demostrado ser los canales esenciales por los cuales son transportados los factores de virulencia o proteínas efectoras necesarios para establecerse dentro de la célula huésped.

3-Los T4SS que transportan ADN a/desde el medio, como en el caso del sistema ComB de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) que toma ADN del medio extracelular o el T4SS Tra de *Neisseria gonorrhoeae* que secreta ADN al medio extracelular. La **Figura 7** ilustra los distintos tipos de T4SS y su función.



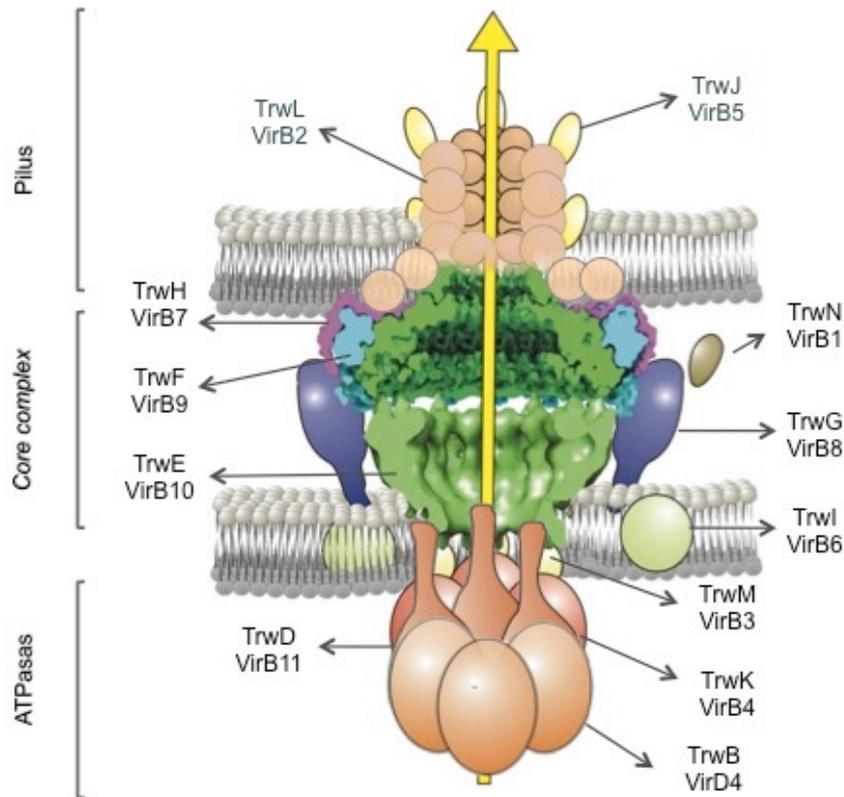
**Figura 7.** Funcionalidad y diferentes roles de distintos T4SS. Adaptada de (Backert & Meyer, 2006).

El T4SS de *At* es el más estudiado y conocido, y el que sirve de referencia para el estudio de los T4SS. El T-ADN sale de la bacteria por un mecanismo conjugativo y es exportado junto con proteínas efectoras a la célula vegetal para su transformación. Por lo tanto este T4SS está involucrado en la transferencia del ADN por conjugación y en la translocación de efectores proteicos. Otro T4SS que comparte estas características es el de *Legionella pneumophila* (*L. Pneumophila*).

### 1.2.2. Componentes de los T4SS

A pesar de las diferencias entre distintos tipos de T4SS en cuanto a la naturaleza de los sustratos secretados, su rol biológico, y el destino de los sustratos, las homologías entre los T4SS son muy grandes. La mayoría de los T4SS están compuestos por 11 proteínas, llamadas de VirB1 a VirB11, componentes del T4SS prototípico (VirB/VirD4) de *At*. Las homologías entre las familia de los T4SS están presentes en la organización genética, la topología de cada proteína en la membrana y la conservación de las interacciones proteicas.

Usaremos la nomenclatura VirB/VirD4 del T4SS prototipo de *At*, simultáneamente con la del sistema Trw del plásmido R388 por ser objeto de estudio en esta tesis (**Figura 8**).



**Figura 8.** Estructura hipotética de un T4SS. Se indican con la nomenclatura VirB/VirD4, los componentes del sistema prototípico de *At*, mientras que con Trw se indican a los componentes del T4SS del sistema conjugativo del plásmido R388. Imagen tomada de (de Paz, 2010).

Los componentes proteicos de un T4SS se pueden dividir en tres categorías:

1- Componentes energéticos: Son proteínas citoplasmáticas asociadas a la membrana interna (MI), con actividad ATPasa (VirB4/TrwK, VirB11/TrwD). En muchos sistemas existe una tercera ATPasa citoplasmática (VirD4/TrwB), conocida como T4CP. Hay quienes la incluyen como un componente del T4SS, aunque funciona como un nexo de unión entre el T4SS y el sustrato que exporta, por lo que puede considerarse un componente independiente (Llosa & de la Cruz, 2005).

2- *Core complex*: Compuesto por las proteínas más conservadas que forman el "core", el canal transmembrana propiamente dicho (VirB3/TrwM, VirB6/TrwI, VirB7/TrwH, VirB8/TrwG, VirB9/TrwH y VirB10/TrwE).

3- *Pilus*: Está localizado en la cara externa de la bacteria (VirB2/TrwL y VirB5/TrwJ). Este apéndice tiene como objetivo poner en contacto unas células con otras.

Muchos T4SS presentan también una proteína con actividad de transglicosilasa lítica (VirB1). La Fig. 8 muestra el modelo hipotético de un T4SS tipo.

#### 1.2.2.1. ATPasas citoplasmáticas

Como se mencionó antes, estas ATPasas son proteínas citoplasmáticas asociadas a la MI. Las proteínas TrwK/VirB4 y TrwD/VirB11 son los únicos componentes del T4SS de R388 que han sido caracterizados. Dado que son parte de este estudio, se describen a continuación. La ATPasa citoplasmática (VirD4/TrwB), conocida como proteína acopladora (T4CP), se describe en la sección 4.2.

**VirB4/TrwK.** Es la subunidad más grande (unos 815 aa de media) que constituye el T4SS. Su secuencia está altamente conservada y es la única proteína que posee secuencias homólogas en todos los T4SS conocidos (Álvarez-Martínez & Christie, 2009). Los datos sugieren que VirB4 aporta energía para el ensamblaje del T4SS o la actividad del mismo, siendo esencial para la biogénesis del *pilus* y la transferencia del sustrato (Berger & Christie, 1993, Fullner *et al.*, 1996, Wallden *et al.*, 2012).

TrwK contiene los dominios Walker A y Walker B y es capaz de hidrolizar ATP en ausencia de sus sustratos potenciales y de otros componentes del T4SS (Arechaga *et al.*, 2008). Cuando se eliminan las hélices- $\alpha$  del C-terminal se obtienen mutantes de la proteína que despliegan mayor actividad ATPasa. Estos fragmentos tendrían actividad autoregulatoria sobre la actividad ATPasa, puesto que su adición a la mezcla de hidrólisis producían una disminución de dicha actividad (Peña *et al.*, 2011). TrwK es capaz de unir, aunque con baja afinidad, ADN y une, preferentemente ADN con estructuras específicas (Peña *et al.*, 2012).

Por otra parte el dominio C-terminal tiene función biológica, ya que ninguno de los mutantes era capaz de complementar la conjugación del derivado conjugativo de R388 que presenta el transposón Tn5*tac1* en el gen de *trwK* (*virB4*). Estos mutantes tampoco presentaban dominancia negativa. Con lo cual los autores

proponen que los monómeros delecionados en su C-terminal no serían capaces de conformar la molécula hexamérica o un protómero delecionado no afectaría al hexámero (Peña *et al.*, 2011). Un estudio de estabilidad, indicó que TrwK es una de las primeras proteínas que se ensambla en un T4SS. Su ausencia afecta al componente del *pilus* TrwJ (VirB5), y a las ATPasas citoplasmáticas, TrwD y (VirB11) (de Paz, 2010).

Recientemente se ha cristalizado el dominio C-terminal de VirB4 de *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* (TpsVirB4CTD) y el de TraB (VirB4 de pKM101). Ambas presentan los residuos implicados en la unión e hidrólisis de nucleótidos, caracterizados para proteínas de la familia RecA con topología  $\alpha/\beta$  y actividad ATPasa. Para ambas se predice un estado oligomérico para la hidrólisis de nucleótidos (Wallden *et al.*, 2012). Sin embargo, en solución presentan un equilibrio monómero-dímero y la presencia de ADN de cadena simple o doble no estimula la oligomerización (Wallden *et al.*, 2012). Por microscopía electrónica de tinción negativa, se ha obtenido la estructura 3D de TraB unida al *core complex* pK(VirB7/VirB9/ VirB10). Sin embargo no se sabe con cual de los componentes interacciona. Aunque otros han observado interacción con VirB10, en este estudio se sugiere que habría una interacción más extensa con VirB9 (Wallden *et al.*, 2012).

Finalmente al comparar estos homólogos de VirB4 (TpsVirB4CTD y TraB) con TrwK, encontramos diferencias significativas. Los primeros en las condiciones estudiadas no unen ADN, mientras que TrwK une, incluso, ADN con estructuras específicas. Los estudios de microscopía electrónica y reconstitución de estructura sugieren una forma hexamérica de la proteína (Peña *et al.*, 2012).

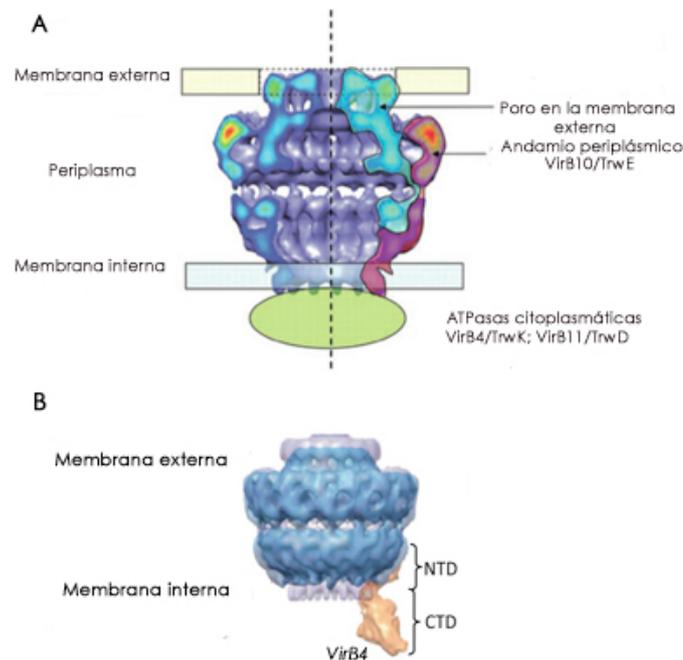
**VirB11/TrwD.** Homólogos de esta proteína han sido caracterizados, tanto a nivel estructural como desde el punto de vista funcional. Ésta es una proteína muy conservada que no sólo se encuentra en T4SS sino que también está presente en T2SS (Planet *et al.*, 2001). No tiene regiones transmembrana evidentes, pero está asociada a la membrana interna. El homólogo de VirB11 HP0525 de *H. pylori* fue el primer componente del T4SS cuya estructura se resolvió por rayos X (Yeo *et al.*, 2000), revelando la naturaleza hexamérica de la proteína, con una cámara central que se encuentra abierta en un extremo y cerrada en el otro. La distribución de las cargas parecen indicar que una de las caras de la proteína puede asociarse con la

membrana interna, y se cree que la hidrólisis de ATP abre y cierra la cámara central permitiendo la translocación del sustrato.

Se ha demostrado la actividad ATPasa de los homólogos TrwD (VirB11) de R388 y TrbB de RP4, actividad estimulada por la presencia de fosfolípidos en la reacción, sugiriendo que se energiza en contacto con la membrana (Krause *et al.*, 2000a, 2000b, Machón *et al.*, 2002). Recientemente ha sido publicado que concentraciones fisiológicas de magnesio disminuyen el consumo de ATP por TrwD. Se ha encontrado que este ión induce cambios conformacionales en la proteína que genera una enzima más rígida y menos accesible, lo que abre el panorama a nuevos mecanismos catalíticos de esta superfamilia de ATPasas (Ripoll-Rozada *et al.*, 2012). Análisis de ciertas variantes de VirB11 de *At* indican que la proteína es requerida tanto para la translocación del sustrato (Cascales & Christie, 2004a) como para el ensamblaje del T4SS (Sagulenko *et al.*, 2001a). Además, en este estudio, se vio que ciertos mutantes de VirB11 son defectivos únicamente en la formación del *T-pilus* o en la transferencia del sustrato, indicando que ambas funciones pueden ser independientes.

#### **1.2.2.2. Core complex**

Los primeros trabajos bioquímicos y genéticos indicaron que existían múltiples interacciones entre los distintos componentes del T4SS en diferentes sistemas conjugativos. Sin embargo, en los últimos años, el conocimiento de esta estructura ha aumentado de forma considerable. La resolución por crio-electrónica de la estructura del *core-complex* -VirB7-VirB9-VirB10- (Fronzes *et al.*, 2009), junto con la resolución de la estructura cristalina del complejo formado en la membrana externa por la proteína VirB10 (Chandran *et al.*, 2009) (**Figura 9 A**) y recientemente la obtención de la estructura 3D de la ATPasa citoplasmática VirB4 interactuando con el *core complex* (Wallden *et al.*, 2012) (Fig. 7B) han sido un gran avance para comprender la arquitectura del canal del T4SS y crear un modelo funcional de secreción (Llosa *et al.*, 2009) .



**Figura 9.** A) Estructura del *core complex* obtenida por microscopía crio-electrónica, imagen adaptada de Fronzes y col, (2009). B) Superposición de la tinción negativa de la estructura del *core complex* pk-VirB4 (en azul) y la estructura obtenida por microscopía crioeléctrica del complejo solo (en gris), imagen adaptada de Wallden y col, (2012)

### 1.2.2.3. Proteínas formadoras del *pilus*

**VirB2/TrwL.** Es una proteína pequeña e hidrofóbica, conocida como pilina. Es el componente mayoritario del *pilus* del T4SS (Jakubowski *et al.*, 2005, Lai & Kado, 1998).

Se cree que el T-*pilus* de *At* puede iniciar el contacto con las células de la planta. Se han identificado posibles receptores de las células vegetales buscando proteínas de *Arabidopsis thaliana* que se unieran a VirB2 mediante la técnica de dos híbridos en levaduras (Hwang & Gelvin, 2004). En *At* durante la transferencia del sustrato el T-ADN no establece contacto con VirB10, la proteína que sirve como canal de secreción al medio extracelular, por lo que se ha propuesto que VirB2 recubriría el canal interno de VirB10 (Cascales & Christie, 2004a, Chandran *et al.*, 2009).

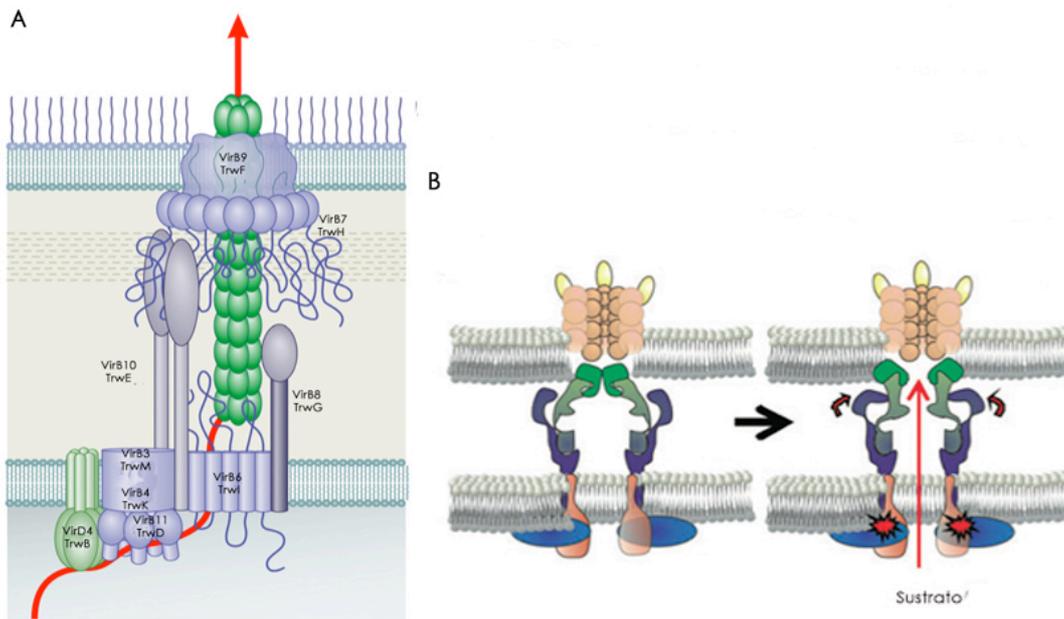
En el caso de *Brucella*, mediante ensayos de dos híbridos se ha demostrado que VirB2 interacciona con la proteína de superficie CD98, sugiriendo que VirB2

juega un papel importante en la unión del *pilus* a la superficie de la célula huésped (Llosa *et al.*, 2009).

**VirB5/TrwJ.** VirB5 es considerado el componente minoritario de *pilus*. Es exportada hacia el periplasma, donde interacciona con VirB2 (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a,b, Yuan *et al.*, 2005). Su posición exacta en la estructura no está del todo clara, pero los estudios sugieren que se localiza en la punta del *pilus* (Aly & Baron, 2007). Su función más probable es la de adhesina, permitiendo el contacto con las células receptoras. En *Bartonella henselae* (*Bh*), VirB5 jugaría un rol importante en mediar la interacción con la célula eucariota durante la infección (Dehio, 2004).

### 1.2.3. Ruta de translocación del sustrato

La ruta de translocación de ADN a través del T4SS fue descrita gracias a la técnica de TrIP (*transfer DNA immunoprecipitation*), como una sucesión ordenada de contactos en el tiempo y en el espacio entre el sustrato transferido y los componentes del propio T4SS (Cascales & Christie, 2004a). El sustrato haría un contacto inicial con las ATPasas citoplasmáticas VirD4 y VirB11, luego con VirB6/VirB8 localizadas en la membrana interna y el espacio periplásmico y finalmente con VirB9/VirB2, mientras es transferido. Los demás componentes no interaccionarían con el sustrato, aunque son requeridos para la transferencia en los distintos pasos (Atmakuri *et al.*, 2004, Cascales & Christie, 2004a). La proteína VirB10, la cual se encuentra anclada tanto a la MI como membrana externa (ME) (Chandran *et al.*, 2009, Fronzes *et al.*, 2009), sería capaz actuar como sensor de la utilización de ATP por parte de las ATPasas citoplasmáticas VirB4, VirB11 y VirD4. Como resultado se producirían en ella cambios conformacionales, necesarios para la translocación del sustrato hasta los componentes, VirB9 y VirB2, que se encuentran más arriba, en la estructura representada en la **Figura 10 A** (Cascales & Christie, 2004b, Atmakuri *et al.*, 2004).

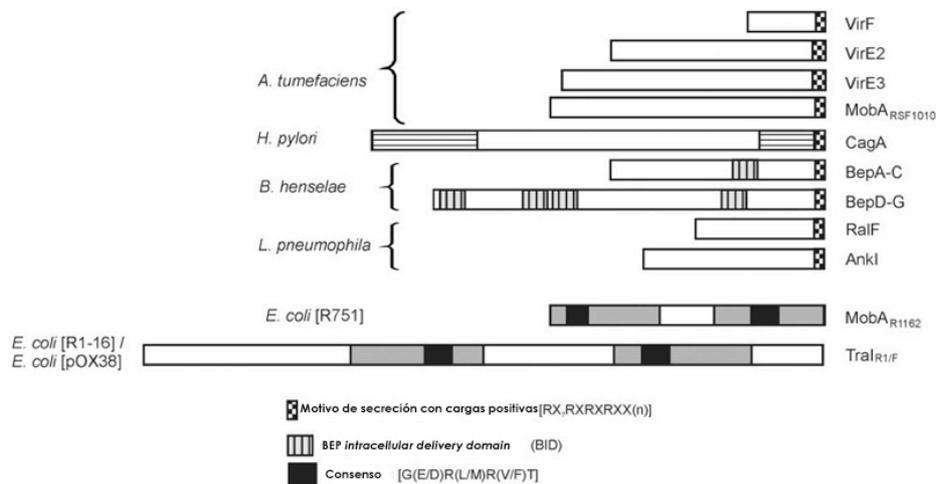


**Figura 10.** A) Se representa en rojo la ruta de translocación del sustrato. El esquema fue realizado basándose en los ensayos de "cross-linking" con los componentes del sistema VirB de *At* (Cascales & Christie, 2004a). Imagen adaptada de (Álvarez-Martínez & Christie, 2009). B) Modelo funcional de un T4SS. Tras el contacto con el sustrato en el citoplasma, se produce una apertura del canal en respuesta al estímulo (Llosa et al., 2009).

#### 1.2.4. Señales de translocación (TS) del sustrato

Para el reconocimiento por su T4SS específico, los sustratos proteicos deben contener una señal de reconocimiento, que llamaremos TS (*translocation signal*). Aunque se conocen algunas señales de translocación, no está claro de qué forma actúan, y qué elemento del T4SS las reconoce.

Los datos disponibles sugieren que varias son las características que contribuyen al proceso de reconocimiento; lo más frecuente es la existencia de una TS en el C-terminal, aunque también hay TS internas, y se han detectado proteínas accesorias que ayudan al reconocimiento (*chaperone-like*). En la **Figura 11** se muestran algunos ejemplos de las TS de diferentes sistemas que han sido determinadas experimentalmente en sustratos efectores o relaxasas conjugativas.



**Figura 11.** TS de T4SS determinadas experimentalmente. Se indican las características de las señales de reconocimiento y translocación. En gris, TS independientes; líneas en verticales, TS bipartitas (BID). En el caso de CagA las líneas horizontales indican regiones de interacción con proteínas *partners*. Figura adaptada de (Lang *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.1. TS en efectores de T4SS involucrados en patogenicidad

##### TS en el C-terminal

T4SS VirB/VirD4. Las proteínas translocadas por *At* y *Agrobacterium rhizogenes* presentan una región con motivos de arginina-prolina-arginina (Vergunst *et al.*, 2005). La sustitución de estas argininas reveló su importancia en el proceso de reconocimiento, en el que el carácter hidrofílico y las cargas netas positivas determinan la señal de secreción (Vergunst *et al.*, 2005). Estas características se encuentran también en relaxasas de plásmidos conjugativos, en sustratos de los T4SS de *Bh* (Schulein *et al.*, 2005) y *Brucella spp* (Marchesini *et al.*, 2011).

El T4SS Dot/Icm de *L. Pneumophila*, transporta sustratos endógenos y heterólogos que poseen una TS terminal menor de 115 aa (Luo & Isberg, 2004, Voth *et al.*, 2009). Un sustrato endógeno es el efector RalF, cuyos 20 residuos C-terminales son imprescindibles y suficientes para su transporte. Un residuo hidrofóbico (leucina) en la posición 3 del C-terminal demostró ser relevante para su translocación (Nagai & Roy, 2003). Además, los 20 residuos C-terminales son suficientes para su translocación por el T4SS de *At* (Vergunst *et al.*, 2005).

En cuanto a sustratos heterólogos secretados por el Dot/Icm T4SS de *L.*

*pneumophila* encontramos a los de *Coxiella burnetii* (Voth *et al.*, 2009) y a los de *Brucella spp* (de Jong *et al.*, 2008). Por otro lado las proteínas heterólogas pueden ser translocadas a través del T4SS Dot/Icm cuando la señal correspondiente es añadida en el C-terminal (Nagai *et al.*, 2005, Schulein *et al.*, 2005).

### **TS internas**

Algunos sustratos de diferentes T4SSp presentan una estructura modular compuesta de TS bipartitas (Fig. 11). Un ejemplo de ellos son los efectores de *Bartonella*, BepA-G. Estos poseen una TS compuesta por cargas positivas en el C-terminal y una o más copias de una segunda señal conservada intrínseca llamada BID (*Bep intracellular delivery*) (Schulein *et al.*, 2005).

Otro ejemplo es el efector de *H. pylori* CagA que posee en su C-terminal 20 aa (aa) con carga positiva adyacentes a un dominio de interacción con su chaperona CagF (Hohlfeld *et al.*, 2006, Pattis *et al.*, 2007). Estas características son necesarias pero no suficientes para el reconocimiento, puesto que CagA también requiere una secuencia en su región N-terminal, sugiriendo que ambos extremos de la proteína son necesarios para su transporte a través del T4SS (Hohlfeld *et al.*, 2006, Jimenez-Soto *et al.*, 2009).

### **Chaperoninas involucradas en la translocación**

En *At* también se han descubierto chaperoninas importantes para la translocación de proteínas a través de su T4SS. VirE1 es una chaperona que se une a VirE2 (que permanece unido al ADN) y facilita el reconocimiento de ésta por VirD4 (Vergunst *et al.*, 2003). La función de VirE1 probablemente sea mantener a VirE2 de una manera desdoblada mientras sigue unida al ADN, conservando su estado competente de secreción (Duckely *et al.*, 2005).

Por otra parte, las proteínas IcmS e IcmW forman complejos con el efector Ralf de *L. pneumophila* fuera de la región C-terminal y probablemente antes de que la proteína se pliegue completamente. Por lo tanto, IcmS e IcmW podrían estar actuando como las chaperoninas del T4SS, manteniendo a los efectores parcialmente desdoblados, y facilitando así el reconocimiento de la señal de secreción (Cambronne & Roy, 2007).

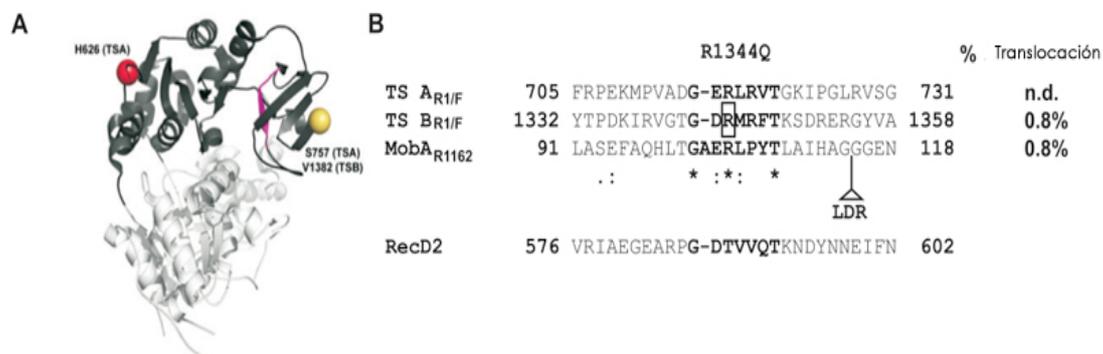
### 1.2.4.2. TS de relaxasas

Mientras que algunas relaxasas son solo sustrato de sus respectivos T4SS conjugativos, otras relaxasas en especial las codificadas en plásmidos IncQ de amplio rango de huésped, (R1162 y RSF1010), pueden ser translocadas por diferentes T4SS, los involucrados en la transferencia de ADN y/o los involucrados en patogenicidad. Las TS podrían localizarse todo a lo largo de la proteína (Parker & Meyer, 2007, Lang *et al.*, 2010).

#### TS de relaxasas para los T4SS conjugativos:

La proteína MobA del plásmido R1162 (Parker & Meyer, 2007), en teoría idéntica a MobA (RSF1010), contiene dos dominios funcionales, un dominio relaxasa N-terminal y un dominio primasa C-terminal. Cada una de las dos TS, sig1 y sig2, está asociada con uno de los dos dominios funcionales y no presentan ninguna similitud con las TS previamente identificadas para la translocación a través de los T4SS Dot/Icm o VirB/VirD4 (Fig. 11). El análisis mutagénico de las dos TS indicó que ambas señales eran funcionalmente independientes en la proteína salvaje, pero requerían de la presencia de la proteína accesoria MobB (Parker & Meyer, 2007).

Recientemente ha sido descrita la TS para la relaxasa TraI de los plásmidos F y R1 (TraI<sub>R1/F</sub>). Como se observa en la **Figura 12** aparecen dos regiones denominadas TSA y TSB, con una secuencia consenso [G(E/D)R(L/M)R(V/F)T].



**Figura 12.** A. Similitud de plegamiento para TSA/TSB con la estructura N-terminal de la helicasa RecD2 de *Deinococcus radiodurans*. Las regiones conservadas en TraI<sub>R1/F</sub> están

indicadas en negro. Las variantes aminoacídicas de TSA en R1 vs F (S757) y TSB de R1 vs F (V1382) colocalizan en amarillo. La segunda variante en el aa 626 en TSA en rojo representa el determinante de fidelidad para la translocación. En rosa los residuos conservados (G(E/D)R(L/M)R(V/F)) representados por una lámina beta . B. Secuencias consenso. Una inserción (LDR) TS en MobA<sub>R1162</sub> y una mutación en TSB<sub>R1/F</sub> disminuyen a niveles indetectables la translocación de la proteína. Figura tomada de Lang *et al.*, 2010

Estas TS comparten características con las ya determinadas sig1 y sig2 de la relaxasa MobA de R1162 (Parker & Meyer, 2007).

De manera similar a lo observado para MobA de R1162, la presencia de una sola TS en la proteína salvaje es suficiente para que sea translocada por el T4SS de F y R1 (Lang *et al.*, 2010). Las TS de TraI<sub>R1/F</sub> no han adquirido dependencia bipartita (como las TS de efectores patogénicos) y son el producto de una duplicación génica. Una copia intacta en la proteína salvaje es capaz de complementar los defectos en la translocación producidos por una mutación de una inserción en la segunda TS (Lang *et al.*, 2010).

La predicción de la estructura terciaria de TSA y TSB de TraI<sub>F/R1</sub> reveló similitud con la estructura del dominio N-terminal de la helicasa RecD2 de *Deinococcus radiodurans* (*D. Radiodurans*) (Fig. 10) (Lang *et al.*, 2010). El alineamiento de secuencia-estructura de TSA y TSB con RecD2 mostró un 10% de identidad de secuencia (20% de similitud). No obstante un grupo de residuos conservados se encontró que estaba presente en ambas TSA y TSB, los cuales a su vez estaban conservados en ambas sig1 y sig2 de MobA de R1162. Una inserción cerca de sig1 en MobA R1162 bloqueaba la translocación (Parker & Meyer, 2007). Similarmente, la mutación R1344Q en TSB de TraI<sub>R1/F</sub> disminuía significativamente la translocación (Lang *et al.*, 2010).

En este estudio además, se observó que aunque las TSA y TSB son muy similares en TraI de F y R1, el residuo L626 en TSA de TraI<sub>F</sub> vs. TraI<sub>R1</sub> no colocalizaba con el de la TSB. Por lo que es probable que ese residuo contribuya a la especificidad de reconocimiento en cada sistema conjugativo. Lo anterior fue demostrado después de realizar la mutación L626H en la TSA de TraI de F. Este cambio produjo un cambio en la fidelidad del sistema, puesto que ahora el mutante de TraI<sub>F</sub> era translocado a través del T4SS de R1 (Lang *et al.*, 2010) con un incremento de la frecuencia de translocación de 10 veces.

### **TS de relaxasas para T4SS involucrados en patogenicidad**

La translocación de la relaxasa TrA del plásmido pAtC58 de *At* requiere la presencia de una TS señal bipartita: dominios BID y una cola C-terminal con cargas positivas, para su translocación a través del sistema VirB/D4 de *B. henselae* (Schulein *et al.*, 2005). En contraste, para la relaxasa MobA de RSF1010, son suficientes los 50 aa C-terminales con cargas positivas para ser translocada a través del T4SS (Dot/Icm) de *L. Pneumophila* (Luo & Isberg, 2004) o del T4SS (VirB/VirD4) de *At* (Vergunst *et al.*, 2005).

Las relaxasas conjugativas, además de ser translocadas en forma independiente de ADN por T4SS patogénicos, son capaces de mediar transferencia de ADN a células eucariotas. El primer caso es el de la relaxasa Mob de un plásmido críptico (pBGR1) de *Bh*, la cual puede mediar la transferencia de ADN a través del sistema VirB/D4 T4SS a muy bajas frecuencias. Pero la adición en el C-terminal de la señal de secreción del sistema VirB/D4, BepD, incrementa significativamente la transferencia de ADN (Schröder *et al.*, 2011).

En segundo lugar la relaxasa TrwC de R388, además de mediar la transferencia de ADN por su propio T4SS durante la conjugación (Draper *et al.*, 2005), media la transferencia de un derivado de R388 dentro de células humanas en un proceso dependiente de ella misma y del sistema VirB/D4. Notoriamente TrwC no presenta ninguna de las señales de secreción descritas para el sistema VirB/D4 de *Bh*. El reclutamiento podría ocurrir por la propia T4CP TrwB. Por lo tanto, TrwC es un sustrato natural del ambos T4SS: VirB/D4 de *Bh* y Trw de R388 (Fernández-González *et al.*, 2011).

#### **1.2.5. Relación entre los T4SS conjugativos y los implicados en patogenicidad**

Son numerosas las bacterias patógenas que utilizan T4SS para infectar células de mamífero a través de la secreción de efectores que les permiten establecerse dentro de la célula. Como ya se ha mencionado, *At* utiliza su T4SS no sólo para transferir el T-DNA oncogénico, sino también para transferir proteínas efectoras a la célula vegetal (Christie & Vogel, 2000). Todos estos sistemas están relacionados ancestralmente con los T4SS conjugativos.

Entre estos T4SS involucrados en patogenicidad se encuentran los de muchos patógenos humanos, como por ejemplo, *Bordetella* o *H. pylori*. Este último utiliza el T4SS Cag para enviar la proteína CagA a células epiteliales gástricas humanas (Covacci *et al.*, 1999, Bagnoli *et al.*, 2005). Algunos patógenos intracelulares, entre los que se incluyen *L. pneumophila* (Segal & Shuman, 1999), *Brucella suis* (*Bs*) (O'Callaghan *et al.*, 1999), *Brucella abortus* (Sieira *et al.*, 2000) y *Bh* (Padmalayam *et al.*, 2000) utilizan T4SS para transferir proteínas efectoras.

#### **1.2.5.1. Similitud entre el T4SS (Trw) de *Bh* y el del plásmido conjugativo R388**

El patógeno intracelular *Bh* presenta dos T4SSp con implicaciones diferentes. El primero es el T4SS VirB que es necesario para la infección de las células endoteliales, que constituyen el nicho primario (Schmid *et al.*, 2004). El segundo es el T4SS Trw y es indispensable para la infección de su nicho secundario (los eritrocitos) (Seubert *et al.*, 2003b).

Focalizaremos la atención en este último por presentar una gran similitud con el T4SS del plásmido conjugativo R388, objeto de estudio en esta tesis (**Figura 13**). Además de la similitud de secuencia entre ambos Trw T4SS (hasta 80% de identidad en la secuencia aminoacídica en varios componentes individuales), los ensayos de complementación funcional de mutantes de R388 con los correspondientes genes *trw* de *Bartonella tribocorum* (*Bt*) mostraron que es factible el intercambio de algunos componentes (TrwH, TrwG, TrwF, TrwE, TrwD) (de Paz *et al.*, 2005, Seubert *et al.*, 2003b).

La principal diferencia entre ambos T4SS es la ausencia en el sistema Trw de *Bt* de la proteína acopladora (T4CP), TrwB en R388. Lo cual podría explicar la pérdida de la capacidad para translocar sustratos. Sin embargo, la ausencia de la T4CP también se observa en otros T4SSp, como el caso de *Brucella* y *B. pertussis*, dos patógenos que secretan efectores al medio intracelular (Burns, 2003).

Otra diferencia remarcable es la presencia de múltiples duplicaciones en tándem de secuencias génicas. Como se observa en la Fig. 13, estas duplicaciones afectan a los genes *trwL* (*virB2*), *trwJ* (*virB5*) *trwI* (*virB6*) y *trwH* (*virB7*). Los genes *trwI* (*virB6*) y *trwH* (*virB7*) codifican proteínas requeridas para la elongación y anclaje del *pilus* a la membrana externa respectivamente. En cuanto que las secuencias multicopia de los genes *trwL* (*virB2*) y *trwJ* (*virB5*), codifican variantes



### 1.3. Proteínas acopladoras de T4SS (T4CP)

Todos los T4SS implicado en la transferencia de ADN tienen asociada una T4CP que funciona como nexo entre el citoplasma y el canal formado por el T4SS. Por lo tanto su rol como proteína conectora es crucial en cuanto a especificidad y funcionalidad del aparato conjugativo (Gomis-Rüth *et al.*, 2002b).

#### 1.3.1. Generalidades de las T4CP

Entre las características comunes a las T4CP podemos citar que i) que son esenciales para la transferencia de ADN, ii) no están implicadas en las reacciones de procesamiento del ADN (Llosa *et al.*, 1995, Scheiffele *et al.*, 1995, Tinland *et al.*, 1995) iii) ni en la producción del pilus (Bolland *et al.*, 1990, Lai & Kado, 2000).

Estructuralmente, presentan un dominio transmembrana (TMD) y un dominio citoplasmático (CD). No obstante existe una subfamilia de T4CP en las que el TMD está ausente. Un representante de esta subfamilia en Gram negativa incluye la T4CP asociada con el T4SS de *Burkholderia cenocepacia* TraG<sub>BC</sub> (557) y, en Gram positivas Orf10 de *Streptococcus agalactiae* pIP501. En éstas, aguas arriba de la metionina inicial, se encuentra codificado un polipéptido en el que se predicen de 2 a 4 dominios transmembrana, los que conformarían con la proteína un complejo funcional (Álvarez-Martínez & Christie, 2009).

En el dominio citoplasmático de las T4CP se encuentran las cajas Walker A y Walker B descritas inicialmente para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la F1-ATPase (Walker *et al.*, 1982). La mutación en cualquiera de las cajas Walker anula la conjugación (Balzer *et al.*, 1994, Kumar & Das, 2002) y bloquea la transferencia del sustrato de *At* (Cascales & Christie, 2004a).

El extremo C-terminal presenta variaciones entre las diferentes T4CP, tanto en longitud como en secuencias, lo cual sugiere que sería una zona de reconocimiento específico y modulación de la actividad ATPasa a través de interacciones específicas, con el sustrato o con proteínas accesorias. De hecho se han obtenido mutantes de TraD<sub>F</sub> con cambios en la especificidad con su propio relaxosoma y de otros plásmidos movilizables, los cuales eran provocados por la pérdida de algunos aa en el C-terminal de la proteína. Por lo tanto, ha sido propuesto que el extremo C-terminal de TraD tiene un rol clave en el reconocimiento específico de su propio relaxosoma (Sastre *et al.*, 1998).

En base a su homología, las T4CP se han clasificado en varias familias, pero las más estudiadas son VirD4<sub>At</sub>, TrwB<sub>R388r</sub>, TraD<sub>F</sub> y TraG<sub>RP4</sub> (Álvarez-Martínez & Christie, 2009).

El modelo aceptado de acción de las T4CP es el de homo-hexámeros. Este modelo fue basado en varias observaciones como i) tendencia de varias T4CP purificadas a formar oligómeros (Hormaeche *et al.*, 2002), ii) la estructura cristalina de TrwB $\Delta$ N70 (Gomis-Rüth *et al.*, 2001) iii) el análisis de microscopía electrónica de la T4CP TrwB (Tato *et al.*, 2005) y el análisis mutagénico de TraD<sub>F</sub> (Haft *et al.*, 2007). Estos datos, sumados a la homología funcional y estructural con motores moleculares implicados en la translocación de ADN como las proteínas SpoIIIE y FstK (Bath *et al.*, 2000, Massey *et al.*, 2006), sugieren que las T4CP también funcionarían como motores moleculares bombeando la molécula de ADN al exterior de la bacteria, tal y como sugiere el modelo "shoot and pump" (Llosa *et al.*, 2002).

El término de proteína acopladora se acuñó tras obtenerse evidencias genéticas de que eran proteínas que debían interactuar tanto con el relaxosoma como con el T4SS (Cabezón *et al.*, 1997). Desde entonces, se han buscado las interacciones moleculares de las T4CP con los otros módulos funcionales de las maquinarias conjugativas de diversos sistemas.

A las T4CP se les han atribuido varias funciones. Por ello muchos trabajos se han centrado en diseccionar los dominios funcionales para establecer sus contactos, tanto en el N terminal como en el C-terminal. A su vez, la utilización de microscopía de fluorescencia ha permitido estudiar la localización de algunas T4CP.

A continuación se resume las interacciones de algunas T4CP mejor estudiadas:

**TraD.** Es la a T4CP de los plásmidos del grupo *F-like*. Su extremo C-terminal es fundamental para la especificidad en la interacción con el relaxosoma (Sastre *et al.*, 1998) a través de la interacción con TraM (Disque-Kochem & Dreiseikelmann, 1997, Beranek *et al.*, 2004, Lu *et al.*, 2008) y también para la translocación de la relaxasa TraI (Lang & Zechner, 2012). Usando una colección de mutantes al azar se ha demostrado que el dominio C-terminal interviene en la oligomerización de la proteína tanto como el N-terminal (Haft *et al.*, 2007).

**VirD4.** Es la T4CP del sistema VirB de *At*. Se ha observado que tanto el dominio periplasmático como una serie de residuos del dominio de unión a nucleótido (NBD), son necesarios para que VirD4 se localice en los polos de la bacteria, donde está presente el T4SS (Kumar & Das, 2002, Atmakuri *et al.*, 2004); en particular se observó la co-localización con el componente VirB6 (Jakubowski *et al.*, 2004). Más recientemente, su localización ha sido observada alrededor del perímetro celular, junto con componentes del T4SS y las proteínas sustratos del sistema (Aguilar *et al.*, 2010). La región transmembrana N-terminal no es necesaria para la interacción con su sustrato VirE2 (Atmakuri *et al.*, 2003).

**TraG<sub>R27</sub>.** Es la T4CP del plásmido R27. Se ha demostrado la interacción con su homólogo VirB10 (TrhB) (Gilmour *et al.*, 2003). Posteriormente, tras realizar un análisis mutagénico se determinó que ciertos residuos periplasmáticos eran de importancia para la interacción con el T4SS pero su mutación no abolía del todo la conjugación. TraG se localiza alrededor del perímetro celular (Gunton *et al.*, 2005).

**TraG<sub>RP4</sub>.** Es la T4CP del plásmido RP4. Ésta interacciona con su propia relaxasa TraI RP4 (Schröder *et al.*, 2002), siendo para ello necesaria la presencia del dominio N-terminal (Schröder & Lanka, 2003). Además TraG es capaz de interactuar con relaxasas heterologas de los plásmidos pBHR1 y pLV22a (Szpirer *et al.*, 2000, Thomas & Hecht, 2007).

**PcfC.** Es la T4CP de *Enterococcus faecalis*. En el caso de esta proteína, la eliminación del N-terminal provoca la pérdida de la capacidad de anclaje a la membrana, aunque no se ve afectada la interacción con los compuestos del relaxosoma (Chen *et al.*, 2008). Recientemente ha sido observado que PcfC es capaz de interactuar con ADN y además interacciona con PrgJ, el homólogo a VirB4 (Li *et al.*, 2012).

**TrwB.** Es la T4CP de R388. Se ha demostrado que la interacción de TrwB con TrwE (VirB10), un componente del *core complex* del T4SS involucra el dominio transmembrana (de Paz *et al.*, 2010), mientras que la interacción con los componentes del relaxosoma, TrwA y TrwC tienen lugar en el C-terminal de la proteína (Llosa *et al.*, 2003). TrwB se detalla en el apartado 4.2.

Por lo tanto, en general, podríamos decir que en las T4CP, la región N-terminal es importante para la interacción con el T4SS, la oligomerización de la proteína y la localización celular, mientras que la región C-terminal es necesaria

para la interacción con los componentes del relaxosoma y para la actividad ATPasa asociada al transporte del ADN.

Las T4CPs se encuentran distribuidas ampliamente entre los diferentes sistemas conjugativos, sin embargo su estudio *in vitro* ha sido y sigue siendo muy complicado por ser proteínas integrales de membrana. Actualmente solo el dominio citoplasmático de la T4CP TrwB, llamado TrwB $\Delta$ N70 ha sido cristalizado (Gomis R $\ddot{u}$ th *et al.*, 2001) y ha servido como referencia para el estudio de las T4CP en otros sistemas.

### **1.3.2. TrwB, la T4CP del plásmido R388**

TrwB es la T4CP del plásmido R388, encargada de poner en contacto el relaxosoma con el T4SS (Llosa *et al.*, 2003). Es el prototipo de proteína acopladora y ha sido incluida en la familia "VirD4-like" de proteínas acopladoras (Álvarez-Martínez & Christie, 2009). TrwB, es una proteína básica (pI=10) integral de membrana, presenta un dominio transmembrana y uno citosólico. Posee 507 aa y un peso molecular de 56 KDa. Además presenta las cajas Walker A y B. Una mutación en el Walker A (K136T) anula la conjugación (Moncalián *et al.*, 1999a). Además de ser indispensable para la transferencia de ADN, es requerida para la transferencia de la relaxasa TrwC en ausencia de transporte de ADN (Draper *et al.*, 2005).

Los 70 residuos del extremo N-terminal forman el dominio de transmembrana (TMD). Éste consiste en un pequeño dominio citosólico y dos hélices hidrofóbicas conectadas por un *loop* corto periplásmico que la mantienen anclada a la membrana (Gomis-R $\ddot{u}$ th *et al.*, 2002b). Sin embargo la función de la región transmembrana no es meramente de anclaje. Éste dominio es indispensable para su función *in vivo*, ya que su delección anula completamente la conjugación (Moncalián *et al.*, 1999a).

Estudios bioquímicos han demostrado que el TMD tiene un rol importante sobre la actividad, estructura y estabilidad de la proteína. Éste sería fundamental para la dinámica *in vivo* del equilibrio monómero-hexámero, puesto que solo la proteína salvaje y no el dominio citoplasmático, TrwB $\Delta$ N70, es capaz de oligomerizar en solución (Hormaeche *et al.*, 2002). La presencia del TMD otorga estabilidad térmica a la proteína (Hormaeche *et al.*, 2004). Respecto a la unión de nucleótidos trifosfatos (NTP), TrwB presenta una preferencia por purinas frente a

pirimidinas, mientras que la proteína truncada TrwB $\Delta$ N70 no presenta ninguna preferencia (Hormaeche *et al.*, 2006). Simulando la situación real en la célula, TrwB fue reconstituida en una bicapa lipídica. En estas condiciones la proteína salvaje era selectiva para la unión a ATP y la afinidad por el nucleótido era incrementada frente a la obtenida con la proteína purificada en detergentes (Vecino *et al.*, 2010). TrwB reconstituida es más compacta (menos accesible a proteasas) y más estable frente a cambios térmicos que la forma soluble (Vecino *et al.*, 2011). Un mutante de TrwB, al cual se le ha deletado una de las dos hélices- $\alpha$  del dominio transmembrana (TrwB $\Delta$ N50), presenta un cambio en la estructura secundaria del dominio citosólico. También muestra un cambio en la orientación del mismo al ser insertado en la bicapa lipídica. Éste, al contrario de lo que ocurre con la proteína salvaje, se orientaba hacia el interior de la vesícula (Vecino *et al.*, 2012).

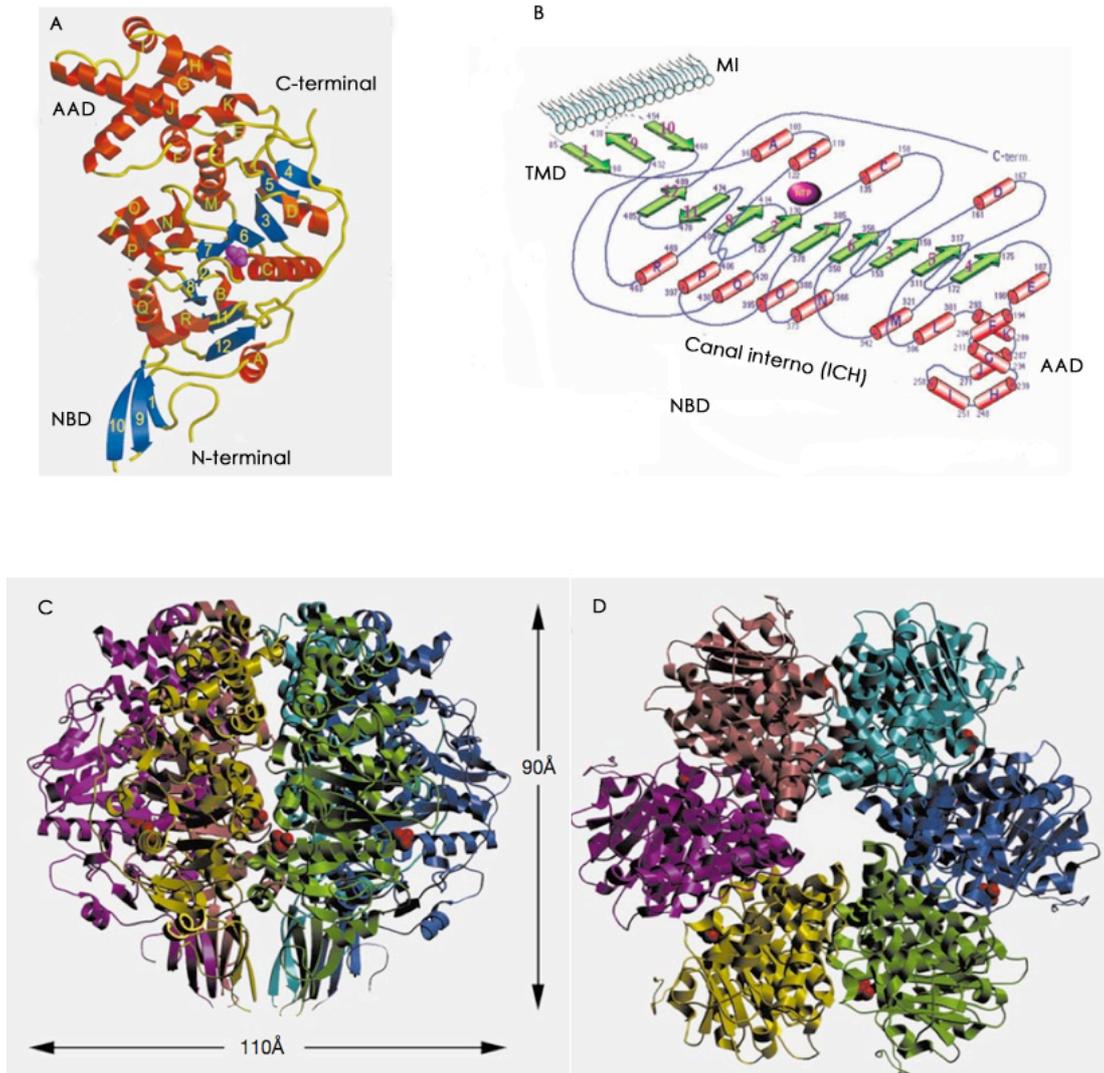
Todos estos datos sugieren que el dominio transmembrana de TrwB y la propia membrana jugarían un rol esencial en la función biológica de TrwB regulando su actividad. Se ha sugerido que el dominio transmembrana tendría un mecanismo de control de apertura y cierre del poro central formado por el hexámero de TrwB (Vecino *et al.*, 2010,2011).

A pesar de las diferencias entre la forma soluble y reconstituida de TrwB, ninguna de las dos ha mostrado hasta el momento actividad ATPasa, lo cual sugiere la necesidad por parte de TrwB de interactuar con las proteínas de R388 para desplegar su completa actividad *in vitro* (Vecino *et al.*, 2010, 2011).

### 1.3.2.1. Estructura de TrwB $\Delta$ N70

Como proteína integral de membrana, los estudios *in vitro* presentan una dificultad añadida. Por ello se han eliminado los 70 residuos N-terminales dando lugar a la proteína TrwB $\Delta$ N70 (el dominio soluble). Como ya hemos mencionado, es de esta proteína de la cual se ha determinado hasta el momento la única estructura cristalina de una T4CP. Para obtener una representación completa de TrwB, el TMD ha sido modelado (Gomis-Rüth *et al.*, 2001, 2002b) (**Figura 14**).

La proteína ha sido cristalizada en dos conformaciones y en 4 estados: no ligada (cristal monocíclico), en complejos con análogos de NTP (ADPNP y GDPNP; cristales trigonales ), con ADP en presencia de iones magnesio y con aniones sulfatos, ambas forman cristales trigonales) (Gomis-Rüth *et al.*,2002b).



**Figura 14.** Estructura de TrwB $\Delta$ N70. A) Monómero de TrwB $\Delta$ N70. B) Representación en cintas de un monómero de TrwB anclado a la membrana interna. C y D) Vista lateral y citoplasmática del hexámero de TrwB $\Delta$ N70, respectivamente. Imagen adaptada de Gomis-Rüth y cols, (2001) y Gomis-Rüth y cols, (2002b).

TrwB $\Delta$ N70 consiste en un hexámero que forma una estructura casi esférica. Cada monómero está compuesto de dos dominios principales: el dominio de unión a nucleótidos (NBD) y un dominio todo alfa (AAD) (Fig. 14, A). El dominio NBD tiene una topología  $\alpha/\beta$ , similar al encontrado en la familia de proteínas RecA/AAA+ (helicadas hexaméricas, complejo F<sub>1</sub> sintasa, etc.). En este dominio una gran extensión queda expuesta al canal interno. En ésta se encuentran residuos básicos que por su carga podrían estar involucrados en la unión al ADN (Fig. 14, B).

El dominio AAD se encuentra enteramente en el citoplasma de la bacteria y presenta homología con la región N-terminal de la recombinasa sitio específica XerD (Gomis-Rüth et al., 2002b). También presenta homología con 40 aa del dominio de unión a ADN de la proteína TraM, componente del relaxosoma de plásmidos tipo F y que interacciona con su T4CP, TraD (Lu et al., 2008).

El hexámero de TrwB $\Delta$ N70 tiene una dimensión de 110 Å en diámetro y 90 Å de altura. El canal interno va desde el citosol (formado por el AAD) hasta la membrana (formado por el NBD) (Fig. 14 C) con un diámetro interno de unos 20 Å, suficiente para albergar ADN de cadena simple. La vista citoplasmática del poro central es la parte más estrecha del canal, que se encuentra tapado por un anillo de asparragina que restringen su diámetro a 8 Å. Si la hipótesis de que el ADN de cadena simple atraviesa el canal interno de TrwB es cierta, la estructura de la Fig. 14 D, representaría una conformación cerrada de la proteína (Gomis-Ruth et al., 2001; Gomis-Ruth et al., 2002).

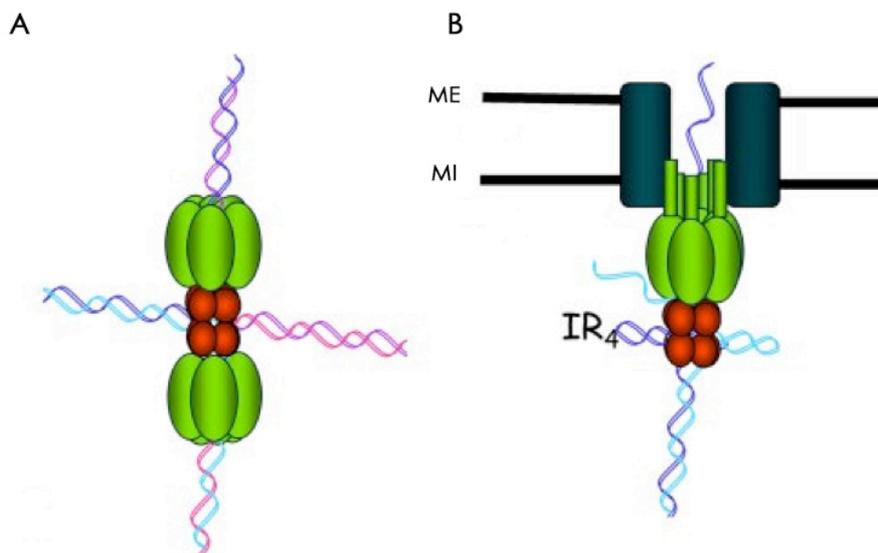
### 1.3.2.2. Análisis *in vitro* de TrwB $\Delta$ N70

TrwB $\Delta$ N70 ha sido ampliamente caracterizada *in vitro*. La unión de TrwB $\Delta$ N70 al ADN de cadena simple y doble es inespecífica y provoca en éste un incremento de la superhelicidad negativa, independientemente de la unión de ATP (Moncalián et al., 1999a). Recientemente se ha observado que TrwB $\Delta$ N70 une sustratos con estructuras específicas (Matilla et al., 2011). Además es capaz de incrementar la actividad relaxasa de TrwC *in vitro* (Moncalián et al., 1999a).

TrwB $\Delta$ N70 es una ATPasa dependiente de ADN y presenta cooperatividad positiva para ATP en presencia de ADN, con al menos 3 sitios catalíticos involucrados, revelando un estado oligomérico (Tato et al., 2005). La actividad ATPasa es estimulada por sustratos tanto de ADN de simple como de doble cadena (Tato et al., 2005, Tato et al., 2007), y por sustratos con estructuras G-cuadruplex (Matilla et al., 2011). Otro inductor de la actividad ATPasa es la proteína accesoria TrwA del plásmido R388, de la cual se ha determinado que es el dominio C-terminal el responsable de dicha estimulación (Tato et al., 2007), revelando una interacción específica entre ambas proteínas. Ésta, facilitaría la dinámica entre TrwB y el ADN durante el proceso conjugativo (Tato et al., 2007).

Se ha propuesto que el sistema TrwA-TrwB, podría extrapolarse del modelo utilizado por otros motores moleculares como RuvA/RuvB, y así explicar la

interacción TrwA/TrwB durante la translocación de ADN (**Figura 15**) (Tato *et al.*, 2007). Este modelo predice que un tetrámero de TrwA se uniría a una repetición invertida en el *oriT* (IR<sub>4</sub>), y luego interaccionaría a través de su C-terminal con un monómero de TrwB anclado a la membrana promoviendo su oligomerización. IR<sub>4</sub>, al ser unida específicamente por TrwA, formaría una estructura cruciforme sobre el ADN. En este modelo también se explicaría la conexión entre el relaxosoma y el T4SS en la membrana. Una vez que ocurre el corte mediado por la relaxasa TrwC, TrwB bombearía el ADN hacia el exterior a través de la hidrólisis de ATP, como propone el modelo "shoot and pump" (Llosa *et al.*, 2002).



**Figura 15.** Modelo de ensamblaje de TrwB sobre el ADN mediado por TrwA. Éste modelo fue propuesto en base al sistema RuvA/RuvB mostrado en A. A) En rojo, RuvA tetramérica se muestra unida a un "Holliday junction". Cada subunidad facilita el ensamblaje de RuvB (Verde). B) En rojo TrwA tetramérica unida a la repetición invertida IR<sub>4</sub>. En verde se muestra el hexámero de TrwB anclado a la membrana interna (MI) donde ME representa la membrana externa. En ambos casos la oligomerización y el ensamblaje sobre el ADN estarían mediados por la interacción con los tetrámeros de TrwA o RuvA. Éstos unirían ADN de forma específica. RuvB acopla la hidrólisis de ATP al bombeo de ADN de cadena doble, mientras que durante la conjugación bacteriana se transporta un ADN de cadena simple. Figura tomada de Tato *et al.*, 2007.

### 1.3.2.3. Interacciones proteína-proteína de TrwB

Como se mencionó anteriormente, TrwB interacciona no sólo con el ADN sino también con las proteínas TrwA y TrwC, que forman parte del relaxosoma de R388 y con TrwE, el homólogo a VirB10, componente del T4SS (Llosa *et al.*, 2003).

Por otra parte, las T4CP pueden ser funcionalmente intercambiables hasta cierto punto. Mientras que son muy específicas para el reclutamiento del sustrato, la interacción con el T4SS es "flexible". Es decir, diferentes sistemas conjugativos pueden emplear distintos T4SS para que la transferencia tenga lugar, siempre que la T4CP y el relaxosoma pertenezcan al mismo sistema (Llosa *et al.*, 2003). Esta flexibilidad está reflejada en la capacidad de una T4CP para interactuar con distintos homólogos de VirB10. En este sentido, TrwB interacciona con las proteínas homólogas a VirB10 TraF y PilX10, de los plásmidos conjugativos pKM101 y R6K, respectivamente (Llosa *et al.*, 2003), observándose una relación directa entre la fuerza de interacción de TrwB con la homóloga de VirB10 y la eficiencia en la movilización del derivado de R388 a través del T4SS correspondiente (Llosa *et al.*, 2003).

También se ha demostrado que TrwB es capaz de interactuar con homólogos de TrwE (VirB10) de T4SS implicados en virulencia como los de *At*, *Bs* y el homólogo de VirB10 del sistema Trw de *Bt* (TrwE) (de Paz *et al.*, 2005). Ésta última además es una interacción funcional (de Paz, 2010) ya que se vio que TrwE de *Bt* puede sustituir a TrwE (R388) en conjugación. Estos datos sugieren que un sistema conjugativo como el de R388 pueda acoplarse a un T4SS implicado en patogenicidad (de Paz *et al.*, 2005).

### 1.3.2.4. Dominios funcionales de TrwB

La determinación de la estructura tridimensional de TrwB $\Delta$ N70 (Gomis-Rüth *et al.*, 2001) permitió diseñar una serie de mutantes puntuales en distintas regiones de la proteína construidos por mutagénesis dirigida, mutagénesis al azar, o por delección de varios residuos (de Paz *et al.*, 2010). La localización de las mutaciones se representa en la **Figura 16**, C-F. Esta colección de mutantes puntuales ha permitido delimitar los dominios funcionales de esta proteína:

*Mutantes de la región de unión a nucleótidos (NBD).* Se seleccionaron los residuos en contacto directo con el nucleótido (Fig 16 C, D), presumiblemente

esenciales para la actividad ATPasa de TrwB. En la Fig. 16 C se muestra la posición del ATP/ADP entre dos monómeros de TrwB. Los residuos K136, D158, D356, E357, Q386 y Q390 de un monómero se combinan con los residuos R124 y R375 del otro monómero para interactuar con el nucleótido (Fig. 16 D).

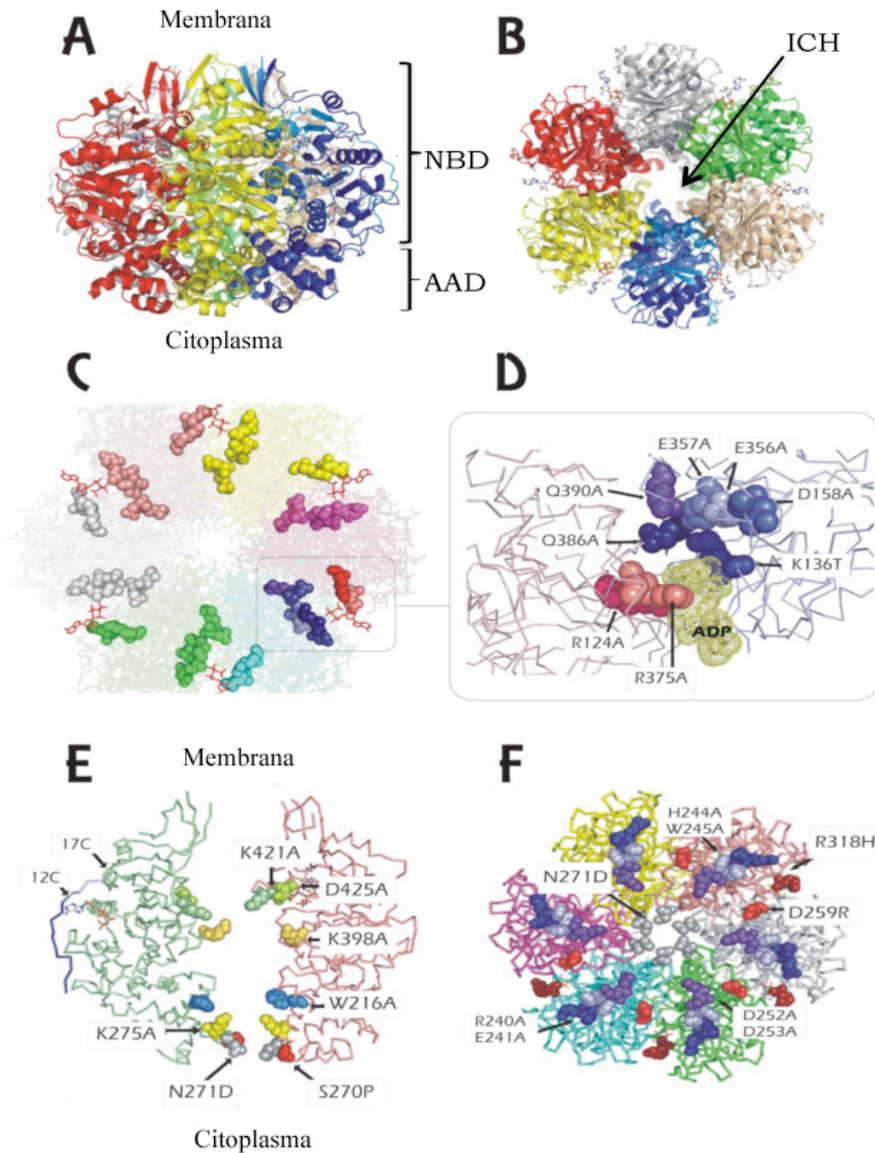
El mutante K136T fue previamente caracterizado (Moncalián *et al.*, 1999a; Tato *et al.*, 2005), comprobándose que es un mutante deficiente en conjugación, con dominancia negativa y sin actividad ATPasa.

*Mutantes del canal interno (ICH).* De acuerdo con el modelo "shoot and pump" de conjugación (Llosa *et al.*, 2002), la cara expuesta del canal interno del hexámero de TrwB es la región candidata que interactuaría con el ADN. Por su carga positiva, los residuos lisina expuestos podrían tener un papel fundamental en la interacción con el esqueleto del ADN, cargado negativamente. Por lo tanto, se mutaron a alanina los residuos K275, K398 y K421. El residuo N271 puede cerrar la entrada al ICH, por lo que también se mutó a asparagina. Además, el mutante W216A ya había sido previamente caracterizado. Este mutante era deficiente en conjugación, presentaba dominancia negativa *in vivo* e *in vitro* y no presentaba actividad ATPasa (Tato *et al.*, 2005) (Fig. 16 E).

*Mutantes en el dominio AAD.* Por su disposición en la superficie citoplasmática, éste podría ser el dominio que interactúa directamente con el sustrato. Se buscaron y mutaron residuos polares, expuestos y conservados en distintas T4CPs (Fig. 16 F).

*Deleciones del extremo C-terminal.* Ambas deleciones  $\Delta 17C$  y  $\Delta 12C$  fueron construidas porque forman una estructura que protege la región a la cual se une las moléculas de NTPs, como puede observarse en la Fig. 16 E.

*Mutantes al azar.* Por mutagénesis al azar y selección de mutantes  $\text{Tra}^-$ , también se obtuvieron los mutantes S270P y R318H. S270 está cercana a la entrada del ICH (Fig. 16 E), y R318 se encuentra en la superficie entre monómeros (Fig. 16 F).



**Figura 16.** Representación 3D de la estructura de TrwB $\Delta$ N70 unida a ADP (número de acceso pdb 1GKI), donde los residuos mutados son resaltados con esferas. **A.** Vista lateral del hexámero TrwB $\Delta$ N70. La región nombrada como NBD contiene el sitio de unión al nucleótido; la región denominada AAD es el dominio todo alfa (Gomis-Rüth *et al.*, 2001). **B.** Vista desde el citosol del hexámero TrwB $\Delta$ N70. El canal interno lo representamos como ICH. **C.** Misma vista que en B. Se resaltan los residuos mutados que se encuentran en el entorno de unión al nucleótido. **D.** Zoom de los residuos cercanos al lugar de unión de nucleótido. Los residuos mutados son representados por esferas y el ADP con esferas punteadas amarillas. **E.** Vista lateral de dos monómeros enfrentados de TrwB $\Delta$ N70, resaltando los residuos mutados en el canal interno. Las deleciones de la región C-terminal son representadas con flechas negras (17C y 12C respectivamente). **F.** Misma vista que en B, donde se resaltan los residuos mutados en la superficie citoplasmática, cercanos a la entrada del canal interno. Figura tomada de de Paz, (2010).

El efecto de las mutaciones fue comprobado *in vivo* en conjugación por complementación de un derivado de R388 deficiente en *trwB* (plásmido pSU1443). Puesto que TrwB sería funcional cuando conforma un hexámero, también fueron llevados a cabo ensayos de dominancia negativa para observar el efecto *in vivo* sobre la oligomerización de TrwB. En la **Tabla 1** se muestra un resumen de los resultados obtenidos en de Paz y cols, (2010).

**Tabla 1.** Estudio *in vivo* de la colección de mutantes puntuales de TrwB

Fenotipo de TrwB	Complementación con R388 <i>trwB</i> <sup>b</sup>	Dominancia negativa <sup>c</sup>
<b>Salvaje</b>	100	100
<b>Mutantes en el NBD</b>		
R124	2*	30
K136T	<0,01**	0,44*
D158A	<0,01**	0,18*
D356	<0,01**	0,09*
E357A	<0,01**	0,20*
R375A	<0,01**	0,1*
Q386A	<0,01**	0,002**
Q390	61	11
<b>Mutantes en el AAD</b>		
R240A E241A	200	32
H244 W245A	150	13
D252A D253A	150	19
D252R D253R D259R	<0,01**	9
<b>Mutantes en el ICH</b>		
W216A	<0,01**	0,0003**
N271D	40	28
K275A	200	129
R417S K398A	150	19
K421A D425A	20	13
<b>Delecciones en el C-</b>		

<b>terminal</b>		
$\Delta 17C$	0,01**	18
$\Delta 12C$	0,25	20
<b>Mutaciones al azar</b>		
S270P	<0,01**	0,3*
R318H	<0,01**	0,1*

**Tabla 1.** Efecto de los diferentes mutantes de TrwB. Las frecuencias menores a la proteína salvaje se indican como fenotipos leves: \* o fuertes: \*\*. <sup>b</sup> Frecuencias conjugativas de pSU1443 ( derivado de R388 con una inserción del transposón Tn5tac 1 en el gen de *trwB*) complementado en *trans* con plásmidos que codifican los mutantes de TrwB. <sup>c</sup> Las células donadoras fueron co-transformadas con pSU2007 (derivado de R388 Km<sup>R</sup>) y plásmidos codificaban para los diferentes mutantes de *trwB*. Tabla adaptada de Paz *et al.*, 2010.

El estudio de los dominios funcionales contenidos en el dominio citosólico determinó que los mutantes en contacto con el NTP o en su entorno abolían completamente la funcionalidad de TrwB en conjugación, y presentaban un fuerte efecto dominante negativo. Por otra parte las deleciones del C-terminal anulaban casi completamente la transferencia de ADN y también exhibían dominancia negativa. La dominancia negativa es típica de proteínas que forman complejos oligoméricos. Todo esto estaría indicando que tanto el NBD como el C-terminal estarían involucrados en la interacción entre monómeros (de Paz *et al.*, 2010).

Sin embargo, otro grupo de mutantes, no mostraba diferencia respecto a la proteína salvaje, en el ensayo de conjugación estándar, lo que resultaba sorprendente, considerando la localización de las mutaciones en la estructura de TrwB $\Delta$ N70: como los situados en la superficie del dominio todo-alfa (AAD) y en el interior del canal del hexámero (ICH).

Tras un análisis mutagénico aleatorio de la región trasmembrana de TrwB, y ensayos de doble híbrido para seleccionar la interacción con TrwE-*Bt* se detectaron mutantes que aumentaban la fuerza de dicha interacción, revelando la importancia de esta región en la interacción con los componentes del T4SS. En particular, se encontró que un residuo de prolina jugaría un papel importante, puesto que una mutación a serina cambiaría la estructura del TMD. Como resultado, aumentaba la fuerza de interacción aunque no cambiaba la frecuencia de conjugación (de Paz *et al.*, 2010).

#### 1.4. Motores moleculares hexaméricos de la familia RecA/AAA+

Los motores moleculares presentan dominios comunes y pertenecen a la familia de proteínas RecA-like/AAA+ con actividad ATPasa, (AAA, **ATPases Associated with various cellular Activities**) estas proteínas llevan a cabo diversas funciones dentro de la célula. Se caracterizan por la presencia de un dominio ASCE (*adicional strand conserved E family*), tradicionalmente conocido como dominio RecA-like y dominios adicionales, hélices- $\alpha$  y un dominio C-terminal variable (Wendler *et al.*, 2012). Dentro de esta familia se encuentran los motores moleculares que trabajan sobre ácidos nucleicos y/o proteínas.

Estas proteínas conforman complejos multiproteicos y son capaces de acoplar la energía obtenida a través de la hidrólisis de ATP, mientras translocan sus sustratos por un poro central. La homología estructural indica un antecesor común durante la evolución, aunque su homología de secuencia es muy baja. Dentro de esta familia se hallan proteínas con muy diversas funciones, como chaperonas moleculares, proteasas, helicasas, o ATPasas estimuladas por ácidos nucleicos (Iyer *et al.*, 2004). En éste último grupo encontramos motores moleculares que bombean ADN a través de compartimentos celulares (de membranas) y presentan similitudes estructurales con helicasas hexaméricas, como es el caso de la proteína acopladora TrwB (Gomis-Rüth *et al.*, 2001).

Los miembros de la familia RecA/AAA+ pueden trabajar sobre diferentes sustratos de ácidos nucleicos: ADN y ARN simple y doble cadena, incluso híbridos ADN-ARN. Por ejemplo: las helicasas hexaméricas trabajan sobre ADN de cadena simple, aunque para ello deben desunir la doble hebra de ADN en la región *ori*, ensamblarse como hexámero sobre una hebra y avanzar en forma unidireccional 3'-5' ó 5'-3'. De esta manera, mientras avanzan van apartando la otra hebra por fuera del hexámero. Algunos ejemplos son la helicasa del gen 4 (g4p) del fago T7 (Singleton *et al.*, 2000), SV40 large T antigen (Li *et al.*, 2003) o la helicasa E1 (Enemark & Joshua-Tor, 2006). Para ésta última se han resultado la estructuras cristalina conteniendo la molécula de ADN en el anillo hexamérico. Como ejemplos de motores que trabajan sobre híbridos ARN-ADN, podemos citar al factor Rho que cataliza la disociación de ARN mensajero del ADN genómico también para ésta se ha resuelto la estructura con ARN en el anillo hexamérico (Skordalakes & Berger, 2003).

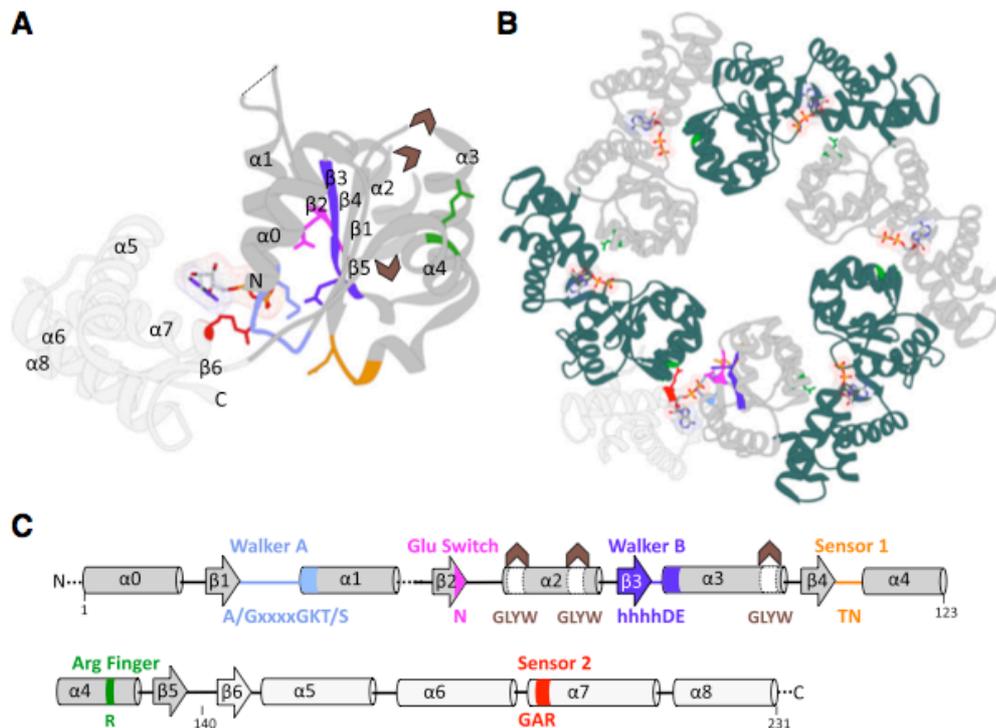
Además encontramos motores moleculares que actúan sobre ácidos nucleicos y los translocan entre células o compartimentos celulares. En este tipo de proteínas, es la molécula de ADN o ARN la que se desplaza respecto a la proteína. En el caso de los transportadores de ADN doble cadena encontramos a los bacterianos FtsK (Massey *et al.*, 2006) y SpoIIIE (Marquis *et al.*, 2008) o proteínas víricas como la proteína empaquetadora de ADN del fago phi 29 (Simpson *et al.*, 2000). Otras transportan ARN de cadena simple como la proteína empaquetadora P4 del bacteriofago de dsRNA (Mancini *et al.*, 2004).

La diversidad de la familia de RecA-like/AAA+ es tal, que recientemente se ha realizado una subclasificación en base a la topología del dominio RecA-like/AAA+ o el C-terminal (Wendler *et al.*, 2012).

#### **1.4.1 Hidrólisis del nucleótido trifosfato.**

Común a todas las proteínas de esta familia es que requieren el sitio de unión a nucleótido intacto para ser funcionales. El módulo ATPasa, está compuesto por un sitio de unión a nucleótido RecA-like o ASCE (Iyer *et al.*, 2004). Éste presenta láminas- $\beta$  centrales paralelas flanqueadas por hélices- $\alpha$  y en él se encuentran los motivos Walker A ( $\beta$ 1) y Walker B ( $\beta$ 3) (**Figura 17**). Los motivos Walker están separados por una inserción de laminas- $\beta$ . El motivo Walker A, también llamado *P-loop* (*phosphate-loop*) es responsable de coordinar el fosfato- $\gamma$  del ATP durante la reacción de hidrólisis. El motivo Walker B participa en la coordinación del ión magnesio y, conjuntamente con un residuo polar llamado "sensor 1", en el ataque nucleofílico de la molécula de agua presente en el centro activo del enzima. En el complejo oligomérico los loops están orientados hacia el poro central de la estructura ensamblada como anillo (Ammelburg *et al.*, 2006). Tras analizar 50 estructuras cristalinas de proteínas RecA/AAA+.-like se ha observado que el glutamato conservado en el motivo Walker B puede cambiar desde una conformación activa a una inactiva al unirse la molécula de ATP (Zhang & Wigley, 2008). En la conformación inactiva, el glutamato interaccionaría con la asparagina conservada de la lamina  $\beta$ -2 y solo se liberaría a través de la unión al sustrato. Este modelo explicaría la hidrólisis de ATP con la interacción del sustrato y explicaría la razón por la cual algunas ATPasas son activas completamente solo cuando los co-factores y el sustrato se encuentran unidos. Otra característica es la presencia de uno o más residuos de arginina en la hélice- $\alpha$ 4. Cuando el oligómero es activo estos residuos se localizan en la proximidad del fosfato- $\gamma$  de la molécula de ATP unida a

la subunidad vecina. Éstos son llamados “dedos de arginina” (*argining fingers*) y están involucrados en la interacción entre los monómeros. El C-terminal de las hélices- $\alpha 7$  alberga un residuo de arginina muy conservado, llamado “sensor 2” el cual contacta al nucleótido unido. Los dedos de arginina, (sensor 1 y 2) no están bien conservados en esta familia (Wendler *et al.*, 2012).



**Figura 17.** A) Módulo AAA+ ATPasa, dominio ASCE de la proteína *toLon* unida a ADP (PDB ID: 3K1J). El ASCE, se representa en gris oscuro, y el C-terminal en claro. Los elementos estructurales se indican en código de color igual que el de la estructura secundaria (C). Las flechas marrones indican la posición de los loops insertados en el poro y se indican las secuencias consenso de diferentes subgrupos de AAA+). B). Protómeros ensamblados. Se indican los dedos de arginina en verde, y los nucleótidos representados como “stick” (Wendler *et al.*, 2012).

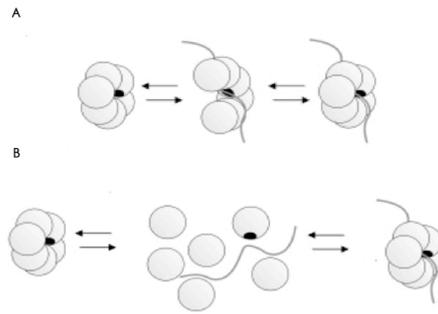
Aún no está claro qué residuos dentro del sitio activo son los responsables de transducir la señal al resto de la proteína. Tanto el sensor 1 como el 2 estarían involucrados en la transducción de la cascada de señales. Para el sensor 1 (Fig. 17) se cree que tras la unión del nucleótido se produciría una cascada de señales que culminarían con el desplazamiento de las láminas- $\beta$  del core central, respecto al centro activo (ASCE) (Wendler *et al.*, 2012). El sensor 2 (Fig.17), se insertaría en el centro activo del protómero contiguo. Éste reconocería la unión e hidrólisis de los

nucleótidos y transmitiría esta información al resto de la proteína mediante cambios conformacionales. Así se podría articular el movimiento del C-terminal y el dominio N-terminal de la proteína, así como de los protómeros adyacentes (Wendler *et al.*, 2012). Sin embargo, no es posible asignar todos los cambios conformacionales a un solo residuo y aún se desconoce el mecanismo exacto por el que se propagarían los cambios conformacionales desde el centro activo al resto de la proteína y entre las diferentes subunidades (Erzberger & Berger, 2006), por lo que existen muchas dudas sobre la forma en que tiene lugar la hidrólisis de nucleótidos y el modo en que se coordinan las subunidades para producir el trabajo. En este sentido, el motor molecular mejor estudiado es el complejo F1-ATPasa, con un solo modelo secuencial de hidrólisis llamado "*binding change mechanism*" (solo 3 de las 6 unidades participarían en la catálisis) (Boyer, 1993, Abrahams *et al.*, 1994). Para el caso de proteínas con 6 unidades catalíticas como el g4p del fago T7 se ha propuesto una variante a este modelo, en donde existen dos unidades unidas a ATP, dos a ADP y dos libres (Singleton *et al.*, 2000).

#### **1.4.2. Unión al sustrato y estado oligomérico**

En general, la unión de los motores moleculares al sustrato no requiere la hidrólisis de ATP. Dado que solo se encuentra un dominio RecA/AAA+ por cadena polipeptídica y la unión de los nucleótidos tiene lugar en la interfase entre estos dos dominios, las proteínas presentan actividad ATPasa solo cuando conforman la unidad oligomérica funcional.

Para el caso de las helicasas y motores que translocan ADN, se postula que la unión ocurre en el canal interno de la proteína (Egelman *et al.*, 1995, Egelman, 2001). Para que la unión tenga lugar, el oligómero debe ensamblarse en torno al sustrato. Esto puede ocurrir de dos modos: mediante un mecanismo de apertura de anillo (Ahnert *et al.*, 2000), o mediante desensamblaje-ensamblaje de la proteína alrededor del ADN (Yamada *et al.*, 2002) (**Figura 18**). En algunos casos se requiere una proteína accesoria que dirige al motor molecular hacia su diana, como es el caso del complejo RuvA-RuvB implicado en la resolución de las "*Holliday Junction*" (Yamada *et al.*, 2002).



**Figura 18.** Modelo de apertura del anillo-cerradura (A) y de desensamblaje -ensamblaje (B) directo de los monómeros sobre el ADN dando lugar a la proteína hexamérica, imagen adaptada de Ahnert y col, 2000.

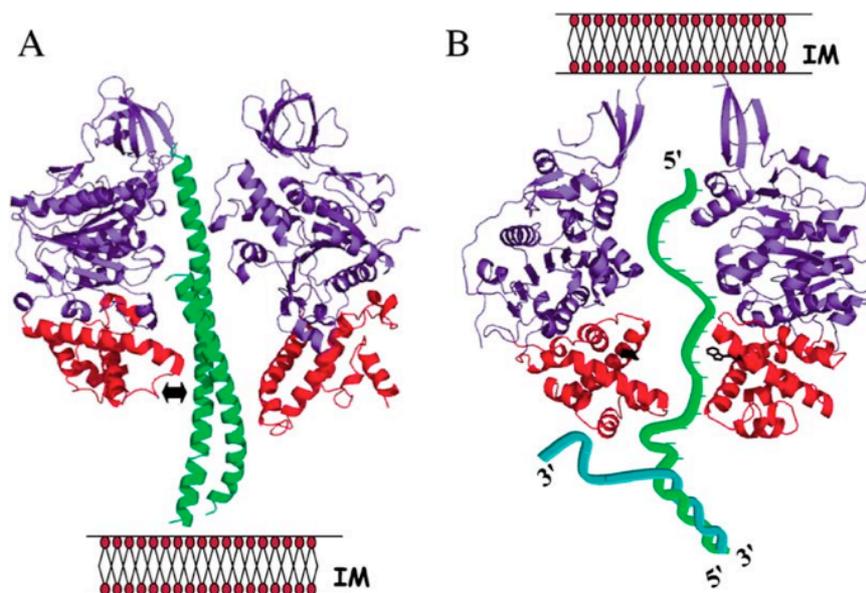
Por otro lado, el estado oligomérico debe mantenerse durante la translocación del sustrato. Puesto que el sitio de unión a nucleótidos está involucrado en la interacción entre monómeros, los movimientos relativos entre los protómeros deben ser coordinados para que sean procesivos. Las regiones alejadas del sitio activo, situadas en la interfase de protómeros adyacentes, serían las que determinarían el modo en que se van a producir los cambios conformacionales. Se ha observado que para proteínas de membrana como TrwB, las dominios transmembranas juegan un rol importante en la conformación del hexámero (Hormaeche *et al.*, 2002). Otras proteínas, como la F1-ATPasa, presentan en el dominio N-terminal una estructura de barril  $\beta$  que ayuda a mantener su estado oligomérico. Este anillo es homólogo a la zona próxima a los segmentos transmembrana de TrwB $\Delta$ N70, pero orientado en forma opuesta (Cabezón & de la Cruz, 2006).

#### 1.4.3. Motores moleculares con los que TrwB presenta mayor similitud

La similitud estructural entre TrwB y otros motores moleculares, como la F1-ATPasa (Abrahams *et al.*, 1994), la helicasa del gene 4 (g4p) del fago T7 (Singleton *et al.*, 2000), o la P4 del fago phi 12 (Mancini *et al.*, 2004), sugieren que TrwB podría operar como un motor molecular, bombeando ADN a través de su canal central, utilizando la energía obtenida de la hidrólisis de ATP. Esta hipótesis se refuerza con los datos bioquímicos mencionados en la sección 4.2.2 (actividad ATPasa dependiente de ADN, oligomerización en presencia de ADN, y exhibe cooperatividad positiva por la hidrólisis de ATP). A continuación se detallan algunos ejemplos de proteínas con los que TrwB guarda mayor similitud estructural o funcional.

### 1.4.3.1. Complejo F1-ATPasa bovino

El complejo F1-ATPasa constituye el dominio globular del complejo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa o ATP sintetasa, que separado del resto solo funciona en la dirección de hidrólisis de ATP. Forma un heterohexámero  $\alpha_3\beta_3$ , donde las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se disponen de modo alterno en torno a una subunidad- $\gamma$  central, existiendo además otras subunidades adicionales. Cada una de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  posee un sitio de unión a nucleótidos con un dominio con plegamiento RecA, pero solo las subunidades  $\beta$  participan en la catálisis. La estructura presenta una marcada asimetría en la conformación de las subunidades  $\beta$  y esta asimetría es responsable del mecanismo secuencial de hidrólisis de nucleótidos (Boyer, 1993). El proceso de unión a ATP y la liberación de ADP+Pi provoca cambios conformacionales responsables de la rotación de la subunidad  $\gamma$  central durante la hidrólisis de nucleótidos. Un esquema de esta asimetría puede observarse en la **Figura 19**. Los cambios conformacionales que se producen son de apertura y cierre de las subunidades  $\beta$  de modo alterno, observándose un desplazamiento del dominio C-terminal de las subunidades unidas a ATP, respecto a las subunidades unidas a ADP+Pi y las libres (Abrahams *et al.*, 1994).



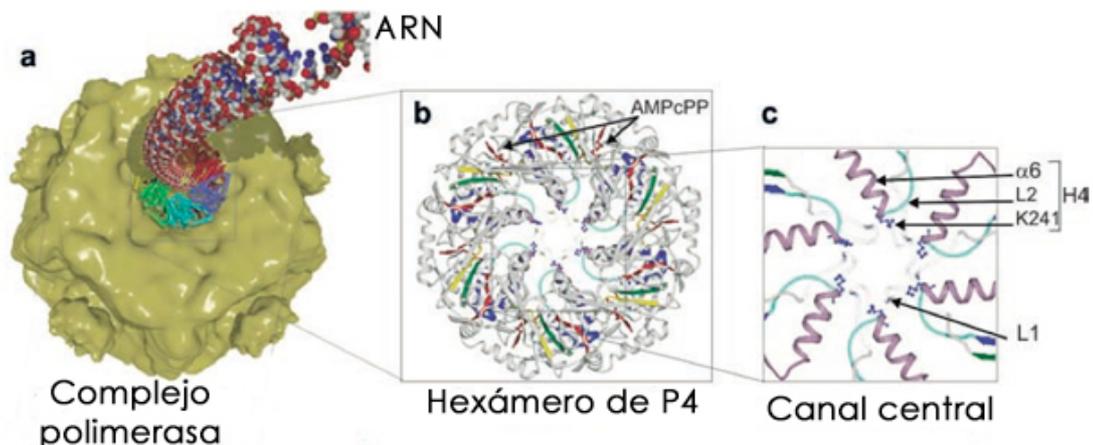
**Figura 19.** "Binding and change mechanism" modificado para la translocación de ADN por TrwB. Se muestran las estructuras de F1-ATPasa y TrwB en A y B, respectivamente. Representados en orientaciones opuestas relativo a la membrana interna (IM), el dominio

todo alfa (AAD) se representa en rojo en TrwB (residuos 184–297) y el equivalente en F1-ATPase corresponde a los bucles C-terminales de las hélices (residuos 364–474), los cuales constituyen un dominio móvil que adquiere conformaciones diferentes en las tres subunidades catalíticas y contiene los residuos involucrados en la interacción con la subunidad  $\gamma$  (flecha negra). TrwB no presenta esa subunidad central. En cambio una hebra de ADN, sería translocada a través del canal central. La translocación sería dirigida por los movimientos del dominio AAD y como consecuencia de la actividad ATPasa (por analogía con F1-ATPasa). Un anillo de triptófano (mostrado en negro) podría interactuar con el ADN y lo empujaría a través del canal de TrwB (Cabezón & de la Cruz, 2006).

Basándose en éstos resultados se ha propuesto para TrwB un mecanismo similar al “*binding change mechanism*” asignado para la F1-ATPase (Cabezón & de la Cruz, 2006) para explicar la hidrólisis de ATP y la translocación de ADN. En este modelo la subunidad  $\gamma$  central sería sustituida por la cadena de ADN transferida durante la conjugación.

#### **1.4.3.2. La proteína portal P4 del fago $\phi$ 12**

La proteína portal P4 del fago  $\phi$  12 es una ATPasa hexamérica estimulada por ARN de cadena simple (Juuti *et al.*, 1998, Kainov *et al.*, 2003). Es específica de purinas y transloca ARN en dirección 5'-3'. Aunque es un motor molecular que empaqueta ARN dentro de la cápside vírica, también tiene otra función pasiva en la cual hace de conducto a través del cual se liberan moléculas de ARN mensajero (Kainov *et al.*, 2004). Cada monómero presenta un dominio N-terminal, un core conservado y un C-terminal. La estructura del sitio de unión a nucleótido es similar al de TrwB (Mancini *et al.*, 2004). La región C-terminal se acopla en forma dinámica al core catalítico, por lo que se ha propuesto que es ésta región la que produce cambios conformacionales que disparan la actividad de empaquetamiento (Kainov *et al.*, 2006). Los monómeros conforman una proteína hexamérica casi simétrica encerrando un canal central ocupado por los loops 1 y 2 (**Figura 20**). Éstos son esenciales para la unión y translocación del ARN. El loop 1 tendría un rol en la translocación de ARN por el poro central, mientras que el loop 2 transduciría la señal. La unión al sustrato ocurriría por un mecanismo de apertura y cierre que no requiere unión al nucleótido ni su hidrólisis (Kainov *et al.*, 2006).



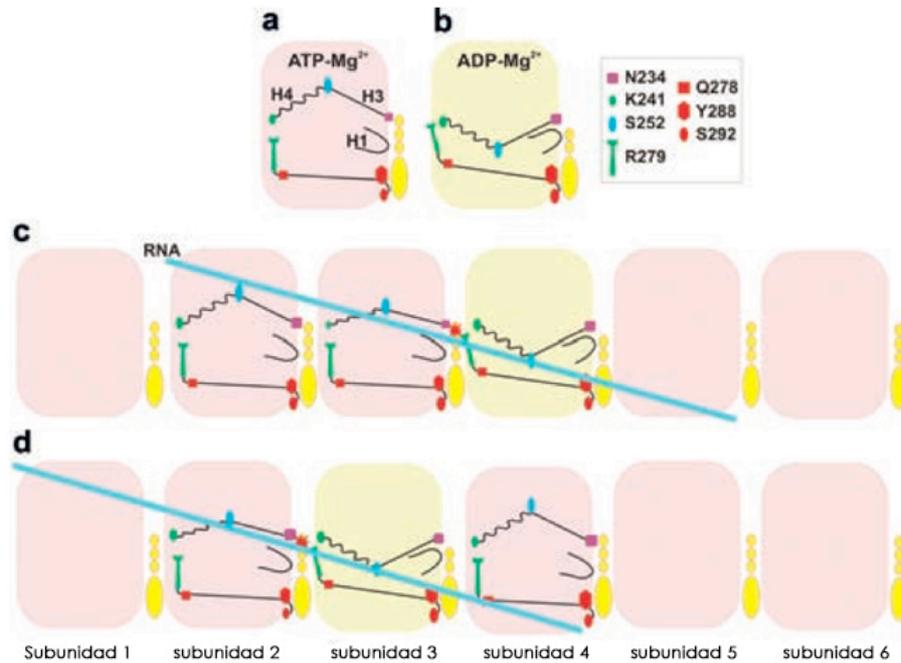
**Figura 20.** A) La proteína hexamérica P4 en el proceso de empaquetamiento de ARN en una cápside vacía. B) Representación del hexámero de P4. Seis moléculas de AMPcPP ocupan la interface entre las subunidades. C) Se observa el canal central de P4 desde el C-terminal, región de contacto con la cápside. Con flechas se indica los loops 1 y 2 y la hélice  $\alpha$ -6. Imagen adaptada de Kainov y col , (2006).

La posibilidad de obtener estructuras cristalinas de varios intermediarios durante la unión e hidrólisis de nucleótidos y liberación del producto, ha permitido modelar un mecanismo de la hidrólisis de ATP acoplado a la translocación de ARN. Para un mejor entendimiento del mecanismo, el dominio *RecA-like* ha sido dividido en motivos (H) funcionales. Los motivos H1, H1a y H2 participan en la unión al nucleótido, magnesio y en la hidrólisis. Los loops I y II y el motivo H4, participan en la unión de ARN y translocación, mientras que el motivo H3 tiene una función sensora y propaga los cambios conformacionales desde el sitio de unión a nucleótido al resto de la proteína.

La comparación de las diferentes estructuras unidas a nucleótidos reveló que el motivo H4 (compuesto por hélices- $\alpha$ , loop II, K241) y el motivo H1 (*P-loop* o Walker A) eran los que principalmente sufrían cambios conformacionales tras la hidrólisis del nucleótido (Mancini *et al.*, 2004).

Se ha observado que la sustitución de la lisina (K241) en el dominio H4 de unión a ácidos nucleicos por una alanina anula la actividad ATPasa completamente, lo que sugiere un rol de esta lisina en la translocación del ARN (Mancini *et al.*, 2004). Por otro lado se ha comprobado que el movimiento giratorio del motivo H4 es necesario para la actividad ATPasa. Dos regiones H4 estarían unidas simultáneamente al ARN, y en este momento sería el mismo ARN quien conservaría la energía temporalmente hasta el siguiente paso (Kainov *et al.*, 2006).

La **Figura 21** describe el modelo de hidrólisis de nucleótido acoplado a la translocación de ARN.



**Figura 21.** Modelo secuencial de hidrólisis y translocación de ARN de P4. A) y B), representación esquemática de los motivos conservados y posición de los residuos involucrados de una subunidad de P4 en la unión de ATP y ADP. C) y D), descripción de la coordinación de la hidrólisis secuencial y translocación de ARN dentro del hexámero. Se muestran dos pasos C y D. El hexámero de P4 está abierto y la vista es desde el exterior. En rosa: subunidades unidas a ATP. En amarillo: subunidades unidas a ADP y en celeste el ARN. A) Subunidades 1, 5 y 6 unidas a ATP. Los elementos estructurales en las subunidades no se muestran. C) Hidrólisis en la subunidad 4 permite el movimiento del motivo H4 (hélice- $\alpha$ -L2) con el ARN unido a la posición baja. Este movimiento inserta el dedo de arginina R279 en el sitio catalítico de la subunidad 3. Esto es necesario para la formación del estado de transición y la hidrólisis en la subunidad 3. D) el ciclo se repite en el sitio 2-3 mientras la subunidad 4 une ATP y el motivo H4 vuelve a su conformación inicial elevada. En este punto el ARN se libera de esta subunidad (Kainov *et al.*, 2006).

Este mecanismo podría ser compartido por las proteínas RecA/AAA+ (Kainov *et al.*, 2006).

#### 1.4.3.3. Translocadores de ADN anclados a membrana

TrwB también presenta similitud con la familia de translocadores de ADN anclados a membrana de la familia FtsK/SpoIIIE (Moncalián *et al.*, 1999) y con

TraB un miembro de esta familia responsable de la transferencia de ADN de cadena doble entre células de *Streptomyces* (Vogelmann *et al.*, 2011). Recientemente, un estudio filogenético ha mostrado que las proteínas que participan en los dos modos conjugativos; TrwB ( sustrato de ADN de cadena simple ) o TraB (sustrato de ADN de cadena doble), están basados en ATPasas que divergieron antes del último antecesor común de las bacterias (Guglielmini *et al.*, 2012).

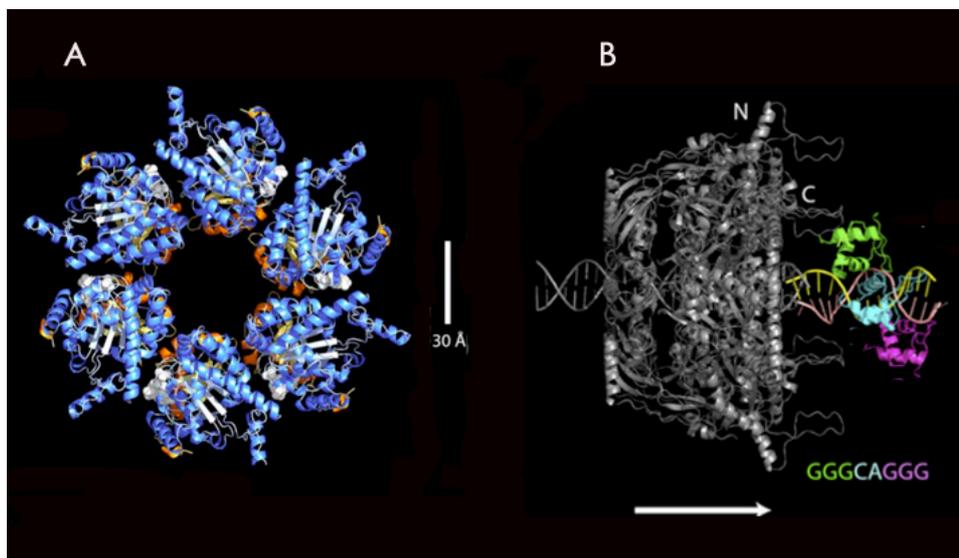
La proteína FtsK de *E. coli*, está implicada en la resolución de dímeros cromosómicos durante la división bacteriana (Begg *et al.*, 1995), mientras SpoIIIE es imprescindible en la esporulación de *Bacillus subtilis*, translocando el ADN desde la célula madre hacia la preespora (Wu & Errington, 1994).

Estos transportadores se encuentran anclados a la membrana a través de segmentos transmembrana localizados en la región N-terminal, cruciales para la actividad de la proteína, que interaccionan con otros componentes proteicos de la maquinaria replicativa, como ocurre con las proteínas acopladoras VirD4-*like* de los sistemas conjugativos. A continuación del dominio transmembrana poseen un linker corto de función aún desconocida en las proteínas similares a FtsK, que está ausente en VirD4-*like*.

Sin embargo el C-terminal está muy bien conservado en esta familia. Esta región incluye los motivos ATPasa y contiene los dominios de translocación de ADN (Cabezón *et al.*, 2011). Los transportadores FtsK/SpoIIIE presentan un dominio  $\gamma$  central que reconoce los sitios específicos en la secuencia cromosómica (KOPS y SRS para FtsK y SpoIIIE, respectivamente) los cuales constituyen los sitios de montaje de la proteína sobre el ADN. La proteína TraB de *Streptomyces*, se parece más a FtsK/SpoIIIE que a TrwB, tanto en secuencia como en la organización de los dominios. Al igual que FtsK/SpoIIIE, se une a sitios específicos del ADN (TRS) (Vogelmann *et al.*, 2011). Sin embargo, TrwB reconocería sustratos específicos en base a la estructura, como los G-cuadruplex (Matilla *et al.*, 2011).

El C-terminal de estos transportadores es un hexámero funcional que presenta un poro central de un diámetro externo de 120 Å y un canal interno de 30 Å, que permite la translocación del ADN (Massey *et al.*, 2006). Estas características son comunes con otras bombas de ADN implicadas en conjugación como TraB de *Streptomyces* (Vogelmann *et al.*, 2011) o TrwB, la acopladora de R388 (Gomis-Rüth *et al.*, 2001).

En la **Figura 22**, se muestra la estructura de FtsK. Esta proteína posee un dominio C-terminal, responsable de la resolución de dímeros cromosómicos, y presenta los dominios Walker A y Walker B y el residuo de arginina responsable de la traducción que produce cambios conformacionales que culminan en la hidrólisis de ATP (Iyer *et al.*, 2004). FtsK presenta cooperatividad en la hidrólisis de nucleótidos y además la presencia de ADN estimula la hexamerización de la proteína, generando su forma activa (Aussel *et al.*, 2002).



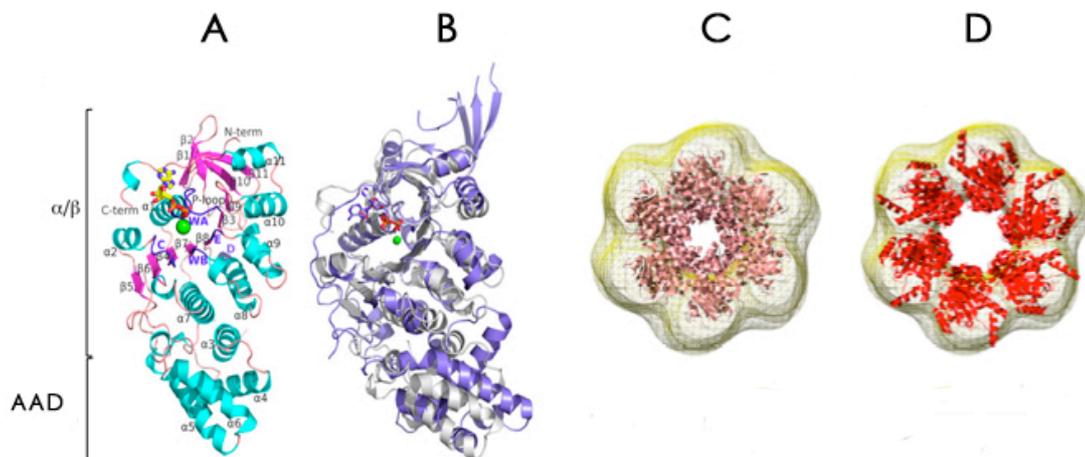
**Figura 22.** Estructura cristalina del C-terminal de FtsK de *Pseudomonas aeruginosa*. A) Vista del hexámero de FtsK desde el C-terminal. B) Modelado de FtsK (vista lateral) translocando el ADN en la dirección que se indica (flecha blanca). En ese momento los dominios  $\gamma_1$  (verde),  $\gamma_2$  (celeste) y  $\gamma_3$  (fucsia) interaccionan con el sitio KOPS dando direccionalidad al movimiento. Imagen adaptada de A) Massey y col, (2006) y B) Lowe y col (2008).

Otros motores moleculares anclados a la membrana también presentan semejanzas con la proteína TrwB. A diferencia de los anteriores (FtsK, SpoIII y TraB), éstos no estarían implicados en la translocación de ADN, sino más bien en la translocación de sustratos proteicos.

Recientemente han sido publicada la estructura cristalina del dominio C-terminal de un monómero de TpsVirB4CTD (Wallden *et al.*, 2012) y la estructura tridimensional obtenida por microscopía electrónica de TrwK de R388 (Peña *et al.*, 2012). En la **Figura 23** se observa que la estructura del C-terminal de un monómero de TpsVirB4CTD es muy similar a la de TrwB $\Delta$ N70 (Wallden *et al.*,

2012). La superposición de ambas estructuras es casi idéntica (Fig.23 B).

En la Fig. 25C y D se observa la estructura tridimensional de TrwB $\Delta$ N70 y la obtenida para TrwK (VirB4) de R388. En la Fig 25 D se observa una proteína hexamérica, con un C-terminal y un dominio transmembrana N-terminal (Peña *et al.*, 2012). La inclusión de las estructuras cristalinas de TrwB $\Delta$ N70 y FtsK en la estructura obtenida por microscopía electrónica de TrwK, reveló que esta proteína es más similar a FtsK que a TrwB (Peña *et al.*, 2012).



**Figura 23.** Estructuras de homólogos de VirB4 similares a TrwB. A) Estructura cristalina del C-terminal de un monómero de TpsVirB4CTD. B) Superposición del TpsVirB4CTD con un monómero de TrwB $\Delta$ N70. C) Inclusión de la estructura de TrwB $\Delta$ N70 y D) FtsK de *P. Aeuriginosa* en el mapa de la estructura de TrwK obtenida por microscopía electrónica. Imágenes adaptadas de Wallden y col, 2012 y Peña y col, 2012.

Es decir tanto TrwK y como su homólogo VirB4 poseen un NBD, donde se encuentra el dominio motor, similar al de las proteínas *VirD4-like*, de la cual es parte TrwB (Wallden *et al.*, 2012, Peña *et al.*, 2012).

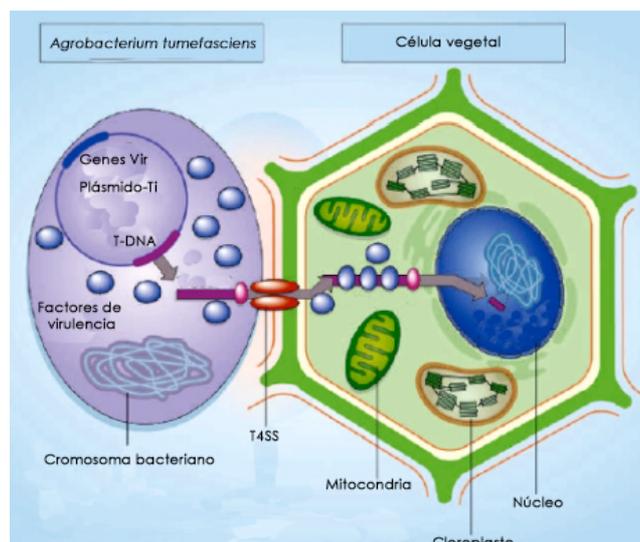
## 1.5. La conjugación como un mecanismo universal de transferencia de ADN

La transferencia de ADN por conjugación bacteriana no siempre requiere una bacteria como célula receptora; es decir, la célula receptora puede ser una célula eucariota, tanto de levaduras, como animal o vegetal. A continuación se detallan algunos ejemplos y se pone en evidencia el potencial biotecnológico del proceso conjugativo.

### 1.5.1. Conjugación a plantas mediada por *At*

La transformación genética de plantas por *At* es el único proceso natural eficiente de transferencia de ADN entre los reinos procariota y eucariota. La transformación genética mediada por *Agrobacterium* (TGMA) fue el primer método de producción de plantas transgénicas (Zupan *et al.*, 2000). Es el método más preciso, predecible, sofisticado y natural que existe para transformar plantas (Bevan, 1984, Taylor & Fauquet, 2002, Tzfira & Citovsky, 2006, Vasil, 2008). Además en condiciones de laboratorio se ha utilizado TGMA para transformar *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Bundock *et al.*, 1995), hongos (de Groot *et al.*, 1998) y cultivos de células humanas HeLa (Kunik *et al.*, 2001).

El proceso de transferencia iniciado en la bacteria guarda una enorme similitud con la conjugación (**Figura 24**).



**Figura 24.** Transformación genética de plantas mediada por *At*. Imagen adaptada de Gelvin, (2005).

Siguiendo el modelo general conjugativo, se requiere la presencia de dos "secuencias bordes" que flanquean al segmento de ADN que se transfiere (T-ADN). Estas secuencias funcionan como dos *oriTs*. También este sistema presenta un T4SS. Una vez en la planta, el T-ADN transferido por conjugación es guiado hasta el núcleo por las proteínas que contienen una señal de localización nuclear, donde finalmente es integrado al azar en el genoma de la célula vegetal

### **1.5.2. Conjugación a levaduras mediada por *E. coli***

En condiciones de laboratorio *S. cerevisiae*, además de ser transformada por el sistema plasmídico de *At* (Bundock *et al.*, 1995) también puede ser transformada por una *E. coli* portadora de un plásmido movilizable (Heinemann & Sprague, 1989).

En este primer trabajo se utilizaron plásmidos de amplio y de limitado rango de huésped, R751 (IncP) y F (IncF), respectivamente. Estos aportaban en *trans* la región *Mpf* (plásmidos "*helpers*"). El plásmido movilizable codificaba el *oriT* del plásmido ColE1 (plásmido no auto-transmisible), la secuencia de replicación plasmídica de 2  $\mu$ m de levaduras y un marcador de selección para levaduras (*LEU2*). La transferencia del plásmido movilizable fue confirmada mediante la reversión por parte de la levadura a la auxotrofia para Leu<sup>+</sup> en un medio Leu<sup>-</sup>. La transferencia de ADN solo ocurría en presencia de los plásmidos *helpers*, por lo que los autores concluyeron que las proteínas de la región *Dtr* y *Mpf* estaban involucradas en la movilización. Tras realizar los correspondientes controles negativos, concluyeron que el ADN transferido a las levaduras requería de un contacto físico, de células donadoras viables y no ocurría por factores extracelulares difusibles. Por lo tanto las levaduras Leu<sup>+</sup> eran transconjugantes. Adicionalmente, observaron que la eficiencia de conjugación decrecía en cuanto aumentaban el tamaño del plásmido movilizable y que una relación 1:1000 (bacterias/levaduras) era la óptima, probablemente porque concentraciones altas de bacterias serían tóxicas para las levaduras.

Sigue siendo una incertidumbre la interacción entre el pilus y la pared celular de la levadura receptora. Dado el espesor de esta pared probablemente dicha interacción ocurra en una fase específica del ciclo celular. En relación a lo anterior han sido reportados 5 genes que, cuando son mutados en una levadura receptora, producen un descenso en la eficiencia de conjugación *E. coli* - levadura.

Aparentemente éstos genes estarían involucrados en el mantenimiento de la pared celular (Mizuta *et al.*, 2012)

El ADN transferido por conjugación puede ser integrado en el cromosoma de la levadura (Nishikawa *et al.*, 1992) o siempre y cuando codifiquen un origen de replicación de levaduras, son convertidas en moléculas doble cadena replicativas, aunque no se sabe qué proteínas intervienen en dicha acción.

Los experimentos de conjugación entre bacterias y levaduras han sido replicados por varios grupos. Se han realizado conjugaciones entre *E. coli* y levaduras evolutivamente distantes a *S. cerevisiae* como *Schizosaccharomyces pombe* o *Saccharomyces kluyveri* (Sikorski *et al.*, 1990).

Más tarde se estudió la efectividad de los diferentes sistemas conjugativos: F (IncFI), ColIb-P9 (IncI1), y RP4/R1 (IncP), para mediar la transferencia de ADN a levaduras por conjugación. Este trabajo demostró que solo los del grupo IncP (P-like pilus) eran eficientes en dicha transferencia. Utilizando una batería de mutantes de los componentes de la región *Mpf* demostraron que esta región era imprescindible para la transferencia de ADN a levaduras (Bates *et al.*, 1998).

### **1.5.3. Conjugación a células de mamífero mediada por *E. coli***

Desde que Heinemann y Sprague en 1989, observaron que *E. coli* conjugaba a células de levadura, surgió entonces la pregunta si aquel intercambio genético entre reinos también era posible a eucariotas de organismos superiores. La conjugación entre bacterias y células de mamífero fue publicada en 2001 (Waters, 2001). En éste trabajo se construyó un plásmido movilizable que codificaba el *oriT* de RK2 (IncP) y marcadores de selección en mamíferos, como resistencia a neomicina, puromicina, zeocina. Adicionalmente dicho plásmido codificaba el gen de *cd14* humano y el de la proteína verde fluorescente *gfp* (*green fluorescent protein*). Para movilizar este constructo se utilizó el plásmido "helper" pRK231. Como células receptoras emplearon la línea CHOK1 (*Chinese Hamster Ovary Cell Line*). El ensayo de conjugación en sí consistía en colocar bacterias donadoras sobre las células creciendo en placas durante 8 horas. Posteriormente se trataba con gentamicina para matar a las bacterias. Al cabo de 48 horas los transconjugantes eran seleccionados por resistencia a geneticina (NeoR). La transferencia de ADN solo se detectó cuando en la bacteria donadora el plásmido movilizable contenía el *oriT*. Se demostró también la dependencia del T4SS. Los controles negativos demostraron

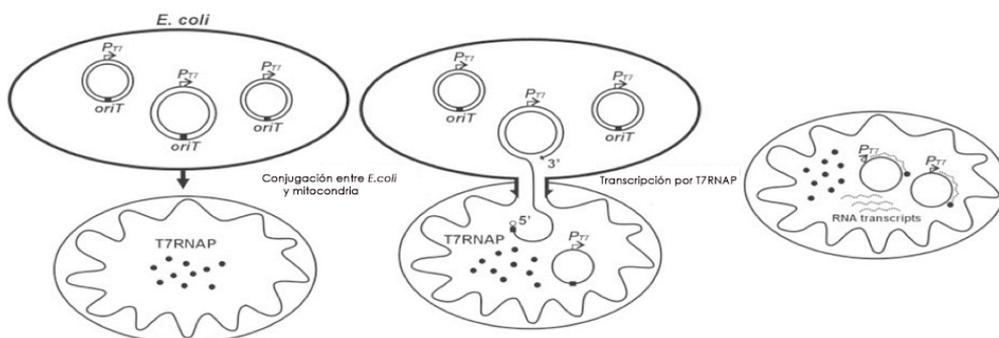
que no se trataba de una transfección o de introducción de la bacteria en el citosol celular. El ADN transferido no presentaba metilación Dam dependiente, con lo cual no podía ser replicado dentro de la bacteria sino dentro de la célula CHOK1. Las frecuencias de conjugación eran comparables con las obtenidas entre *E. coli* y *S. Kluyveri* (Inomata *et al.*, 1994).

Desde entonces nadie ha vuelto a reproducir estos resultados (Agúndez, 2011). Dada la importancia de tal descubrimiento, se pone en duda los resultados previamente publicados por (Waters, 2001).

#### 1.5.4. Conjugación entre bacterias y mitocondrias aisladas

Si las bacterias son capaces de conjugar a organismos superiores como las levaduras y en teoría a células humanas en cultivo, ¿podríamos pensar que también son capaces de conjugar a organelos que han evolucionado a partir de bacterias, como cloroplastos y mitocondrias? Yoon & Koob, (2005) construyeron un plásmido movilizable para *E. coli* y observaron que podía ser movilizado por conjugación a mitocondrias aisladas. El ADN transferido (de cadena simple) era transcrito produciendo ARN dentro de la mitocondria (**Figura 25**).

Inicialmente se construyó una mitocondria "receptora" mediante la transfección estable de células de ratón que expresaban T7RNA-polimerasa (T7RNAP). Para dirigir la T7RNAP a mitocondrias utilizaron el factor de transcripción A mitocondrial (TFAM) de ratón (codificado en el núcleo). La quimera proteica muTFAML-T7RNAP, fue localizada solo en la matriz mitocondrial. Como controles realizaron ensayos de transcripción *in organello* usando mitocondrias electroporadas con un plásmido que codificaba el promotor de la T7RNAP, T7P, seguido del gen cloranfenicol (pUC::T7CAT) y observaron que la quimera era capaz de producir transcritos de ARN desde la secuencia promotora.



**Figura 25.** Esquema del proceso conjugativo entre *E. coli* y mitocondrias aisladas. El



Este trabajo hace patente la posibilidad de conjuguar bacterias y mitocondrias desde dentro de las células y de esta forma modificar genéticamente al ADN mitocondrial de forma estable, funcional y heredable, algo que es muypreciado en el campo de la genética mitocondrial de mamíferos.

## **2. Planteamiento y objetivos**



La versatilidad de los T4SS que les confiere la capacidad única de enviar sustratos muy diversos a destinos variados tiene, presumiblemente, su base molecular en el reclutamiento de sustratos y la elección de la célula de destino. Nuestro interés es estudiar precisamente los determinantes moleculares de esa versatilidad. Este es un objetivo de interés básico para entender la biología de los T4SS y su importancia en el mundo procariota, pero que también contiene un gran interés aplicado. El entendimiento de las claves moleculares de la elección de sustrato y célula de destino permitiría su subsecuente manipulación, para utilizar los T4SS como inyectores universales de sustratos a la carta.

La proteína acopladora (T4CP) representa la interfase molecular entre el sustrato y el T4SS. Un abordaje molecular nos permitirá determinar el papel de la T4CP tanto desde un punto de vista estructural sobre el T4SS, como funcional en el reconocimiento y la translocación del sustrato. Por otra parte, nos interesa conocer la señal de translocación (TS) del sustrato conjugativo. En este sentido queremos estudiar si existe un dominio único y qué residuos son claves para un reclutamiento efectivo por distintos T4SS.

Por otra parte, nos hemos preguntado hasta dónde podría llegar la versatilidad del T4SS respecto a la célula de destino, usando diferentes receptores de la conjugación.

Por todo esto, nos planteamos cuatro objetivos principales:

1. Estudiar el papel de la T4CP TrwB como componente estructural del T4SS de R388.
2. Determinar los residuos de TrwB implicados en el reconocimiento específico y transporte del sustrato conjugativo.
3. Determinar la señal de translocación (TS) de la relaxasa TrwC, sustrato del T4SS de R388.
4. Explorar la posibilidad de transferir ADN a levaduras y mitocondrias por conjugación.



### **3. Metodología**



### 3.1. Cepas de bacterias y levaduras utilizadas en este trabajo

#### 3.1.1. Cepas de *E. coli*

Cepas	Genotipo	Referencia
BL21 (DE3)	<i>F ompT hsdS gal (DE3)</i>	(Miroux & Walker, 1996)
CHS26Cm::LTL	<i>Tc<sup>r</sup>, CSH26 galK::cat::loxP-Tet-loxP</i>	(Lang et al., 2010)
C41 (DE3)	<i>F dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ (DE3)</i>	(Miroux & Walker, 1996)
D1210	<i>Sm<sup>r</sup> recA hspR hsdM rpsI laqI<sup>q</sup></i>	(Sandler & Clark, 1990)
DH5α	<i>Nx<sup>r</sup> F<sup>-</sup> supE44 ΔlacU169 (f80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Grant et al., 1990)
DH10B	<i>Sm<sup>r</sup> F<sup>-</sup> recA hspR hsdM rpsI LaqI<sup>q</sup></i>	(Sadler et al., 1980)
DH10B- Rif	<i>Rf<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> F<sup>-</sup> recA hspR hsdM rpsI LaqI<sup>q</sup></i>	This work
Ecsf2a_3	Chimera de <i>E. coli</i> K-12 (cepa 395-1) y <i>Sigella flexneri</i> 2a (cepa 256) .a <i>Shigella</i> virulence plasmid mutante pWR100(icsA/virG).	(Lim et al., 2008)
EL350	<i>Sm<sup>r</sup> DH10B[lcl857(cro-bioA)&lt;&gt;araC-PBADcre]</i>	(Lee et al., 2001)
HMS174	<i>Rf<sup>r</sup> F<sup>-</sup> recA hsdR rpoB</i>	(Campbell et al., 1978)
L40	<i>MATa, trp1, leu2, his3, LYS2::lexA-HIS3, URA3::lexA-LacZ</i>	(Hollenberg et al., 1995)
MS411	<i>Sm<sup>r</sup> ilvG rfb-50 thi</i>	M. Schembri; DTU, Denmark
S17-1λpir	<i>Tp<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, recA thi pro hsdR-M+ RP4:2-Tc::Mu:Km Tn7, λpir</i>	(de Lorenzo & Timmis, 1994)
UB1637	<i>Sm<sup>r</sup> F<sup>-</sup> lys his trp rpsL recA 56</i>	(de la Cruz & Grinsted, 1982)

**Tabla 2.** Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo

### 3.1.2. Cepas de *S. cerevisiae*

Cepas	Genotipo	Referencia
<sup>4</sup> HKY569-2B	<i>MATa rad 54 :: LEU2 leu2-3, 112his3-11,15 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100 RAD+</i>	Hannah L. Klien (New York University)
<sup>5</sup> HKY579-10A	10A <i>MATa leu2-3, 112his3-11,15 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100 RAD+</i>	(Smirnova et al., 2004)
<sup>4</sup> HKY624-1	<i>MATa rad 54 :: HIS3 leu2-3, 112his3-11,15 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100 RAD+</i>	Hannah L. Klien (New York University)
<sup>3</sup> JP48/2b	<i>MATa RAD54 ade2-1 ura3 his3-11, -15 leu2 trp1-1, -112trp1-1-100</i>	(Thomas & Rothstein, 1989)
L40	<i>MATa, trp1, leu2, his3, LYS2::lexA-HIS3, URA3::lexA-LacZ</i>	(Hollenberg et al., 1995)
<sup>4</sup> MSY-rad54GR	<i>MATa rad54 G484 leu 2-3, 112his3-11, 15 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100 RAD+</i>	(Smirnova et al., 2004)
<sup>2</sup> MD62/8	<i>MATa rad54-3 ade2-1 ura3 his3-11, -15 leu2 trp1-1</i>	(Le & Dabson, 1997)

**Tabla 3.** Cepas de levaduras utilizadas para los experimentos de conjugación entre bacterias y levaduras. <sup>2-4</sup> Cepa mutante en el sistema de recombinación *rad* y <sup>3-5</sup> cepas salvajes utilizadas como control de los mutantes *rad*.

### 3.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo están listados en las Tablas 4 y 5. La Tabla 5 incluye la descripción de los plásmidos realizados para el presente trabajo, junto con los métodos utilizados para su construcción.

#### 3.2.1. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Ab <sup>R</sup> (1)	Descripción	Referencia
pAB2	Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	pLAFR5-Km:: región <i>trw Bt</i>	(Seubert <i>et al.</i> , 2003b)
pBSKS	Ap <sup>R</sup>	Vector de clonación	INVITROGEN
pCre-TrwC <sub>2-966</sub>	Ap <sup>R</sup>	CFPB:: <i>cre-trwC</i>	(Kienesberger <i>et al.</i> , 2011)
<sup>2</sup> pCre-TrwC <sub>705-966</sub>	Ap <sup>R</sup>	CFPB:: <i>cre-trwC</i>	Silvia Lang (University of Graz, Austria)
pDEL003	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwA-trwB</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pDEL009	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwB (K275A)</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pDEL010	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB (K275A)</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pET29:: <i>trwAC</i>	Km <sup>R</sup>	pET29C:: <i>trwA-trwC</i>	(Draper <i>et al.</i> , 2005)
pGEX-3X	Ap <sup>R</sup>	Vector de expresión	Pharmacia
pHP138	Km <sup>R</sup>	pET29C:: <i>oriT-trwA-trwC</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pHP139	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwB</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pHP141	Cm <sup>R</sup>	pHP139:: <i>trwB (R240A E241A)</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pHP142	Cm <sup>R</sup>	pHP139:: <i>trwB (H244A W245A)</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pHP145	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwB (N217D)</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pHP148	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwB (K275A K398A)</i>	(de Paz, 2010)
<sup>2</sup> pHP154	Ap <sup>R</sup>	pET3a:: <i>trwB (K275A K398A)</i>	Hector de Paz
pHP161	Gm <sup>R</sup>	pBBR6:: <i>oriT- trwABC::eGFP</i>	(Fernández-González <i>et al.</i> , 2011)
pHP169	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwB(K421A D425A)</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)

Tabla 4 Continúa

Plásmido	Ab <sup>R</sup> (1)	Descripción	Referencia
pHP170	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwB</i> (K398A R417S)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pHP171	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>trwB</i> (K398A)	(de Paz, 2010)
pHP173	Km <sup>R</sup>	pET29C:: <i>trwBΔN70</i> (K398A)	Héctor de Paz
pHP176	Km <sup>R</sup>	pET29C:: <i>trwBΔN70</i> (K275A K398A)	Héctor de Paz
<sup>3</sup> pHZ	Ap <sup>R</sup>	Plásmido suicida	Sara Pérez-Luz (CBMSO, Madrid)
pKM101	Ap <sup>R</sup>	Plásmido natural del grupo IncN	(Langer & Walker, 1981)
pKM101Δ <i>mob</i>	Ap <sup>R</sup>	pKM101 Δ <i>Dtr</i>	(Draper <i>et al.</i> , 2005)
<sup>2</sup> pMEC06	Km <sup>R</sup>	pET29C:: <i>trwBΔN70</i> (K421A D425A)	Elena Cabezón
<sup>2</sup> pMEC07	Ap <sup>R</sup>	pET3a:: <i>trwBΔN70</i>	Elena Cabezón
<sup>2</sup> pMEC10	Ap <sup>R</sup>	pET3a:: <i>trwBΔN70</i> (K421A)	Elena Cabezón
pMTX501	Ap <sup>R</sup>	pGEX-3X:: <i>trwBΔN75</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pMTX525	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (Q390A)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX527	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (R240A E241A)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX528	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (H244A W245A)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX533	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (D252A D253A)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX549	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (N271D)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX552	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (K275A D425A)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX553b	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (K398A R417S)	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
<sup>2</sup> pMTX570	Ap <sup>R</sup>	<i>GST-trwBΔN75</i> (Q386A)	Matxalen Llosa
pMTX582	Cm <sup>R</sup>	pSU4633:: <i>trwB</i> (K275A K398A)	(de Paz, 2010)
pMTX681	Cm <sup>R</sup>	pSU19:: <i>oriT-trwK-trwI</i> <sub>pKM101</sub>	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)

Tabla 4. Continúa

Plásmido	Ab <sup>R</sup> (1)	Descripción	Referencia
pNEA3b	Ap <sup>R</sup> Trp <sup>+</sup>	Fusión <i>lexA-SV40NLS-gal4AD</i>	(Rhee <i>et al.</i> , 2000)
pRS413IVb	Ap <sup>R</sup> His <sup>+</sup>	Plásmido de levadura con el cassette <i>CEN6-ARSH4-HIS3</i>	(Kitazono, 2011)
pSU18	Cm <sup>R</sup>	Vector de clonación, Rep (p15A)	(Bartolomé <i>et al.</i> , 1991)
pSU19	Cm <sup>R</sup>	Vector de clonación, Rep (p15A)	(Bartolomé <i>et al.</i> , 1991)
pSU24	Cm <sup>R</sup>	Vector de clonación, Rep (p15A)	(Bartolomé <i>et al.</i> , 1991)
pSU1423	Cm <sup>R</sup>	pSU18:: <i>oriT</i> + <i>trwABC</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU1443	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac en <i>trwB</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 1994)
pSU1445	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac en <i>trwC</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 1994)
pSU1621	Ap <sup>R</sup>	pET3a:: <i>trwC</i>	(Guasch <i>et al.</i> , 2003)
pSU2007	Km <sup>R</sup>	R388 con cassette KmR en el gen <i>SuR</i>	(Martínez & de la Cruz, 1988)
pSU4028	Cm <sup>R</sup>	p15A:: TRA R388 con $\Omega$ en <i>trwA</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU4035	Cm <sup>R</sup>	pSU1087::inserto $\Omega$ en <i>trwG</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU4058	Ap <sup>R</sup>	pHG327:: <i>trwL-trwD</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU4130	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwL</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4131	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwH</i>	(Seubert <i>et al.</i> , 2003)
pSU4132	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwD</i>	(Rivas <i>et al.</i> , 1997)
pSU4133	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwK</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pSU4134	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwE</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pSU4135	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwF</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4136	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwJ</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4137	Km <sup>R</sup> Tp <sup>R</sup>	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwI</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU1547	Ap <sup>R</sup>	pET22:: <i>trwA-HIS6</i>	(Moncalián & de la Cruz, 2004)

Tabla 4. Continúa

Plásmido	Ab <sup>R</sup> <sup>(1)</sup>	Descripción	Referencia
pSU4633	Cm <sup>R</sup>	pSU24::P <sub>trwABC</sub> -trwA-trwB KpnI/NdeI	(Moncalián <i>et al.</i> , 1999a)
pSU4622	Cm <sup>R</sup>	pSU24::P <sub>trwABC</sub> -trwA-trwB	(Moncalián <i>et al.</i> , 1999a)
pSU4637	Ap <sup>R</sup>	pET3a::trwBΔN70	(Moncalián <i>et al.</i> , 1999a)
pSU4707	Km <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	R6Kdrd1::Tn5tac1 en taxC	(Núñez <i>et al.</i> , 1997)
pSU4768	Km <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	R6Kdrd1	(Núñez <i>et al.</i> , 1997)
<sup>2</sup> pUZ2008	Tc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	IncP Tra ( <i>oriT1</i> )	W. Wilson y D. H. Figurski, Columbia University, NYC, USA.
<sup>2</sup> pYM206	Ap <sup>R</sup>	pSU1621::taxC-trwC	Yolevis García
<sup>3</sup> pYL2	Tc <sup>R</sup>	pTANTS:T7hp-T7P-eGFP <sub>669nt</sub> - 53bp-BsrGI-7nt-tRNA <sup>Arg</sup> -7 nt- T7t-SphI-oriT-HindIII (Tc <sup>R</sup> )	Yim Mei Lim (Eric Schon, Columbia University, NYC, USA)
RP4	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	Plásmido natural del grupo IncP	Pansegau <i>et al.</i> , 1994

**Tabla 4.** Plásmidos utilizados en este trabajo. <sup>1</sup> Ab<sup>R</sup> resistencia a antibióticos conferida por el plásmido. <sup>2</sup> Los plásmidos usados en este trabajo que no han sido aún publicados se describen a continuación brevemente. <sup>3</sup> Los plásmidos pHZ y pYL se explican el Capítulo 4, sección 4.

Los plásmidos de la Tabla 4 que no han sido publicados aún, se describen brevemente a continuación en la sección 3.3.3

## 3.2.2. Plásmidos contruidos para este trabajo

Plásmido	Descripción	Vector	Inserto/Molde	Construcción <sup>1</sup>
				Enzimas/Cebadores 5' 3'
pDEL002	psU19::trwB (K421A)	pHP139	pMEC10	KpnI-EcoRI
pDEL007	Gst-trwBAN75 (K421A)	pMTX570	pMTX735	KpnI-EcoRI
pDEL008	Gst-trwBAN75 (K398A)	pMTX570	pMTX736	KpnI-EcoRI
pDEL009c	psU19::trwB (P237L K275A S441G)	pHP141	pDEL009	BamHIΔN70_CCAAGGATCCTCGGACAAGCGAATTTG TrwB-EcoRI-Final_CCAGAATTCTAGATAGTCCCCCAACAA
pDEL012	pMTX524::trwB (S441G)	pMTX524	pDEL009c	ApalI-EcoRI
pDEL013	pet29c::trwBAN70 (K275A)	pMEC06	pDEL009	KpnI-EcoRI
pDEL014	pDEL009c::trwB (P237L K275A)	pDEL009c	psU4622	ApalI-EcoRI
pDEL015	pHP142::trwB (S441G)	pHP142	pDEL012	KpnI-EcoRI
pDEL017	pet29trwAC::oriT <sub>(330-1)</sub> SD-trwC	pet::trwAC	pHP161	XbaI-oriT <sub>330</sub> _CCATCTAGACCCTCTCCCGTAGTGTAC NdeI SD_CCAACATATAGCCCTCCTCATTTTCTGCATCATTTGT
pDEL020	Gst-trwBAN75 (K275A)	pMTX570	pDEL009	KpnI + EcoRI
pDEL021	pCIG1086::taxC-trwC	pCIG1086	pYM206	BamHI-XbaI
pDEL022	pNIA::trwC:taxC (fusión)	pCMS1	psU4768	XhoI_CCACTCGAGGATGGGTGTTTTCGTAGAAAAAG SpeI_EcoRI_CCAACTAGTGAATTCCTTAGAACCTTAATCCCGAC

Tabla 5. Continúa

Construcción <sup>1</sup>				
Plásmido	Descripción	Vector	Inserto/Molde	Enzimas / Cebadores 5'-3'
pDEL023	psU19:trwC-taxC	psU19	pDEL022	EcoRI-BamHI
pDEL024	pNEA::oriT R388	pNEA3b	psU2007	XhoI-oriT <sub>-1</sub> -AACCTCGAGCTCATTTTCTGCATC EcoRI-oriT <sub>-335</sub> -AACGAATTCATG TCCTCTCCC
pDEL025	pNEA::oriT RP4	pNEA3b	RP4	EcoRI-oriT <sub>P1</sub> -CCAAGAATTCGGCTTGCCCTCATCTG XhoI-oriT <sub>P280</sub> -CCAATCGAGGCGCTTTTCCGCTGCATAA
pDEL026	pHZ::oriT RP4	pHZ	RP4	BamHI-XhoI_CCAAGATCCCTCGAGCCGCTTGCCCTCATCTG XbaI-EcoRI_CCATCTAGAGAATTCGGCTTTTCCGCTGCATAA
pDEL027	pDEL026::EcoRI_CEN6- ARSH4-HIS3_XbaI	pDEL026	pRS413IVb	CEN6_CCAAGAATTCAGGATCCGAAAAGTGCCACCCTGGG HIS3_CCATCTAGACTCGAGCTACATAAAGAACAACCTTTG
pDEL028	pDEL026::XhoI_CEN6- ARSH4-HIS3_BamHI	pDEL026	pRS413IVb	CEN6_CCAGAATTCAGGATCCGAAAAGTGCCACCCTGGG HIS3_CCATCTAGACTCGAGCTACATAAAGAACAACCTTTG
pDEL029	pHZ::BamHI_CEN6- ARSH4-HIS3_XbaI	pHZ	pRS413IVb	CEN6_CCAGAATTCAGGATCCGAAAAGTGCCACCCTGGG HIS3_CCATCTAGACTCGAGCTACATAAAGAACAACCTTTG
pDEL032	BAC-FNX-pDEL027	BAC FNX Neo GFP	pDEL027	Recombinación mediada por Cre <sup>3</sup>
pDEL033	BAC-FNX-pDEL028	BAC FNX Neo GFP	pDEL028	Recombinación mediada por Cre <sup>3</sup>
pDEL034	BAC-FNX-pDEL029	BAC FNX Neo GFP	pDEL029	Recombinación mediada por Cre <sup>3</sup>
pDEL035	CFPB::cre-trwC <sub>2-600</sub>	pCre-TrwC	pCIG1086	KpnI CATGTAGGTACCCTCAGTCACATGGTATTGAC Sal_GCAATCGTCGACTTACTCGATGGCCTTGGTTGGCCG
pDEL036	CFPB::cre-trwC <sub>600-966</sub>	pCre-TrwC	pCIG1086	KpnI CATGTAGGTACCCTCAGTCACATGGTATTGAC Sal_GCAATCGTCGACTTACTCGATGGCCTTGGTTGGCCG
pDEL037	CFPB::cre-trwC <sub>897-966</sub>	pCre-TrwC	pCIG1086	KpnI_CCCGGTACCGGGGCAAGCTGCC Sal_GCAATCGTCGACTTACTCGATGGCCTTGGTTGGCCG
pDEL038	CFPB::cre-trwC <sub>920-966</sub>	pCre-TrwC	pCIG1086	KpnI_CCCGGTACCGGGGCAAGCTGCC Sal_GCAATCGTCGACTTACTCGATGGCCTTGGTTGGCCG

Tabla 5. Continúa

		Construcción <sup>1</sup>		
Plásmido	Descripción	Vector	Inserto / Molde	Enzimas / Cebadores 5'-3'
pDEL039 <sup>2</sup>	CFPB:: <i>cre-trwC_TS2*</i>	pCre-TrwC	PSU1443	<sup>a</sup> TGGCTAACGGT <b>GATCA</b> AAATGAAAAGTTGTCCGGG <sup>b</sup> CTCGGCATAGATTTCA <sup>c</sup> CCCGTGCACATCGAATTACCTTCCGGCCT
pDEL040 <sup>2</sup>	CFPB:: <i>cre-trwC_TS1*</i>	pCre-TrwC	PSU1443	<sup>a</sup> GGGCCGAGCTGGCCGTT <b>GCTGGCGGGCA</b> ATACGCATCACGGGAAAC <sup>b</sup> CTCGGCATAGATTTCA <sup>c</sup> CCCGTGCACATCGAATTACCTTCCGGCCT
pDEL041 <sup>2</sup>	CFPB:: <i>cre-trwC_TS1*_TS2*</i>	pCre-TrwC	pDEL039	<sup>a</sup> GGGCCGAGCTGGCCGTT <b>GCTGGCGGGCA</b> ATACGCATCACGGGAAAC <sup>b</sup> CTCGGCATAGATTTCA <sup>c</sup> CCCGTGCACATCGAATTACCTTCCGGCCT
pDEL042 <sup>2</sup>	CFPB:: <i>cre-trwC_TS1*_TS2*</i>	pCre-TrwC	pDEL039	<sup>a</sup> GGGCCGAGCTGGCCGTT <b>GCTGGCGGGCA</b> ATACGCATCACGGGAAAC <sup>b</sup> CTCGGCATAGATTTCA <sup>c</sup> CCCGTGCACATCGAATTACCTTCCGGCCT
pDEL045	pBSK:: <i>T7hp-T7P-eGFP<sub>669nt</sub>-53bp-7nt-tRNA<sup>Air9</sup>-T7t-oriT</i>	pBSK	pYL2	EcoRI+HindIII
pDEL047	pBSK:: <i>T7hp-T7P-eGFP<sub>669nt</sub>-53bp-AND3-tRNA<sup>Air9</sup>-AND4-T7t</i>	pDEL045	h-mt-DNA de células HeLa	BsrGI-tRNA-long_GGCTGTACAAACCACAACCTCAACGGCTAC HindIII-T7t ND4_CCAAAAGCTT <b>AAAAAAACCCTCAAGACCCTTAGA</b> <b>GGCCCCAAAGGGTTATGCTA</b> TAGTATGGCAATAGGCAC <sup>4</sup>
pDEL048	pBSK:: <i>T7hp-T7P-eGFP<sub>669nt</sub>-53bp-AND3-tRNA<sup>Air9</sup>-AND4-T7t-oriT</i>	pDEL045	h-mt-DNA de células HeLa	BsrGI-tRNA-long_GGCTGTACAAACCACAACCTCAACGGCTAC SphI-T7term - ND4_CCAAGCATG <b>CAAAAAAACCCCTCAAGACCCTTAGA</b> <b>CCCCAAAGGGTTATGCTA</b> TAGTATGGCAATAGGCAC <sup>4</sup>

**Tabla 5.** Plásmidos contruidos para este trabajo.

<sup>1</sup> Se indica el procedimiento utilizado para la construcción de los plásmidos. Las posibilidades son: a) Por PCR con los cebadores especificados a partir de un molde. Los sitios de restricción introducidos en los cebadores están subrayados. b) Mediante restricción enzimática con las enzimas indicadas. Se señala en la tercera y cuarta columna el vector y el inserto o molde utilizado.

<sup>2</sup> Plásmidos contruidos por el método del megaprimer (Sarkar & Sommer, 1990). El producto de PCR1 fue obtenido con los cebadores "a" ( en negrita se indican las mutaciones introducidas) y "c". Esta PCR se utilizó como megaprimer junto con el cebador "b" obtener para obtener el producto de PCR2. Para clonarlo, se realizó una digestión con SphI (incluido en la secuencia de *trwC* del producto de PCR amplificado y SalI (incluido en el cebador c)).

<sup>3</sup> Por recombinación mediada por Cre.

<sup>4</sup> Cebador reverso utilizado para amplificar el gen del h-mt-tARN<sup>A</sup><sup>9</sup>. En negrita está señalado la secuencia del terminador de la transcripción

### **3.3 Métodos de biología molecular**

#### **3.3.1. Extracción de ácidos nucleicos**

##### **3.1.1.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli***

Para las extracciones de ADN plasmídico de cepas de *E. coli* se utilizaron kits comerciales *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma) y/o *Plasmid Mini Kit* (Quiagen) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Cuando fue necesario obtener grandes cantidades de ADN plasmídico, se utilizó *Plasmid Midi* o *Maxi Kit* (Quiagen).

Para la extracción de bandas de gel de agarosa, se utilizó el *GenElute Gel Extraction Kit* (Sigma) y por último para limpiar el ADN o cambiarle el tampón se utilizó el *GenElute PCR Clean-Up Kit* (Sigma). También fue utilizado el producto *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen).

##### **3.3.1.2. Extracción de BACs a partir de *E. coli***

Las moléculas de ADN de gran tamaño son propensas a sufrir daños, por ello utilizamos un protocolo especial cedido por el grupo de genética del CNIO para la extracción de cromosomas artificiales bacterianos (BACs). A partir de un cultivo saturado, se centrifugaron 3 ml. El pellet fue resuspendido en 300 µl de la solución I (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH:8; EDTA 10 mM). Posteriormente se le añadieron 600 µl de la solución II (NaOH 0,2%; SDS 1%), se homogenizó por inversión (x10) y se colocó en hielo 5 minutos. A continuación, se adicionaron 500 µl de la solución III (acetato de potasio (KAc) 3M; ácido acético 5M), seguido de una nueva homogenización por inversión (x5) y una incubación en hielo de 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf de 2 ml, sin usar pipetas para evitar el del ADN. Se repitió la centrifugación y se colocó en un nuevo tubo eppendorf. En el siguiente paso, se realizó la precipitación del ADN por adición de 700 µl de isopropanol, seguido de la homogenización por inversión y una centrifugación a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue lavado con 500 µl etanol al 70%. Se volvió a centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos para eliminar los restos de etanol. Tras ser evaporado el etanol del pellet, éste fue resuspendido en 100 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ y posteriormente tratado con 1 µl de RNAasa (2 µg/ml), e incubado 30

minutos a 37°C. Se añadieron 3 volúmenes de etanol con 10% de sodio acetato (EtOH/10%NaAc) y se dejó a -80°C durante la noche. Finalmente, se realizó una centrifugación a 13.000 rpm durante 15 minutos, un lavado con etanol al 70% y una vez evaporado se resuspendió cuidadosamente agitando el tubo y sin pipeta en H<sub>2</sub>O MiliQ. Los BACs fueron conservados a 4 °C y -80 °C.

### **3.3.1.3. Extracción de ADN plasmídico a partir de levaduras**

Para el análisis de los transconjugantes de levaduras, fue necesario aislar el ADN plasmídico. Para ello se utilizó el Kit de Pierce Y-DER® *Yeast DNA Extraction Reagent Kit*, siguiendo tal cual el protocolo indicado por el fabricante.

### **3.3.1.4. Extracción de ARN total**

En los ensayos de conjugación a mitocondrias, se aisló el ARN de la mezcla de conjugación. Para ello se utilizó el reactivo TRIzol (Life Technologies), siguiendo el protocolo dado por el fabricante. Una vez terminada la conjugación se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de TRIzol al bloque de agarosa. La mezcla se homogeneizó por inversión durante aproximadamente 5 minutos (hasta verificar la disolución del bloque de agarosa). Seguidamente, se inició el paso de separación de las fases añadiendo 200 µl de cloroformo y agitando vigorosamente durante 15 segundos (se observa un color rosa suave a fucsia). Subsecuentemente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Terminada la centrifugación, se detecta una fase acuosa en la parte superior, donde se encuentra el ARN, una fase inferior de fenol-cloroformo y una interfase que contiene proteínas y restos celulares. La fase acuosa fue transferida a un tubo eppendorf al cual se le adicionó un volumen igual de isopropanol para precipitar el ARN. EL ARN se conservó cuando fue necesario por una noche a -20°C o -80°C. Posteriormente se llevó a temperatura ambiente (TA) y se realizó una centrifugación a 11.000 rpm 10 minutos a 4°C. Se quitó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol al 75% y seguidamente una nueva centrifugación pero a 8.000 rpm 5 minutos a 4°C. Se eliminó el etanol y se dejó secar a TA 30-45 minutos. El pellet fue resuspendido en DEPC H<sub>2</sub>O e incubado 10 minutos a 60°C para aumentar la solubilidad. Las muestras fueron cuantificadas y también se verificó la relación de DO 260/280 fuera ~ 2 para verificar la puerza, además un valor < 1,6 indica ARN no está solubilizado. El H<sub>2</sub>O MiliQ utilizada para diluir el etanol absoluto o para resuspender el ARN al final del proceso fue tratada con dietilpirocarbonato

(Sigma). Se preparaba adicionando 1 ml del reactivo a 1L de H<sub>2</sub>O MiliQ, reposo de 12 hrs y autoclavado.

Para eliminar posibles contaminaciones en las posteriores reacciones de RT-PCR y PCR, el ARN fue tratado con DNAsa. Por cada µg de ARN se añadió 1µl de DNAsa (Promega) y se incubó a 37°C 30 minutos. Finalizado el tiempo de incubación se añadió 1 µl de la solución stop (RQI ADN stop solution) para inactivar el enzima y se incubó a 65 °C durante 10 minutos.

Para determinar la concentración de las muestras de ácidos nucleicos se utilizó un *Nano-Drop Spectrophotometer ND-1000*.

### **3.3.2. Amplificación de ADN por PCR**

Para la amplificación de fragmentos de ADN por PCR, siempre que se requirió una alta fidelidad en la polimerización se utilizaron las polimerasas de alta fidelidad "*DNA KAPA HiFi*" (Kapa Biosystems) o "*TaKaRa LA Taq*" [TAKARA BIOTECHNOLOGY (DALIAN) CO.,LTD]. En el resto de las amplificaciones, como el caso de la comprobación de colonias, se utilizó la polimerasa Kapa Taq (Kapa Biosystem) o Taq (Sigma).

Las mezclas de PCR se realizaron siguiendo las recomendaciones de cada fabricante y en un termociclador iCycler (Biorad). Todos los programas de amplificación incluyeron un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C. Después se llevaron a cabo entre 26 y 40 ciclos de amplificación propiamente dicho, incluyendo cada uno un paso de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, un paso de hibridación a la temperatura adecuada en función de los diversos cebadores de 30 segundos, y un último paso de extensión a 72°C (o 68°C cuando se usó Takara) cuya duración depende del tamaño de ADN a amplificar (1 minutos por 1 Kb). Una vez concluida la amplificación las muestras fueron conservadas a 4°C.

#### **3.3.2.1. RT-PCR**

Se realizó transcripción reversa utilizando el kit *High-Capacity cDNA transcription* (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron usando cebadores específicos, siguiendo el protocolo del fabricante. En un volumen de 20 µl, el programa de transcripción reversa fue constante para todas las muestras: un primer paso a 25°C

durante 10 minutos, un segundo paso a 37°C durante 120 minutos, un tercer paso a 85°C durante 5 minutos y un último paso a 4°C, temperatura a la se mantuvieron hasta que se guardaron a -20°C.

### 3.3.2.2. PCR mutagénica

Se utilizó el método del "*megaprimer*" para realizar mutagénesis sitio específica (Sarkar & Sommer, 1990). Este método emplea tres cebadores en dos rondas de PCR. Sólo uno de los cebadores contiene la mutación deseada, los otros dos cebadores (cebadores externos) se localizan hacia el extremo 5' y 3' del sitio donde hibrida el cebador mutagénico. El cebador mutagénico y uno de los cebadores externos fueron utilizados para generar y amplificar un primer producto de PCR mutagénico (PCR<sub>1</sub>). Para optimizar el proceso este producto fue purificado y cuando fue necesario también se concentró. Esta PCR<sub>1</sub> o "*megaprimer*", fue utilizada con el otro cebador externo para amplificar la región de ADN deseada. Los cebadores externos fueron diseñados con una temperatura de hibridación significativamente inferior a la del cebador mutagénico.

### 3.3.3. Construcción de plásmidos

Los plásmidos fueron construídos con metodología estándar (Sambrook & Russell, 2001). En la Tabla 4 se muestran los plásmidos publicados utilizados en este trabajo. Algunos de ellos aún no han sido publicados<sup>2</sup>, por lo que se describe brevemente su construcción a continuación.

#### **pCre-TrwC<sub>705-895</sub>**

Para la construcción de este plásmido se amplificó en segmento de TrwC 705-895 desde el plásmido pSU2007 (Km<sup>R</sup>) con cebadores que añadían los sitios de restricción KpnI y SalI. Este fragmento de PCR fue clonado en los mismos sitios del vector CFPB (Parker & Meyer, 2007) en fase con el gen de la proteína *cre*.

#### **pHP173 y pHP176**

El plásmido pHP173 fue realizado cortando el fragmento EcoRI/KpnI del plásmido pHP171 (de Paz, 2010) y clonándolo en el plásmido pMEC06 (se describe a

continuación). De la misma forma, el plásmido pHP176 se obtuvo por restricción del fragmento EcoRI/KpnI del plásmido pHP154 y clonando este inserto en pMEC06.

**pHP154**, fue obtenido por restricción del fragmento EcoRI/KpnI del plásmido pMTX582 (de Paz, 2010) y clonado el plásmido pSU4637 (Moncalián *et al.*, 1999).

#### **pMEC06** (plásmidos de expresión)

El plásmido pMEC06 fue realizado cortando el fragmento NdeI/EcoRI del plásmido pMTX552 (de Paz *et al.*, 2010) y clonándolo en el plásmido pET29C.

#### **pMEC010**

Por el método del megaprimer se amplificó el gen de *trwB* codificado en el plásmido pSU4633 (Moncalián *et al.*, 1999) con un cebador forward que adicionaba la mutación *K421A* y otro reverse que contenía stop-BamHI. Esta PCR1 (megaprimer) y otro cebador que adicionaba el sitio NdeI, fueron utilizados para una segunda PCR. El producto de la PCR2 fue digerido con NdeI/BamHI y clonado en el vector pMEC07.

#### **pMTX570**

El plásmido pMTX570 fue realizado cortando el fragmento EcoRI/KpnI del plásmido pMTX524 (de Paz *et al.*, 2010) y clonándolo en el plásmido pMTX501 (Llosa *et al.*, 2003).

#### **pUZ2008**

Este plásmido es un derivado del plásmido natural pUZ8 (con la misma maquinaria conjugativa que RK2), con una mutación en el *oriT* que produce una disminución en la eficiencia de  $1 \times 10^3$  veces comparado con el plásmido salvaje.

#### **pY206**

El plásmido pY206 fue realizado amplificando el gen de *taxC* con cebadores específicos que añadían los sitios XbaI/KpnI a cada extremo. Éste fue clonado en fase en el extremo 5' del gen de *trwC* codificado en el plásmido pSU1621 (Guasch *et al.*, 2003).

En la Tabla 5 se hace referencia a las estrategias básicas que se han seguido para la construcción de plásmidos (Sarkar & Sommer, 1990). Los plásmidos han sido construídos por restricción, cortando con enzimas específicas un fragmento y clonándolo en los mismos sitios en un plásmido determinado. Alternativamente, los fragmentos fueron amplificados por PCR con cebadores específicos que añaden sitios de restricción. Estos productos de PCR fueron cortados con las enzimas correspondientes y clonados en los mismos sitios en un vector de clonación. En ambos casos se llevaron a cabo reacciones de ligación para unir el inserto y el vector (ver a continuación).

Los BACs, fueron construidos por recombinación mediada por la proteína Cre. Se explica en detalle en la sección 4.4 de Resultados y discusión.

### **3.3.3.1. Digestiones con enzimas de restricción**

Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo con enzimas de restricción de Fermentas o New England Biolabs, siguiendo las instrucciones establecidas por cada casa comercial. Los volúmenes típicos de la reacción variaron de 20 a 40  $\mu$ l, así como el tiempo de la reacción, entre 1-3 horas. Para aquellas que no presentaban efecto estrella también se realizaron digestiones durante toda la noche a 37°C. Todas las enzimas utilizadas en este trabajo presentaban una actividad enzimática óptima a 37°C. La inactivación se llevó a cabo incubando la reacción 20 minutos entre 65-80°C según la enzima. Para el proceso de clonación, los productos digeridos se purificaron usando los kits correspondientes.

### **3.3.3.2. Ligaciones**

Tanto los vectores de clonación como los insertos, provenientes de otros plásmidos o de reacciones de PCR, fueron digeridos con los enzimas correspondientes. Para aumentar la eficacia de la clonación y disminuir la posibilidad de obtener vectores re-ligados, se han eliminado los fosfatos terminales de los vectores digeridos. Se ha utilizado fosfatasa alcalina (Fermentas), siguiendo las indicaciones del fabricante, incubando la mezcla 30 minutos a 37°C. Posteriormente la enzima fue inactivada a 65°C durante 20 minutos.

Por lo general, las reacciones de ligación se llevaron a cabo poniendo una relación vector/inserto de 1:5, usando típicamente unos 100 ng de ADN. La enzima

utilizada fue la ligasa de ADN del fago T4 (Fermentas ó New England Biolabs), manteniendo la reacción a 16°C durante toda la noche. Como control negativo de las ligaciones se utilizó la misma reacción pero sin inserto, añadiendo el volumen equivalente de agua.

#### **3.3.4. Reacción de circularización de ARN**

El ARN tratado previamente con DNAsa, fue circularizado según (Koulintchenko *et al.*, 2006). Altas concentraciones de ARN favorecen la producción de concatémeros y bajas temperaturas favorecen la formación de especies simples. Las ligaciones para cada muestra se repartieron entre 3 a 5 tubos de reacción. Brevemente, en un volumen de entre 20-30 µl, se adicionó ~10 µl ARN (dependiendo de la concentración); tampón de T4 ARN ligasa concentración final de 1X; 2 U de ARN ligasa del fago T4 (New England Biolabs) y 5 µl de ATP (100mM) (New England Biolabs). El volumen final fue completado con agua DEPC. La mezcla de ligación fue incubada durante 3 horas a 37°C. Posteriormente el ARN ligado fue nuevamente precipitado, utilizando TRizol adaptando el protocolo descrito en el punto 4.4 para pequeños volúmenes. El ARN circular fue usado posteriormente como molde en la RT-PCR usando el cebador P1 específico para el ARN de transferencia arginina- mitocondrial humano (h-mt-tARN<sup>Arg</sup>).

#### **3.3.5. Secuenciación de ADN**

Para comprobar la secuencia de los clones obtenidos, las muestras de ADN se enviaron a MACROGEN Inc. ADN Sequencing Service (Seoul, Korea). También fueron secuenciados por el método de electroforesis capilar en gel, empleando *Applied Biosystems 3130X/ genetic analyzer* (Applied Biosystems, California, US). En este último caso, las secuencias se prepararon empleando *BigDye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.1.1.* (Applied Biosystems, California, US) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

#### **3.3.6. Electroforesis de ADN**

##### **3.3.6.1. Electroforesis de ADN plasmídico en geles de agarosa**

Para analizar y manipular el ADN plasmídico se realizaron electroforesis en geles de agarosa a concentraciones de entre el 0,7 y 4 % (p/v) según el tamaño del ADN

deseado. La agarosa se disolvió en tampón TBE 0,5 X a partir de TBE 10X (BioRad). Para la visualización del ADN se añadió a la agarosa bromuro de etidio a 0,25 µg/L, o SYBR safe (INVITROGEN) en una relación 1:100.000. Para cargar las muestras en el gel se utilizó el tampón de carga 6X [azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)] usando concentración final de 1X en el volumen de la muestra a cargar. Como marcador se utilizaron los patrones; *HyperLadder I* (Bioline) (10kb-0,2kb) o *Gene Ruler 1Kb DNA ladder* (Thermo Scientific) (10 kb-0,25kb). Para el análisis de los transconjugantes de mitocondrias se utilizó *Low Range DNA ladder* (Fermentas) (700 bp-25 bp). La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales (*BioRad*) en tampón TBE 0,5 X a voltajes comprendidos entre 80 y 120 V. Los geles se visualizaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta GelDoc 2000 y las imágenes se analizaron con el programa *Quantity One* (*BioRad*).

### **3.3.6.2. Electroforesis de campo pulsado**

Empleamos electroforesis de campo pulsado para analizar la integridad de BACs antes de ser manipulados, así como para analizar los transconjugantes de BACs conjugativos. Este tipo de electroforesis permite resolver moléculas de ADN de diferentes tamaños en un único gel. El campo eléctrico es aplicado alternadamente entre los pares de electrodos colocados alrededor del gel. Así, moléculas de ADN de hasta megabases (Mb) son capaces de reorientarse y moverse a diferentes velocidades a través de los poros del gel de agarosa. Se utilizó el equipo CHEF-DR<sup>®</sup> III (BIO-RAD). Los tampones para la carrera y los de carga fueron los mismos que los utilizados en el apartado anterior, al igual que la visualización del gel. Dada la duración de la carrera fue importante trabajar a bajas temperaturas para evitar el recalentamiento del tampón y con ello el cambio en la concentración salina. Se utilizó agarosa a concentraciones de entre el 1% y 1,2%.

Para el análisis de BACs se utilizó el Low Range PFG Marker (194kb -2 kb) (New England Biolabs). Las condiciones de electroforesis se establecieron siguiendo las recomendaciones del fabricante y ajustadas posteriormente para cada BAC en particular. Los rangos utilizados fueron los siguientes: Temperatura: 14°C; velocidad de la bomba: 70 (0,75 L/min); Voltios: 6-9; ángulo: 120 °C; pulso inicial: 0,5-1 segundos; pulso final: 6-7 segundos; tiempo de carrera: 4-12 horas.

### **3.4. Métodos microbiológicos**

#### **3.4.1. Medios de cultivo y conservación**

##### **3.4.1.1 Cultivo de *E. coli***

Para el cultivo líquido de *E. coli* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L) (Pronadisa). Como medio sólido se utilizó el LB-agar [se suplementa el LB con agar 1,5 % (p/v), (Pronadisa)]. Todos los medios de cultivo se esterilizaron autoclavándolos a 120 °C durante 20 minutos.

La conservación de las cepas de *E. coli* se realizó centrifugando 5 ml de un cultivo en fase estacionaria, resuspendido en 3 ml de una mezcla (1:1) glicerol-peptona (1.5%). Los 3 ml se dividieron en 2 criotubos y las células se mantuvieron a -20 °C y -80 °C.

Tanto para el crecimiento de bacterias en medio líquido como en medio sólido, se utilizaron medios selectivos. El cloranfenicol se disolvió en etanol y la rifampicina en etanol o DMSO. El resto de los antibióticos se prepararon disueltos en H<sub>2</sub>O MiliQ 1000 veces más concentrados que la concentración final utilizada. Concentraciones: Ap: 100 µg/ml de ampicilina sódica (Apollo); Cm: 10 o 25 µg/ml de cloranfenicol (Sigma); Km: 50 µg/ml de sulfato de kanamicina (Sigma); Nx: 25 µg/ml de ácido nalidíxico (Sigma); Sm: 30 o 300 µg/ml de sulfato de streptomina (Apollo); Gm: 10 µg/ml de sulfato de gentamicina (Normon); Rf: 100 µg/ml de Rifampicina (Sigma).

##### **3.4.1.2 Cultivo de levaduras**

Para iniciar los experimentos, las levaduras fueron crecidas en medio sólido *YP agar base* sin selección (triptona 20 g/L; extracto de levadura 10 g/L y agar bacteriológico 15 g/L). Los cultivos de levaduras se realizaron en el medio *YP base media* (triptona 20 g/L; extracto de levadura 10 g/L). Ambos medios se suplementaron con glucosa al 20 % (p/v) (Panreac).

En cambio, cuando fue necesario usar selección para auxótrofos se prepararon medios con una base de nitrógeno sin aminoácidos 6,7 g/L (sigma), y glucosa al 40% (P/V) (Panreac). A esto medios se adicionó, dependiendo del tipo de selección, histidina o triptófano, una mezcla de aminoácidos carente de uno de ellos 1,92 g/L

(sigma). Para obtener cultivos sólidos se agregó agar bacteriológico 20 g/L (Pronadisa).

La conservación de las cepas de levadura se realizó centrifugando 5-10 ml de los cultivos de fase estacionaria y los pellets se resuspendieron en una mezcla 1:1 de glicerol-peptona (1.5%). Las cepas de levaduras se conservaron a -20 °C y -80 °C.

### **3.4.2. Introducción de ADN por transformación**

Durante el desarrollo de esta tesis fueron utilizados dos métodos para transformar células de *E. coli*: electroporación y transformación por TSB. La electroporación se usó siempre que la muestra de ADN procedía de una mezcla de ligación, por ser una técnica más eficiente que la transformación por TSB. Ésta última fue utilizada rutinariamente para introducir plásmidos ya purificados. Aunque las levaduras pueden ser transformadas por electroporación, en esta tesis se ha utilizado el método de LiPEG para introducir ADN plasmídico en levaduras.

#### **3.4.2.1. Transformación de *E. coli* por TSB**

La transformación de *E. coli* por medio de TSB (LB pH 6,1; de PEG 10%, DMSO 5%, MgCl<sub>2</sub> 10mM y MgSO<sub>4</sub> 10mM) (Chung & Miller, 1988), es un método con el que se pueden conseguir frecuencias de transformantes de hasta 10<sup>8</sup> por µg de ADN. Para 10 ml de células competentes, se realiza una dilución 1/20 partiendo de un cultivo saturado, hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0,4-0,6. Las células son recogidas por centrifugación a 4000 rpm y resuspendidas en 1ml de TSB a 4°C. Se deja incubar en hielo durante 10 minutos y se hacen alícuotas de 100 µl. Seguidamente se añaden de 10 a 100 pg del ADN plasmídico y se incuba en hielo en un rango de 10 a 30 minutos. Pasado este tiempo se añaden 900 µl de TSB con glucosa 20 mM y se incuba a 37°C en agitación durante 60-90 minutos. Los transformantes se siembran en placas de LB-Agar con los antibióticos correspondientes.

#### **3.4.2.2. Transformación de *E. coli* por electroporación**

La transformación por electroporación tiene una frecuencia de transformación superior a la transformación por TSB, llegando a frecuencias de 10<sup>10</sup> transformantes por µg de ADN (Dower *et al.*, 1988). Esta técnica se utiliza para transformar

principalmente ligaciones y plásmidos de baja eficiencia de transformación. Aunque también para introducir moléculas de gran tamaño como BACs.

Para electroporar ADN es indispensable utilizar células electrocompetentes. Éstas fueron preparadas realizando una dilución 1/20 en un volumen final de 500 ml a partir de un cultivo saturado. Las células fueron crecidas hasta obtener una  $DO_{600}$  de 0,5-0,7. Tras recoger las células por centrifugación a 4000 rpm, 15 minutos a 4°C, se realizaron 2 lavados sucesivos con agua destilada MiliQ estéril a 4°C y un tercer lavado con glicerol 10%. Para el caso de las células de *E. coli* EL350, utilizadas para los ensayos de recombinación con BACs, los lavados se realizaron siempre en glicerol al 10% en agua destilada MiliQ. Los pellet lavados fueron resuspendidos en 1250  $\mu$ l de glicerol al 10% y se realizaron alícuotas de 50  $\mu$ l colocándolas inmediatamente en nieve carbónica y conservadas a -80°C.

En esta técnica es muy importante trabajar sin sales en el medio. Por ello se dializaron las mezclas de ligaciones, previamente a ser electroporadas. Se utilizaron filtros Millipore GS de 0,05  $\mu$ M de tamaño de poro en una placa Petri con agua MiliQ durante 20-30 minutos. El ADN fue recuperado generalmente en la mitad del volumen inicial. Se añadió entre 5-8  $\mu$ l de ADN a las células competentes. La mezcla se colocó en cubetas de electroporación de 0,2 cm o de 0,1 cm *Gene Pulser* de BioRad (Hercules, California) enfriadas previamente a 4°C. Para la transformación se utilizó un electroporador Micropulser™ de BioRad a 2,5 kV, 25 $\mu$ F y 200  $\Omega$ , en el caso de las cubetas de 0,2cm, y 1,8 kV, 25 $\mu$ F y 200  $\Omega$ , si se utilizaron las de 0,1 cm. Inmediatamente, aplicado el pulso eléctrico, se adicionó 1 ml de LB estéril a las cubetas, se mezcló por inversión y se transfirió a un tubo eppendorf de 1 ml. Las células fueron incubadas a 37°C en agitación para la expresión de la resistencia del antibiótico correspondiente (de 60 a 90 minutos, en función del antibiótico). Por último, se sembraron 100  $\mu$ l en medio selectivo.

### **3.4.2.3. Transformación de levaduras**

Para transformar levaduras se utilizó el método de LiPEG (Gietz & Woods, 2001). A partir de un cultivo saturado se realizó una dilución 1/50 en medio no selectivo hasta obtener una  $DO_{600}$   $\sim$ 0,8. Seguidamente se realizaron dos lavados y centrifugaciones sucesivas a 3500 rpm. Las células fueron posteriormente resuspendidas en 50 ml de LiSORB (Litio acetato 100 Mm , sorbitol 1M en TE) y

centrifugadas a 3500 rpm. El pellet fue resuspendido en 2 ml de LiSORB y DMSO 5% (Sigma). La mezcla fue alicuotada en 50  $\mu$ l y las alícuotas conservadas a -80°C.

Para transformar las levaduras con ADN plasmídico, una mezcla de 2  $\mu$ l de ADN más 2,5  $\mu$ l del carrier (esperma de salmón, ADN de cadena simple 10 mg/ml, Sigma) se añadió a las células de levaduras competentes. Finalmente se adicionó 300  $\mu$ l de LiPEG, y la mezcla homogenizada fue incubada a 30°C durante 30 minutos. Terminado este paso se colocó la mezcla a 42 °C 10 minutos (ambas incubaciones se realizaron sin agitación). Las células fueron recogidas por centrifugación a 3500 rpm y resuspendidas en 100  $\mu$ l de TE 1X para ser sembradas en el medio selectivo ( $his^-$  o  $trp^-$ ).

### 3.4.3. Manipulación de BACs.

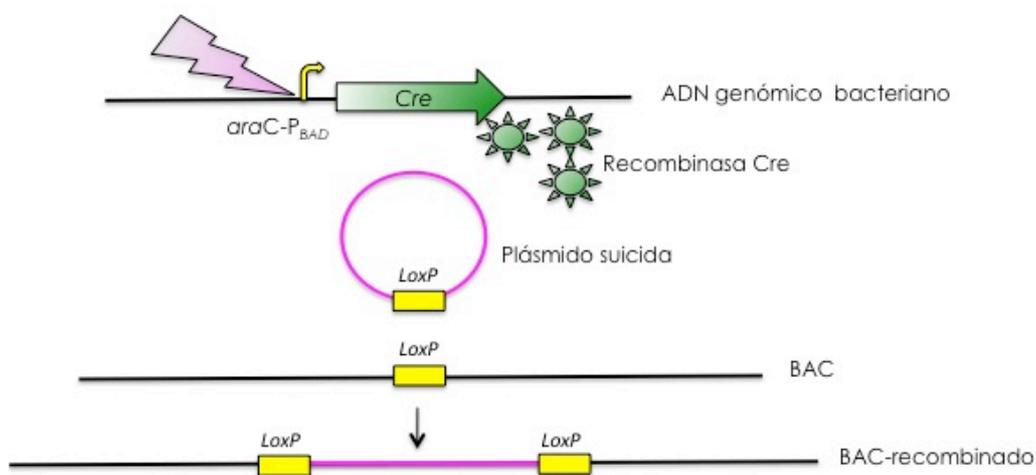
Para la construcción de cromosomas artificiales bacterianos (BACs) conjugativos se utilizó la cepa EL350. Ésta posee en su cromosoma el gen de la recombinasa *cre* bajo el control del promotor de la arabinosa. Dos moléculas de ADN que contengan sitios *loxP* pueden ser recombinadas en presencia de la recombinasa Cre (**Figura 27**).

Se partió del BAC cedido por la Dra. Sara Pérez-Luz (CBMSO) que codifica el gen de la *frataxina humana (FNX)* (140 Kb). Este BAC lleva un sitio *loxP* que facilita su manipulación genética. Este BAC fue recombinado con plásmidos suicidas que también contenía un sitio *loxP* y los elementos genéticos necesarios para conferirle la capacidad conjugativa.

En un primer paso se prepararon células electrocompetentes EL350, y seguidamente se introdujo por electroporación uno de los BACs. Una vez sembrados en placas de LB-Agar suplementado con Cm 20  $\mu$ g/ml, los transformantes fueron crecidos y analizados usando electroforesis de campo pulsado. Este paso es importante puesto que estas moléculas son propensas a sufrir reordenamientos estructurales. Se seleccionaron aquellos transformantes que mostraban un patrón correcto y se realizó con ellos una segunda ronda de células EL350 electrocompetentes que contenían el BAC.

Siguiendo el protocolo general de electroporación, se introdujeron en las células 5  $\mu$ l (~100 ng/ $\mu$ l) del plásmido a recombinar. Inmediatamente después del pulso eléctrico, se adicionó a la cubeta de electroporación 500  $\mu$ l de LB y las células

fueron transferidas a un tubo eppendorf en donde se indujo la expresión de *cre* añadiendo 5  $\mu$ l de arabinosa al 10% (Sigma). Para seleccionar los recombinantes, las células fueron centrifugadas a 12.000 rpm 3 minutos a TA y sembradas con selección para Ap 50  $\mu$ g/ml. Las placas se incubaron a 37°C, durante toda la noche. Sólo aquellos BACs que fueron recombinados en los sitios *loxP* al plásmido suicida son capaces de crecer en medio selectivo. Los BACs no recombinados no son capaces de replicar puesto que no son resistentes a ampicilina. Por otro lado los plásmidos no integrados por ser suicidas no son capaces de replicar en la cepa EL350.



**Figura 27.** Esquema de recombinación sitio específica mediada por Cre. La cepa EL350 fue electroporada primeramente con el BAC a modificar. En una segunda ronda, se electroporó el plásmido suicida y se indujo la expresión de la recombinasa Cre (estrellas verdes) con arabinosa. Ésta es capaz de reconocer los sitios *loxP* (amarillo) en ambos elementos genéticos y recombinarlos.

### 3.4.4. Conjugaciones

#### 3.4.4.1. Conjugación de *E. coli* a *E. coli*

Las conjugaciones se realizaron como se describe en Grandoso y col, (2000). El protocolo general de conjugación utilizado en esta tesis consistió en mezclar 100-200  $\mu$ l de células donadoras y receptoras, ambas provenientes de un cultivo en fase estacionaria y/o fase exponencial (dependiendo del ensayo). Las células fueron lavadas por separado para eliminar los antibióticos donde habían sido crecidas. En un tubo eppendorf con 1 ml de LB se añaden donadoras y receptoras y se centrifugan 1

minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante es eliminado, para repetir los lavados con LB, lo cual asegura la eliminación de restos de antibiótico. El pellet fue resuspendido en 30-50  $\mu$ l de LB. Dado que siempre hemos trabajado con plásmidos derivados del grupo IncW, IncN o IncP (con *P-like pilus*), las conjugaciones se han realizado en medio sólido (Bradley, 1980) sobre filtros de nitrocelulosa (GS Millipore de 0,22  $\mu$ m de tamaño de poro y 25 mm de diámetro). Estos fueron previamente colocados sobre placas de LB-Agar. La mezcla de conjugación fue colocada sobre el filtro e incubada a 37°C durante 1 h. Finalizada la incubación, los filtros fueron retirados con pinzas estériles e introducidos en 2 ml de LB. La mezcla de conjugación, fue resuspendida y a partir de ella se realizaron diluciones sucesivas. Las células fueron sembradas en medio selectivo para donadoras y transconjugantes. Las frecuencias de conjugación fueron determinadas calculando el número de transconjugantes por donador. Para calcular los valores medios, se ha realizado la sumatoria de los logaritmos neperianos de las frecuencias sobre el número de mediciones.

$$\text{Frecuencia}_n = \frac{\text{Número de transconjugantes}}{\text{Número de donadoras}}$$

$$\text{Frecuencia}_{(n+1)} = \text{Exp} ((\text{LN}(F_1) + \text{LN}(F_2) + \text{LN}(F_3) \dots + \text{LN}(F_{n+1}))) / N$$

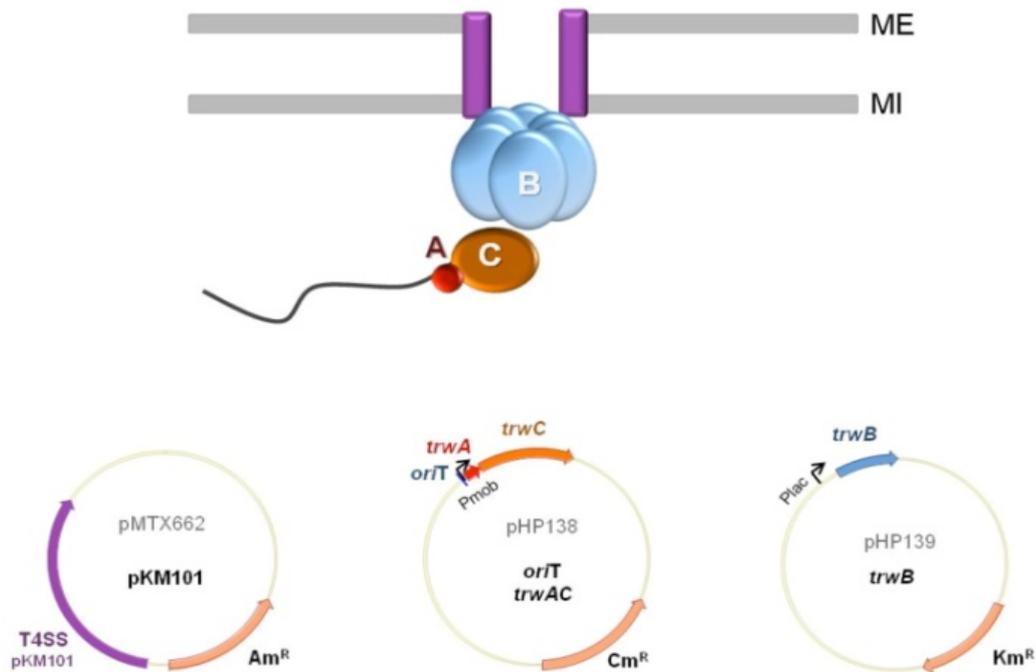
Dado que la desviación estándar de los propios ensayos suele variar un 50%, sólo diferencias de al menos 1 log han sido consideradas como fenotipos significativos. Las frecuencias fueron calculadas con un N= 3-10 experimentos independientes.

A partir de estas condiciones generales de conjugación, a continuación se detallan los protocolos de conjugación de algunos experimentos en particular.

### **Ensayos de conjugación en condiciones limitantes de *TrwB***

Estos ensayos fueron realizados como se describe en de Paz y col, (2010) con modificaciones. Brevemente, las células donadoras D1210 (*lacI<sup>q</sup>*) fueron transformadas con: i) los plásmidos derivados de pHP139 (*Plac-trwB*), ii) un plásmido movilizable que contiene el *oriT* y codifica para *trwA* y *trwC* (pHP138) u otro plásmido

igual sin el gen de *trwA* (pDEL017), iii) y un tercer plásmido pKM101 $\Delta$ *mob* que aportaba el T4SS de pKM101 (**Figura 28**). Las conjugaciones fueron llevadas a cabo en ausencia de IPTG (expresión de *trwB* reprimida) o en presencia de IPTG 0,5 mM en un cultivo previamente diluído (1/20) durante dos horas (expresión inducida). En estos ensayos la mezcla de conjugación se realizó como se indica en el protocolo general descrito más arriba. Puesto que las células provienen de un cultivo en fase exponencial se ha adicionado un volumen mayor de células donadoras inducidas para igualar las cantidades (donador - receptor). Las mezclas de conjugación fueron colocadas en placas de LB, con o sin IPTG según se tratase de células inducidas o reprimidas respectivamente, e incubadas 1 hora a 37°C. Finalizada la incubación se procedió con el protocolo del punto general.

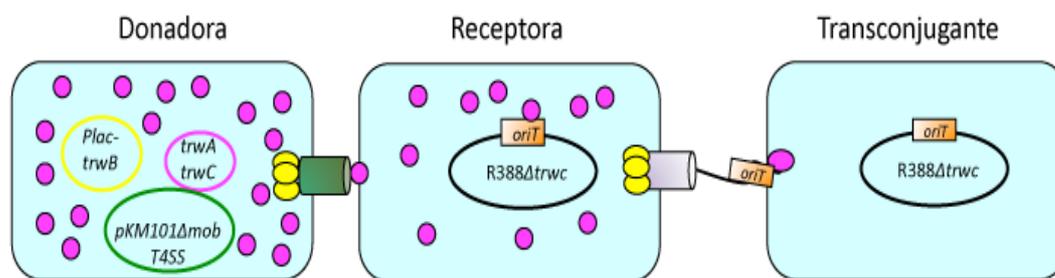


**Figura 28.** Esquema representativo del sistema limitante. Uno de los plásmidos codifica el T4SS de pKM101 (morado). Otro de ellos es el plásmido movilizable, que además codifica las proteínas TrwA (roja) y TrwC (naranja). Y por último, el tercer plásmido codifica TrwB (azul) y/o mutantes, bajo el control de un promotor Lac. Imagen tomada de de Paz, 2010.

### Ensayos triparentales

Los ensayos de conjugación triparentales fueron realizados para comprobar la translocación de la proteína TrwC en ausencia de ADN, como se describió en de Paz y col, (2010) con modificaciones. Las conjugaciones fueron llevadas a cabo igual que en el protocolo general, con la excepción de que las mezclas de conjugación se mantuvieron 2 h a 37°C. Las células donadoras D1210 (*lacI<sup>q</sup>*) fueron transformadas con tres plásmidos como en el apartado anterior, pero en este caso ninguno de los ellos contenía un *oriT*, con lo cual no es posible la transferencia de ADN. Estas células fueron mezcladas con una segunda cepa (DH5 $\alpha$ ), portadora de un derivado de R388 deficiente en TrwC (plásmido pSU1445). El transporte de TrwC a esta segunda cepa fue detectado por la complementación de la mutación en *trwC* y la subsecuente movilización del plásmido pSU1445 a una tercera cepa receptora (HMS174) (**Figura 29**). Se calcularon las frecuencias de conjugación como el número de transconjugantes por donadora.

También se utilizaron ensayos triparentales para determinar la translocación de fusiones TrwC-TaxC; la combinación de plásmidos utilizada en este caso se describe en detalle en la sección 4.3. de Resultados y discusión

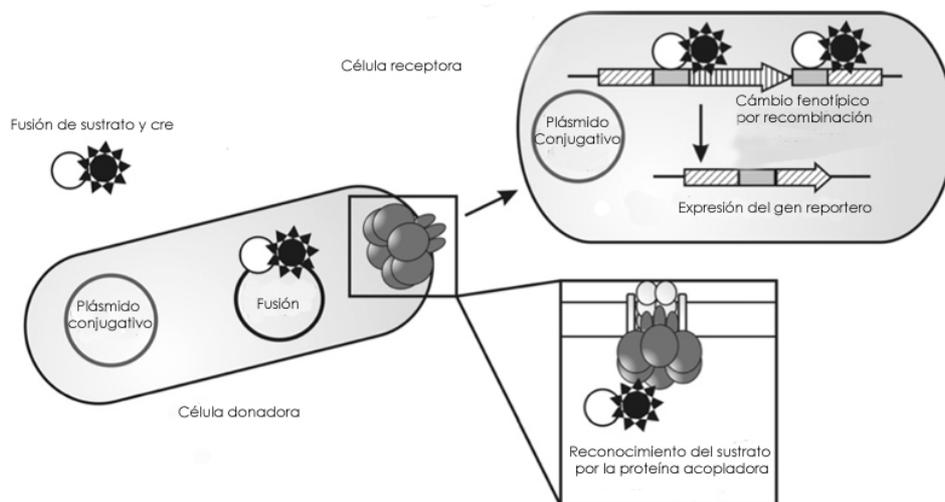


**Figura 29.** Esquema del ensayo triparental. En la célula donadora se representó en amarillo el plásmido de expresión de *trwB*; en fucsia el plásmido que expresa *trwA-trwC* y en verde el plásmido que codifica para el T4SS de pKM101. En la célula receptora se representa en negro el derivado de R388 deficiente en TrwC que en presencia de la misma es movilizado, generando un transconjugante.

### **Ensayos de CRAFT (Craft Assay for Protein translocation) de translocación de proteínas**

Para el mapeo de la señal de translocación de TrwC, utilizamos el ensayo CRAFT (Vergunst *et al.*, 2005, Parker & Meyer, 2007) tal y como fue diseñado por Lang y cols (2010) para determinar las señales de translocación de F-TraI (**Figura 30**).

Las células donadoras (*E. coli* MS411) fueron transformadas con los plásmidos que aportaban la maquinaria conjugativa de R388 (pSU2007; pSU1445 y pSU711) y posteriormente con los plásmidos que codifican las fusiones de *cre-trwC* y/o sus fragmentos. Estas células fueron crecidas durante toda la noche en cultivos con la selección adecuada a 37°C.



**Figura 30.** Esquema ilustrado del ensayo CRAFT. La recombinasa Cre se representa como un círculo blanco fusionada en este caso a la proteína o fragmento proteico conocido (TrwC o sus fragmentos). En la célula donadora se ensambla el T4SS y la T4CP que reconocerá específicamente el sustrato (TrwC o fragmentos). A través del T4SS se transfiere al plásmido conjugativo y se transloca Cre y sus fusiones a la célula recipiente. La transferencia de proteína es detectada por la recombinación mediada por Cre generando un cambio en el fenotipo en los transconjugantes (Lang & Zechner, 2012).

100  $\mu$ l de células donadoras fueron centrifugadas 3 minutos a 12.000 rpm y resuspendidas en 1 ml de LB sin antibiótico. De este ml se tomaron 800  $\mu$ l para medir la  $DO_{600}$ . Los 200  $\mu$ l restantes fueron conservados y utilizados para ajustar en un volumen final de 900  $\mu$ l la  $DO_{600}$  a 0.005. Las células con dicha  $DO_{600nm}$  fueron incubadas 1 h a 37°C, alcanzando una  $DO_{600} \sim 0.02$ . Para las células receptoras,

CSH26Cm::LTL, se tomaron 2 ml del cultivo en fase estacionaria y se centrifugaron a 12.000 rpm 3 minutos. El pellet fue resuspendido en 1 ml de LB. Se realizó una dilución 1/10 para medir su  $DO_{600}$  y ajustarla a 2. Para la mezcla de conjugación se adicionaron 100  $\mu$ l de células receptoras a los 900  $\mu$ l restantes de donadoras. La mezcla se centrifugó 3 minutos a 12.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó el pellet sobre los discos de conjugación, colocados previamente en placas de LB-Agar, durante 2,5 h a 37°C. Finalizada la conjugación, se realizaron las diluciones sucesivas y se sembraron en placas de LB-agar con los antibióticos correspondientes para detectar donadoras [Km (50  $\mu$ g/ml) o Gm (10  $\mu$ g) y Ap (100  $\mu$ g/ml), dependiendo del plásmido que aportaba el T4SS], los transconjugantes [Tc (8 $\mu$ g/ml) y Km (50  $\mu$ g/ml), o Km X-Gal (50  $\mu$ g/ml)] y los recombinantes, causados por la translocación de la fusión Cre [Cm (10  $\mu$ g/ml)]. La frecuencia de conjugación o de translocación se calculó como el número de transconjugantes o recombinantes por donadora, respectivamente.

Antes de realizar los ensayos de conjugación, se realizó una prueba para determinar la funcionalidad la recombinasa Cre e indirectamente, la estabilidad de las proteínas de fusión. Para ello se prepararon células competentes de CSH26Cm::LTL y se electroporaron con las diferentes proteínas de fusión, tal como se describe en la sección 3.4.2.2, utilizando 10 ng de ADN plasmídico. Se sembraron 100  $\mu$ l en Cm y Ap para seleccionar los recombinantes y 100  $\mu$ l en Ap para seleccionar los transformantes. La relación ApCm/Ap (recombinantes/transformantes) se utilizó como una medida estimativa y para poder realizar comparaciones entre los diferentes mutantes.

#### **3.4.4.2. Conjugación de *E. coli* a levaduras**

Los ensayos de conjugación a levaduras se realizaron tal como se describe en Bates y col, (1998). Las células donadoras fueron *E. coli* DH5 $\alpha$  (R388) o S17.1 $\lambda$  (RP4), dependiendo del sistema conjugativo a ensayar. Éstas fueron transformadas con los plásmidos movilizables y replicativos en levaduras. Las bacterias donadoras fueron diluidas 1/20 y crecidas hasta una  $DO_{600}$  de 0,6. Las levaduras receptoras fueron obtenidas a partir de un cultivo exponencial medio. Para ello se inocularon 4 x 10<sup>6</sup> cel/ml de células provenientes de un cultivo saturado hasta alcanzar una fase exponencial media,  $DO_{600}$  de 0,45 ~ 4 hs a 30°C. Los cultivos de levaduras se realizaron en 25 ml de YPD + glucosa 20%. La mezcla de conjugación se realizó

tomando el volumen correspondiente a  $2,8 \times 10^8$  bacterias o levaduras/ml y se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 rpm o 6000 rpm, respectivamente. Ambos pellets fueron resuspendidos en 500  $\mu$ l de YPD+ glucosa 20%. Las bacterias fueron transferidas al tubo que contenía las levaduras y mezcladas por inversión. Posteriormente se realizó una centrifugación a 6000 rpm 3 minutos. El sobrenadante fue sucesivamente centrifugado a 12.000 rpm para verificar que las bacterias donadoras hayan quedado en la mezcla de conjugación junto con las levaduras. La mezcla de conjugación se resuspendió en 50  $\mu$ l YPD + glucosa 20% y se colocó sobre discos de conjugación en placas de YPD-Agar + glucosa 20%. La conjugación se llevó a cabo durante 1 hora a 30°C.

Seguidamente, la mezcla fue resuspendida en 2 ml de medio selectivo de levaduras + glucosa al 40%. Se realizaron diluciones sucesivas para sembrar 100  $\mu$ l de células donadoras en placas de LB-agar Km (50  $\mu$ g/ml) y Ap (100  $\mu$ g/ml). Éstas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Los transconjugantes fueron plaqueados a partir de la mezcla de conjugación. 0,5-1 ml fueron sembrados en 5-10 placas (100  $\mu$ l /placa) en medio selectivo de levaduras sin triptófano + Nx (20  $\mu$ g/ml) para los transconjugantes con *oriT-RP4* y con Sm (300  $\mu$ g/ml) para los transconjugantes con *oriT-R388* e incubadas a 30°C durante 5-6 días. Las frecuencias se calcularon como el número de transconjugantes de levaduras por bacterias donadoras. Los transconjugantes fueron verificados extrayendo el ADN plasmídico de las levaduras y amplificándolo en células de *E. coli*. Sobre éste se realizó una PCR específica para el *oriT* y análisis de restricción.

Durante estos ensayos de conjugación, se realizaron de forma simultánea conjugaciones a bacterias receptoras. Cuando se testó la transferencia del *oriTw*, adicionalmente se observó la transferencia del plásmido pSU2007 (derivado de R388 Km<sup>R</sup>). Para ello se usaron como células receptoras, D1210 y se plaquearon en Sm 300  $\mu$ g/ml y Ap o Km respectivamente. Para la transferencia de los derivados de *oriT-RP4* se utilizaron células receptoras DH5 $\alpha$  y se plaqueó en Nx Ap.

#### **3.4.4.3 Conjugación de bacterias a mitocondrias aisladas**

Las bacterias donadoras (Ecsf2a\_3) fueron transformadas con los correspondientes plásmidos. En este trabajo utilizamos el plásmido pUZ2008 Tc<sup>r</sup> Km<sup>r</sup> (derivado de RK2 del grupo IncP), el cual aporta la región de transferencia, pero

autotransferido a muy baja frecuencia debido a una mutación en su *oriT*, y un plásmido movilizable por este sistema  $Ap^r$  (pDEL047-*oriT* o pDEL048+*oriTp*). Previamente a realizar las conjugaciones entre bacterias y mitocondrias se realizaron conjugaciones bacteria-bacteria y los transconjugantes obtenidos fueron analizados por restricción.

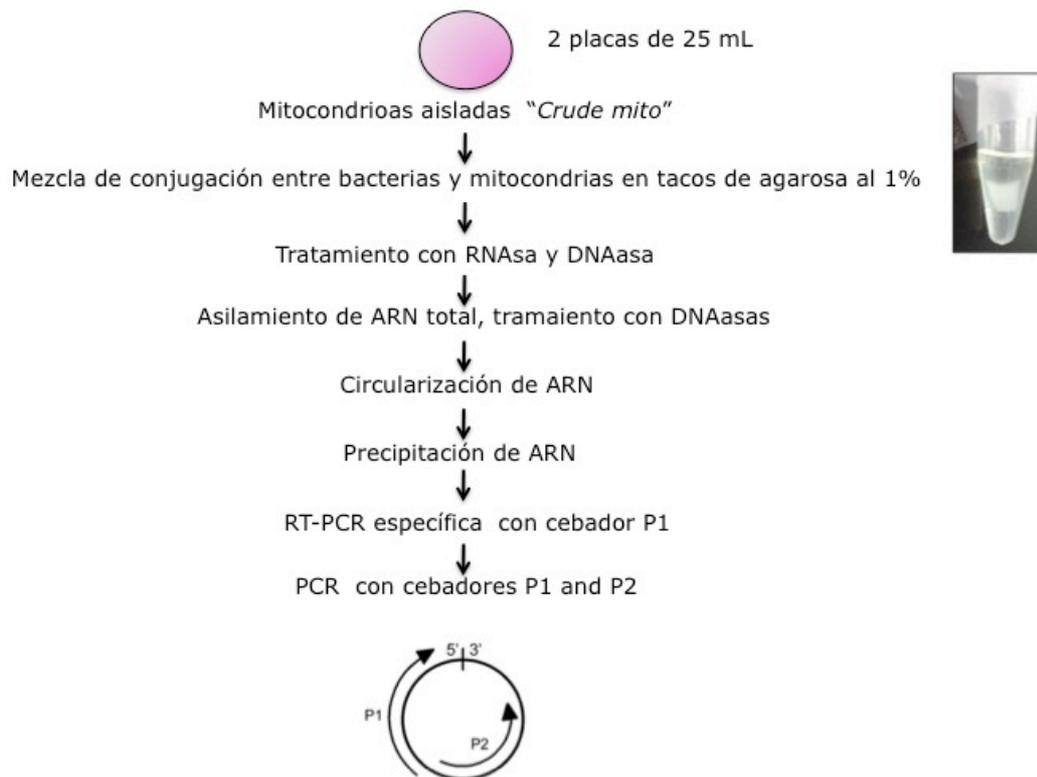
Para realizar las conjugaciones a mitocondrias fue necesario aislar las mitocondrias (sección 3.5) justo antes de comenzar la conjugación. Mitocondrias provenientes de dos placas de 25 ml de células 3T3-T7RNAP confluentes fueron aisladas y utilizadas como receptoras. El total de mitocondrias fue recuperadas al final del proceso en microtubos de 1,5 ml. Allí mismo fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de LB sin antibiótico. 200  $\mu$ l de bacterias donadoras crecidas en fase exponencial  $DO_{600} \sim 0,5-0,6$  se adicionaron a las mitocondrias y la mezcla se homogeneizó con pipeta. Seguidamente se centrifugó a 12.000 rpm a TA. El sobrenadante fue eliminado y la mezcla fue resuspendida en 25  $\mu$ l de LB y 25  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. El tubo fue colocado en hielo por 1 minuto hasta la solidificación del bloque de agarosa. Seguidamente se adicionaron 500  $\mu$ l de LB, sin deshacer el bloque y se incubó por 5 horas a 37°C y a 100 rpm. Posteriormente el sobrenadante fue eliminado y el bloque de agarosa fue incubado con 300  $\mu$ l de LB; 50  $\mu$ l de tampón de DNAsa; 200  $\mu$ l de DNAsa (promega) y 5  $\mu$ l de RNAsa (1 $\mu$ g/ml), a 37°C durante 2 h. Terminada la incubación se eliminó el sobrenadante y se procedió a realizar la extracción de ARN, tal como se describió en la sección 3.3.

Para este caso particular, no hemos detectado transconjugantes individuales, sino que se ha detectado el evento conjugativo, a través de la detección de una molécula de ARN producida a partir del ADN transferido por conjugación a las mitocondrias. Dado que el ADN conjugativo codifica para el ARN de transferencia de arginina mitocondrial humana (h-mt-tARN<sup>Arg</sup>), esta molécula además de ser transcrita puede ser procesada y madurada dentro de la mitocondria. El procesamiento fue observado a través del corte en el extremo 5' y 3', mientras que la maduración se observa por la adición de CCA en el extremo 3' de la molécula. En la **Figura 31**, se describen los pasos del protocolo. Como puede observarse en un primer paso se aísla desde el bloque de agarosa el ARN total. Éste es circularizado como se describe la sección 3.3. Seguidamente, se realizó una nueva extracción de ARN y precipitación. Al final del proceso el ARN total circular fue resuspendido en un volumen de 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC y utilizado como molde para una RT-PCR específica con el cebador P1. De esta

forma se obtiene una molécula de ADN lineal con la secuencia circular del h-mt-tARN<sup>Arg</sup>. Subsecuentemente el ADN complementario (ADNc) fue amplificado por PCR estándar utilizando los cebadores P1 y P2 específicos. Estos cebadores adicionan una cola hacia sus extremos 5' y 3' para facilitar el clonaje.

Los fragmentos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 4%. Los productos de PCR con un tamaño de ~ 100 pares de bases (pb) representaron las especies simples con la secuencia circular del h-mt-tARN<sup>Arg</sup>, mientras que las de mayor tamaño representaban concatémeros.

Todas las bandas de interés fueron extraídas del gel y clonadas en el sistema pGEM-T. Las ligaciones fueron dializadas y electroporadas en células DH5 $\alpha$  o DH10B. Los clones fueron sembraron en placas de Ap y X-gal y/o, IPTG. Las colonias blancas fueron replicadas y analizadas por secuenciación.



**Figura 31.** Esquema del experimento de conjugación entre bacterias y mitocondrias.

### 3.5. Métodos de Biología celular

#### 3.5.1. Cultivos celulares

En este trabajo hemos utilizado la líneas celular humana HeLa y 3T3 de ratón que había sido transfectada establemente con un plásmido resistente a blasticidina que codifica para *Cox3-leader-T7RNAP*. Las células fueron crecidas en DMEM con GlutaMax (Gibco), suplementadas con un 10 % de suero fetal bovino (Cambrex) , a 37°C y 0,5 % CO<sub>2</sub>. Los cultivos de 3T3 transfectadas fueron crecidas en presencia de blasticidina 3 µg /ml.

#### 3.5.2. Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias que fueron aisladas para realizar los ensayos de conjugación se obtuvieron a partir de 2 placas confluentes de 25 ml de células 3T3 salvajes o 3T3-7RNAP. Las células se despegaron con 3 ml de tripsina e incubaron 3 minutos a 37°C, seguidamente fueron lavadas con DMEN + suero fetal bovino (SFB) 10% y centrifugadas a 3000 rpm 3 minutos. Cuando las mitocondrias fueron aisladas para realizar Western blot se utilizó una placa y las células fueron despegadas con una espátula, lavadas y centrifugadas del mismo modo. El pellet fue lavado y resuspendido con 6 ml de DMEM+ 10% SFB. Se realizó un lavado en el tampón VANCE (manitol 225 mM, HEPES-KOH 25mM, EGTA 1mM, pH:7,4) con inhibidores de proteasa "Complete mini-EDTA free" (Roche). El pellet fue resuspendido nuevamente en el mismo tampón y transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml en donde se realizaron 2 lavados con VANCE. Las células fueron homogeneizadas en un homogeneizador de 2 ml (B glass homogenizer, kontes). La mezcla fue transferida a un tubo eppendorf y centrifugada a 4500 rpm 10 minutos a 4°C. Las mitocondrias fueron recogidas del sobrenadante, colocadas en un nuevo tubo y centrifugadas en las mismas condiciones. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio donde, tras una centrifugación a 13.000 rpm 15 minutos, se obtuvo el "crude mito". Es en éste último paso dónde se obtienen las mitocondrias aisladas.

Cuando las mitocondrias eran utilizadas como receptoras de conjugación, el pellet fue resuspendido en 100 µl de LB, mientras que para realizar Western blot éste fue resuspendido en 100 µl de VANCE con inhibidores de proteasa.

### **3.5.3. Ensayos de inmunofluorescencia**

Las células 3T3-T7RNAP (3T3 transfectadas estables con un plásmido que expresa la polimerasa T7 dirigida a mitocondrias) y otras fueron crecidas sobre cubreobjetos hasta una confluencia del 80%. En un primer paso se realizó la tinción específica de mitocondrias, utilizando mitotracker (100  $\mu$ M en DMEM) (INVITROGEN). Para ello se eliminó el medio y se lavó la placa con PBS 1X para eliminar cualquier resto de SFB. Posteriormente, las células fueron incubadas con mitotracker 1/10.000 durante 20 minutos a 37°C y lavadas sucesivamente con PBS 1X 3 veces por 5 minutos. Dado que el mitotracker es fotosensible, siempre se trabajó protegiendo la placa de la luz. Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (en PBS) durante 20 minutos a TA. Seguidamente se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Las células fueron permeabilizadas con 2 ml metanol frío 20 minutos y lavadas con PBS 1X 3 minutos. Los cubreobjetos fueron colocados en recipientes adecuados para la incubación con los anticuerpos específicos. Se incubó con la solución de bloqueo (2,5% NGS, 0,01% tween 20 en PBS1X) durante 1 h a TA. Tras eliminar la solución, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario Mouse-anti-T7RNAP 1/10.000 (Novagen) durante 3 h a TA y en agitación. A continuación se realizaron 3 lavados sucesivos, para eliminar los anticuerpos no pegados, y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (INVITROGEN) 1 hora a TA. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Las células adheridas al cubreobjetos fueron colocadas sobre portaobjetos de cristal y montadas con glicerol al 50%. Para la detección de la T7 RNA polimerasa, se utilizó un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX70.

### 3.6. Métodos Bioquímicos

#### 3.6.1. Purificación de Proteínas

La purificación de Trw $\Delta$ N70 y de sus mutantes (K275A, K398A, K275A K398A, K421A, K421A D425A), se llevó a cabo según el protocolo descrito por Moncalián *et al.*, 1999 con algunas modificaciones. Los vectores de expresión fueron introducidos en la cepa C41 (DE3) para la sobreexpresión de las diferentes proteínas a partir de los plásmidos descritos en las Tablas 4 y 5.

A partir de una dilución 1/20 de un cultivo saturado, se inició el cultivo de 4 litros de células en LB con antibiótico en agitación a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600} \sim 0,5-0,6$ , momento en el cual se indujo la expresión con IPTG 1mM durante 6 h a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm durante 15-20 minutos. Los pellets fueron congelados a -80°C hasta el momento de su utilización. Al comenzar la purificación, los pellets fueron descongelados en hielo y resuspendidos en 60 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM MgCl<sub>2</sub> 5 mM; PMSF 0,001%) suplementado con ATP 5 mM, sacarosa 10% (p/v), lisozima 0,8 mg/ml, benzamidina 2,5 mM y un coctel de inhibidores de proteasas. Tras 45 minutos de incubación en hielo se añadió el mismo volumen de tampón A suplementado con tritón X-100 al 0,5% y NaCl 1M. El lisado fue ultracentrifugado a 138,000g (45.000 rpm) a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se diluyó con tampón B (Tris-HCl 50mM pH 7.6; EDTA 0,1 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; PMSF 0,001%) hasta una concentración final de NaCl de 150 mM. La muestra se cargó en una columna de fosfocelulosa P11 (35 ml) previamente activada y equilibrada con tampón B suplementado con NaCl 150 mM. La proteína unida, fue eluída incrementando la concentración salina del tampón B a 1 M de NaCl. Se recogieron las fracciones que contenían Trw $\Delta$ N70 o sus mutantes. A continuación se diluyeron a 150 mM NaCl con tampón B. Esta solución fue cargada en una columna HiTrap-SP de 5 ml equilibrada con tampón B con 150 mM NaCl. La elución se llevó a cabo con un gradiente de 120 ml (150 mM – 1M NaCl). Se recogió la proteína y se concentró en centricones YM30 hasta un volumen de 4 ml. Finalmente, los 4 ml de proteína se cargaron en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 equilibrada con tampón PIPES-NaOH 50 mM pH 6,0; EDTA 0,1 mM; NaCl 100 mM, Mg<sub>2</sub>Cl 2 mM, glicerol 10% (v/v); PMSF 0,001%. Las fracciones fueron alicuotadas y conservadas a -80°C en glicerol al 20%.

Los marcadores de peso molecular para electroforesis de proteína, las columnas HiTrap-SP, HiLoad 16/60 Superdex 200 y Superdex 200 PC 3.2/30 fueron adquiridos de Amersham Pharmacia y la resina de fosfocelulosa P11 de Whatman International Ltd. EL fluoruro de fenilmetilsulfonido (PMSF), el tritón X-100, la benzamidina, la lisozima, el ATP y la seroalbúmina bovina (BSA) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El cóctel de inhibidores de proteasas fue adquirido de Roche. Los centricones a YM30 Amicon, y filtros de 2 µm a Millipore.

La proteína TrwA-h (TrwA fusionada histidina), fue cedida por la Dra. Inmaculada Matilla. Su purificación realizó de acuerdo a Tato y col, (2007).

### **3.6.2. Visualización y cuantificación de proteínas**

#### **3.6.2.1. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-PAGE**

Para la visualización de proteínas, se realizaron electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, dependiendo de la proteína, en rangos del 10-15%. Los geles se prepararon con acrilamida:bisacrilamida 39:1 (BioRad) y las electroforesis se llevaron a cabo en sistemas Mini-PROTEAN II (BioRad). Las muestras se mezclaron con 1/2 de su volumen del tampón de carga (SAB 5X: Tris-HCl pH 6,8, 250 mM, SDS 5 % (p/v), glicerol 50 % (p/v), azul de bromofenol 0,05 % (p/v), DTT 250 mM) (Sambrook & Russell, 2001) y se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Se realizó la electroforesis en un tampón carrera (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v)).

Una vez realizada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Azul Brillante Coomassie R250 0,1%(p/v), metanol 40% (v/v) y ácido acético glacial 10% (v/v) durante 15 minutos con agitación a TA. Los geles se destiñeron en una solución que contenía metanol al 40% (v/v) y ácido acético glacial al 10% (v/v), nuevamente a temperatura ambiente y con agitación.

Los geles fueron visualizados en el transiluminador GelDoc 2000 (Biorad) y se analizaron con el programa Quantity One (BioRad).

#### **3.6.2.2. Detección de proteínas por Western blot**

Se ha utilizado la técnica de Western blot para la detección de proteínas sin purificar, mediante la utilización de anticuerpos específicos, según el método descrito

por Towbin y col, (1979). Se han detectado así proteínas producidas tanto en bacterias como en células eucariotas, por lo cual la toma de muestra es diferente para cada caso.

Para la detección de las proteínas TrwA\*, TrwB\*, TrwD, TrwK, y TrwJ codificadas a partir de un derivado de R388, se obtuvieron extractos totales de células de *E. coli* D1210 transformadas con los plásmidos correspondientes de cada ensayo (Tablas 3 y 4). Las células fueron crecidas hasta alcanzar una  $DO_{600} \sim 0,6$ . 1 ml de cada cultivo fue centrifugado, resuspendido en 100  $\mu$ l de tampón de carga 2x SDS (Sambrook & Russell, 2001) y hervidas por 5 minutos. Las muestras fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Cuando se detectaron TrwB\* y/o TrwA\* codificadas en plásmidos bajo el control de un promotor lactosa, una vez que el cultivo alcanzara la DO de 0,6, las células fueron separadas en dos tubos para comenzar la expresión de las proteínas adicionando IPTG 0,5 mM. Al finalizar la incubación por 3 horas se midieron nuevamente las  $DO_{600}$ .

En cuanto a la detección de las proteínas TrwC, Cre y/o fusiones Cre-TrwC, los extractos celulares fueron directamente obtenidos a partir de un cultivo saturado de células *E. coli* D1212 o MS411, previamente transformadas con los plásmidos correspondientes a cada ensayo.

Para la detección de T7RNAP se aislaron las mitocondrias tal y como se describe en la sección 3.5. Las mitocondrias obtenidas a partir de una placa confluyente de 25 ml de células 3T3-T7RNAP o 3T3 salvaje fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y resuspendidas en 30  $\mu$ l de tampón VANCE. Posteriormente se midió la concentración de proteínas y 30  $\mu$ g totales fueron mezclados con tampón de carga- 2x SDS, hervidas por 5 minutos y separadas en un gel de acrilamida.

Las muestras, tras ser corridas en un gel de SDS-PAGE, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. Para realizar la transferencia se empleó un Mini Trans-Blot (BioRad). Esponjas, papel Whatman, y membranas han de ser empapadas en tampón de transferencia TGM (Tris 20 mM, glicina 15 mM y metanol al 20%, pH 9,2) antes de comenzar el armado del cassette, en el siguiente orden: esponja- papel de filtro-gel de poliacrilamida-membrana de nitrocelulosa- papel de filtro- esponja. El cassette, se

introduce en una cubeta con TGM refrigerado a 4°C para evitar el sobrecalentamiento. La transferencia se llevó a cabo durante 1h o 1h 30 minutos (según tamaño de la proteína) a 180 mA cuando la transferencia se realizaba para dos geles o a 360 mA para uno solo en una cámara fría. Se comprobó la transferencia de las proteínas por tinción de la membrana con Ponceau-S durante 5 minutos a TA y posterior lavado con agua destilada. También se han teñido los geles una vez que las proteínas habían sido transferidas con comassie blue.

Las membrana fueron bloqueadas con *membrane blocking agent* (Amersham) al 3% en TBST (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5) en agitación a 4°C durante la noche. Posteriormente se incubó durante 1-1,5 horas en TBST suplementado con *membrane blocking agent* al 1,5% y el anticuerpo primario a la dilución que se indica en la **Tabla 6**.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con TBST 1X de 15 minutos cada uno. Seguidamente, se incubó 1h a TA con el segundo anticuerpo (Tabla 4), Goat-IgG conjugado con peroxidasa, en TBST 1X suplementado con 1,5 % de *membrane blocking agent*. Finalmente se realizaron 3 lavados durante 15 minutos, con TBS 1X.

Para la detección de las proteínas específicas se utilizó el kit SuperSignal West Pico mol (Pierce), el cual se basa una reacción quimioluminiscente entre la peroxidasa del anticuerpo secundario y el luminol del sustrato, emitiendo luz a una longitud de onda de 428 nm que fue detectada en un ChemiDoc™ System (BioRad) al cabo de 5 minutos. La detección se realizó dentro de un rango de 20 minutos, condiciones óptimas del reactivo.

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia o casa comercial</b>
Anti TrwA	1:5000	(Moncalián, no?)
Anti TrwB	1:5.000	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
Anti TrwC	1:10.000	(Grandoso <i>et al.</i> , 1994)
Anti TrwD	1:50.000	(Rivas <i>et al.</i> , 1997)
Anti TrwJ	1:10.000	(Sastre, 1996)
Anti TrwK	1:5.000	(Peña <i>et al.</i> , 2011)
Anti Cre	1:10.000	Novagen
Anti T7RNAP	1:10.000	Novagen
<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia o casa comercial</b>

Goat IgG anti-rabbit conjugado con peroxidada	1:10.000	Sigma-Aldrich
Goat- IgG anti-mouse-conjugado con peroxidada	1:10.000	Roche

**Tabla 6.** Lista de anticuerpos y diluciones utilizadas

### 3.6.2.3. Cuantificación del número de moléculas de TrwB por célula

La estimación del número de moléculas de TrwB por célula se realizó mediante ensayos de Western blot. A partir de un cultivo o/n de células D1210 con el derivado de R388 resistente a Km (pSU2007) se realizó una dilución 1/5 y se cultivó hasta alcanzar una DO de 0,6. 1 ml de este cultivo fue centrifugado y resuspendido en 100  $\mu$ l de tampón de carga. 20  $\mu$ l fueron cargados en un pocillo y corridos en un mismo gel con 5, 10 y 20 ng de TrwB $\Delta$ N70 previamente purificada. Dado que 0,5 unidades de densidad óptica representan aproximadamente  $10^8$  células/ ml, se calculó la cantidad de células en los 20  $\mu$ l corridos en el gel, que fue  $2,64 \cdot 10^7$  células. Utilizando el programa *Quantity-One* se realizó una curva de calibrado con las cantidades conocidas de TrwB $\Delta$ N70 detectadas por Western blot. Por extrapolación de la curva de calibrado se calculó la concentración de TrwB en  $2,64 \cdot 10^7$  células (20  $\mu$ l cargados en el gel). Usando el número de Avogadro y el dato del peso molecular de un monómero de TrwB fue calculado el número de monómeros de TrwB por célula.

### 3.6.2.4. Cuantificación de proteínas

*Método de Bradford.* Es un método rápido y sencillo de uso generalizado en los laboratorios de bioquímica (Bradford, 1976). Para medir la concentración de proteínas se utiliza el reactivo *Protein Assay* (BioRad), que contiene Azul Brillante Coomassie G-250 en ácido fosfórico y metanol. El ensayo está basado en el cambio de color del agente al unirse a las proteínas. Bajo condiciones ácidas es más estable en la forma doblemente protonada, que es roja. Sin embargo, al unirse a las proteínas, las interacciones hidrofóbicas e iónicas estabilizan la forma aniónica, que es azul. De esta forma, se produce un cambio de color visible que es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra y que puede ser fácilmente cuantificado por colorimetría.

La curva de calibrado se realizó utilizando BSA (Sigma) como referencia en un rango de 0-40  $\mu$ g, dependiendo del ensayo a realizar. Las proteínas fueron diluidas en

el tampón que ha sido utilizado para realizar el ensayo correspondiente hasta un volumen de 50  $\mu\text{l}$  y se añadió  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta alcanzar un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . 900  $\mu\text{l}$  de una relación 1:3,5 del reactivo de Bradford (BioRad) fueron añadidos a los 100  $\mu\text{l}$  de proteína. Tras ser homogeneizados se incubaron 10 minutos a TA antes de medir la  $\text{DO}_{595}$ . Simultáneamente a la preparación de las muestras de la recta patrón, se prepararon las muestras problema.

*Método del ácido bicinconínico (BCA).* Las muestras de proteína pueden ser cuantificadas mediante  $\text{BCA}^{\text{TM}}$  Protein Assay Kit (Pierce). Este kit combina la reducción del catión  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  de la proteína en un medio alcalino con la detección colorimétrica de alta sensibilidad de los cationes  $\text{Cu}^{+1}$  por el ácido bicinconínico. La respuesta es dependiente de la concentración de proteínas y por lo tanto se puede realizar una curva de calibrado con BSA (0-40  $\mu\text{g}$ ), como se explicó para el método de Bradford. Las muestras de proteínas fueron mezcladas con los tampones donde se mantienen las proteínas en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . A éste se le añadió 900  $\mu\text{l}$  de la mezcla del reactivo A (BCA) y B (sulfato cúprico), preparada en una relación 50:1. La mezcla de reacción fue incubada 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y luego la absorbancia fue leída a  $\text{DO}_{562\text{nm}}$ .

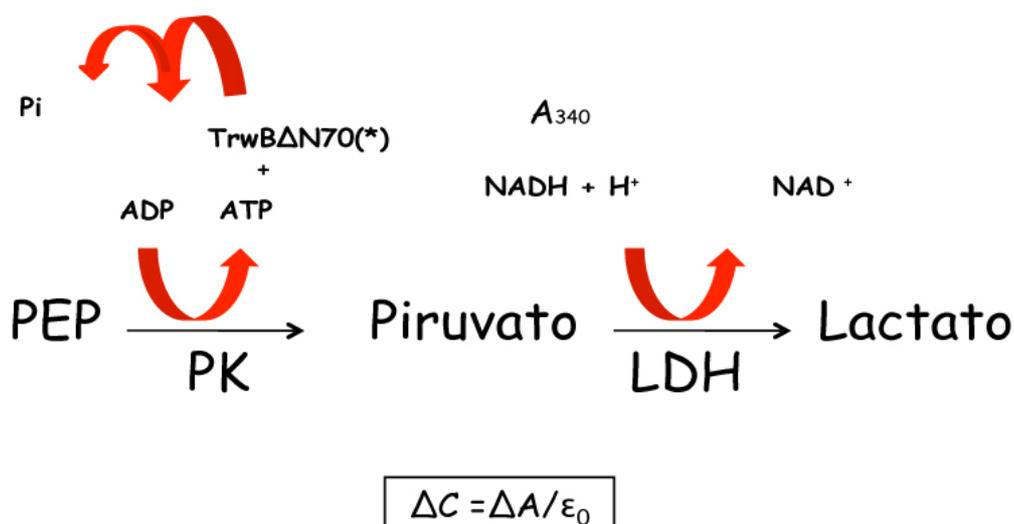
Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1630 y las concentraciones de proteínas fueron calculadas a partir de la curva patrón en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 3.6.3. Ensayo de actividad ATPasa

La hidrólisis de ATP de Trw $\Delta$ N70 y sus mutantes fue cuantificada utilizando el ensayo de acoplamiento enzimático descrito previamente por Tato *et al.*, 2007 (**Figura 32**). La actividad ATPasa fue medida en presencia/ ausencia de 5  $\mu\text{M}$  de ADN circular de cadena simple (*M13 mp18 viral single-stranded ADN* o  *$\phi$ x174 Virion ADN* New England Biolabs), 10  $\mu\text{M}$  de ADN doble cadena (pUC8), y/o 0,2  $\mu\text{M}$  TrwA (tetramero). La concentración de Trw $\Delta$ N70 0,3  $\mu\text{M}$  (monómero) fue constante.

La mezcla de reacción contenía Pipes-NaOH 50 mM, pH 6.2; NaCl 75 mM; MgCl 10 mM; glicerol 10%; fosfoenolpiruvato 0,5 mM (Roche); NADH 0,25 mM (Roche), piruvato kinasa 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , lactato deshidrogenasa 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Roche o Sigma Aldrich enzymatic mix) y ATP 5 mM (Sigma). Cuando la actividad se midió en presencia de

TrwA, se realizó una incubación previa de la proteína con la mezcla de reacción durante 10 minutos a 37 °C en un volumen final de reacción de 150 µl. Las reacciones fueron siempre iniciadas tras la adición de TrwBΔN70 0,3 µM (monómero). La actividad ATPasa fue medida indirectamente por el decaimiento de la absorbancia de NADH a 340 nm en un rango de 10 minutos a 37°C en un espectrofotómetro UV-1603 (Shimadzu). La actividad ATPasa fue calculada como los nmol de ATP hidrolizados por minuto y miligramo de proteína.



**Figura 32.** Esquema del ensayo acoplado para medir actividad ATPasa. El ATP es regenerado al mismo tiempo que se produce la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato gracias a la enzima piruvato quinasa (PK). Esta regeneración evita la inhibición por producto (ADP) y que el ATP sea un factor limitante durante la reacción. El piruvato formado es convertido a lactato mediante la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>, debido a la acción de una segunda enzima, la L-lactato deshidrogenasa (LDH). Así, siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm, la actividad ATPasa de la proteína es calculada indirectamente con los datos obtenidos del cambio en la concentración de NADH ( $\Delta C$ ) producido por un cambio de absorbancia ( $\Delta A$ ) y conociendo el  $\epsilon_0$  (coeficiente de extinción).

#### 3.6.4. Ensayos de retardo en geles de agarosa

Los ensayos de retardo en gel (*Electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) de ADN inespecífico por TrwBΔN70 y sus mutantes han sido realizados como se describe en (Moncalián *et al.*, 1999a). 200 ng de ADN plasmídico (pUC8) fueron incubados con concentraciones crecientes de proteína calculada como monómero (5-15 µM) por 10 minutos a 37°C en el tampón de unión (Tris-HCl 20 mM , pH 6,2; EDTA 0,1 mM, KCl

100 mM). La mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa al 0,8% que contenía Sybr Safe ADN gel Stain (INVITROGEN). Las mezclas se corrieron a 100 V durante 2:30 h. Cada 30 minutos se visualizó el retardo en el aparato Gel-Doc. Como control negativo de unión fue utilizada albúmina sérica bovina (BSA) 15  $\mu$ M.

### 3.6.5. Ensayos de interacción TrwB –TrwA

Las construcciones basados en el vector de expresión pGEX conteniendo *trwB $\Delta$ N75* o sus mutantes (descritos en las Tablas 4 y 5) fueron transformados en la cepa C41 (DE3) para la sobreexpresión de las diferentes proteínas de fusión.

A partir de una dilución 1/20 de un cultivo saturado, se inició el cultivo de 50 ml de células en LB con Ap en agitación a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600} \sim 0,5$ . En este momento se indujo la expresión con IPTG 0,5 mM durante 2 h a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. Los pellets fueron conservados a -80 °C hasta su utilización. La ruptura celular se realizó descongelando los pellets y resuspendiéndolos en 1 ml de TES (Tris-HCL 50 mM; pH 8; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM), suplementado con lisozima 1,0 mg/ml; benzamidina 2,5 mM y 0,001% PMSF. Tras 45 minutos de incubación en hielo se añadió el mismo volumen de tampón tritón (Tris-HCL 50 mM pH 7,6; EDTA 0,1 mM; NaCl 1 mM; tritón X-100 al 0,5%). Las células fueron centrifugadas a 45.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se conservaron a 4°C.

Las fusiones de GST-TrwB $\Delta$ N75 salvaje y mutantes fueron purificadas como se describió en Llosa y cols, (2003). Brevemente, la fracción soluble obtenida fue mezclada con la resina Glutathione-Sepharose (Pharmacia), preparada previamente siguiendo las especificaciones del fabricante. La unión de las fusiones a la resina se llevó a cabo en tubos eppendorf durante toda la noche con agitación orbital a 4°C. Por centrifugación a 550 x g 10 minutos a 4°C se eliminó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados sucesivos con PBS 1X para eliminar las proteínas no unidas. 20  $\mu$ g de la proteína TrwA-h o BSA (utilizada como control negativo) fueron diluidas en tampón A (Tris 50 mM, pH 7,6; NaCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; BSA 1 g/ml), añadidas a la resina e incubadas a TA por 1 h en un volumen final de 15  $\mu$ l. Finalizada la incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 15 minutos y fueron centrifugadas nuevamente para eliminar TrwA-h no unida. La elución de las proteínas unidas a la resina se realizó incubando con glutatión reducido 30 mM en un volumen de 15  $\mu$ l 20

minutos a TA y sin agitación. En este paso el glutatión reducido se une a la resina y las proteínas unidas son desplazadas y recuperadas en el sobrenadante por centrifugación. La elución se realizó 3 veces en cada muestra y las proteínas fueron cuantificadas. Cantidades equivalentes de proteínas fueron cargadas en un gel de acrilamida desnaturalizante. Se tomaron muestras en cada paso del proceso para su visualización en gel.

### 3.7. Programas informáticos

BLAST: The Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este programa ha sido utilizado para comparar secuencias de nucleótidos o de proteínas con las existentes en la base de datos.

GenTHREADER (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Jones, 1999) (McGuffin & Jones, 2003). Este programa ha sido utilizado para el análisis de similitud de plegamiento de la región de TrwC<sub>705-895</sub>.

PHYRE: The Protein Homology/analogy Recognition Engine (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) (Kelley & Sternberg, 2009). Este programa fue utilizado para el análisis de similitud de plegamiento de la región de TrwC<sub>705-895</sub> y análisis de la estructura secundaria.

SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/>) (Schwede *et al.*, 2003, Arnold *et al.*, 2006). Este ha sido utilizado para modelar la estructura del fragmento de TrwC<sub>705-895</sub>.

VECTOR NTI Advance 10 (Invitrogen). Este programa ha sido utilizado para anotar secuencias de ADN y proteínas, diseñar cebadores y construir mapas plasmídicos, entre otras aplicaciones.

Quantity One 1-D Analysis Software (Biorad), fue utilizado para la detección de proteínas por Western blot y ácidos nucleicos.

## **4. Resultados y discusión**



#### 4.1. Relación estructural entre la proteína acopladora y el T4SS

Se han resuelto las estructuras cristalinas de varios componentes individuales del T4SS, como las de las ATPasas citoplasmáticas VirB11 de *H. pylori* (Yeo *et al.*, 2000), el dominio C-terminal de VirB4 de Tps (Wallden *et al.*, 2012) o la estructura de un dímero de VirB8 de *Bs* de la región periplásmica (Terradot *et al.*, 2005). También ha sido resuelta la estructura monomérica del componente del *pilus* VirB5 del sistema de pKM101 (Yeo *et al.*, 2003). A partir de estudios de fraccionamiento celular, algunos de estos componentes han sido identificados a su vez formando subcomplejos como VirB8-VirB9-VirB10, VirB2-VirB5-VirB7 o VirB7-VirB9 (Krall *et al.*, 2002). En los últimos años se ha resuelto por criomicroscopía la estructura del *core complex* del T4SS de *At* (Fronzes *et al.*, 2009), y la estructura cristalina de la capa externa del *core complex* de pKM101 (Chandran *et al.*, 2009). El último gran avance en este campo, ha sido la estructura tridimensional del complejo formado por un monómero de VirB4 unido al *core complex* VirB7-VirB9-VirB10 de pKM101, utilizando microscopía electrónica de tinción negativa (Wallden *et al.*, 2012). Las anteriores estructuras han incrementado de forma exponencial el conocimiento de los T4SS, además, han demostrado que T4SS pertenecientes a sistemas muy diferentes mantienen una arquitectura común. Puesto que los componentes de los distintos T4SS presentan homología en la organización genética, en la topología de cada proteína en la membrana y en la conservación de las interacciones proteicas, las anteriores estructuras son útiles para explicar las posibles interacciones entre componentes de otros T4SS, e incluso para diseñar modelos funcionales (Llosa *et al.*, 2009). Sin embargo, no todos los T4SS presentan exactamente los mismos componentes, y las interacciones entre éstos pueden diferir de un sistema a otro así como el orden de ensamblaje.

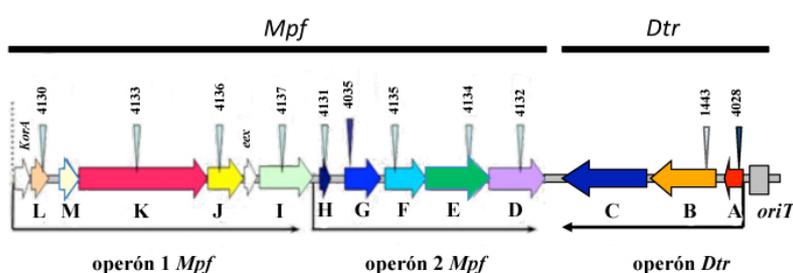
Una cuestión pendiente a determinar, es hasta qué punto la T4CP es parte integral de los T4SS o funciona como un elemento independiente.

Es frecuente que en complejos multiproteicos, la ausencia de alguna de las proteínas que lo forman pueda afectar a la estabilidad de las otras. Así, mediante el ensayo de Western blot, se puede abrir una vía para el estudio de la integridad estructural de los T4SS cuando alguna de sus piezas está ausente, o cuando cambiamos una proteína por su homóloga de otro sistema.

En este trabajo contábamos con un grupo de 10 mutantes construidos mediante la inserción del transposón Tn5*tac1* en los genes *trw* de la región *Dtr* y *Mpf* de R388. A excepción del mutante *trwL*, que tiene efecto polar en la expresión de *trwk*, el resto de mutantes no afectan a la expresión de otros genes *trw* (de Paz *et al.*, 2005). Por ello en algunos Western blots mostrados a continuación, el mutante en *trwL* (*virB2*) ha sido omitido por no poder separar su efecto del de la ausencia de TrwK. Con el resto de mutantes del T4SS de R388 con los que contábamos y los anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio, realizamos una serie de Western blots para analizar el efecto de la ausencia de cada proteína en la estabilidad de otras, y la complementación estructural con otras homólogas del T4SS Trw de *Bartonella tribocorum* (*Bt*). Nos interesaba determinar, especialmente, si los niveles de la T4CP también se veían afectados por la presencia o ausencia del resto del T4SS.

Los distintos mutantes de la región *trw* de R388, con y sin la presencia del cósmico pAB2, que codifica para el sistema Trw de *Bt*, fueron transformados en cepas de *E. coli* D1210. Posteriormente se obtuvieron los extractos proteicos totales de cultivos en fase exponencial. Con el objetivo de comparar la producción de proteínas por los distintos mutantes, se ha realizado una estimación del número de células a cargar por pocillo. Las muestras fueron analizadas en SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa y analizadas posteriormente por Western blot.

Aunque no se pudieron analizar con todos los anticuerpos deseados, teníamos una representación muy interesante de anticuerpos para proteínas que son expresadas tanto en la región *Dtr* como en los dos operones de la región *Mpf*, representando desde el elemento más conservado de los T4SS hasta el más variable (**Figura 33**).



**Figura 33.** Esquema de la regiones *Mpf* y *Dtr* de R388. Imagen adaptada de de Paz, 2010.

Cada letra representa la proteína Trw (ej., J=TrwJ). Las puntas de flecha azul indica el lugar donde ha sido mutado cada gen. El número en la parte superior indica el plásmido pSU correspondiente (Tabla 4 de metodología).

#### 4.1.1. Estudios previos

El Dr. Héctor de Paz comenzó el estudio de la integridad estructural del T4SS del plásmido R388, detectando los niveles de proteínas producidas por el grupo de mutantes *trw* de R388 cuando alguna de las piezas que forman el T4SS estaba ausente o cuando era intercambiada por su homóloga en el sistema Trw de *Bt* (de Paz, 2010).

Sus resultados indicaron que los niveles de la proteína TrwD (VirB11) estaban afectados mayoritariamente por la ausencia de TrwL (VirB2), TrwH (VirB7) y TrwE (VirB10) del T4SS de R388. Los niveles de TrwK (VirB4) no variaban significativamente en los diferentes mutantes *trw*, mientras que los niveles de TrwJ (VirB5) eran indetectables en todos los mutantes *trw*, salvo para el mutante en *trwH* (*virB7*). Cuando los mutantes de los genes *trw* de R388 eran complementados con el cósmico pAB2, los niveles de TrwD (VirB11) no parecían ser reestablecidos, con la excepción del mutante en *trwJ* (*virB5*) que mostraba mayores niveles de TrwD (VirB11). Sin embargo, los niveles de la proteína TrwJ (VirB5) fueron reestablecidos para la mayoría de los mutantes *trw* (de Paz, 2010).

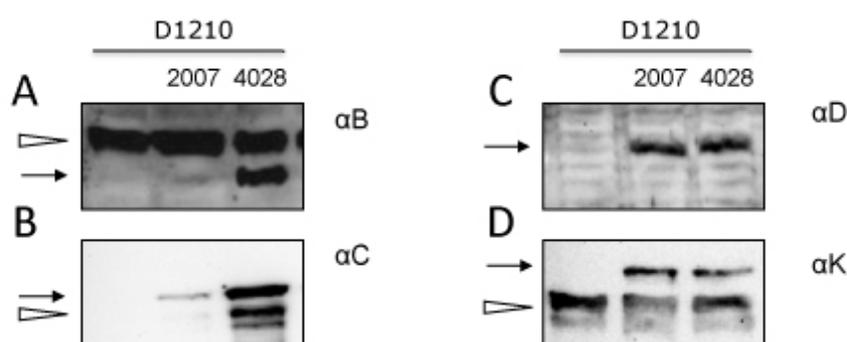
En esta tesis se ha ampliado el trabajo anterior, incluyendo el mutante en la T4CP, *trwB* (*virD4*) y en *trwG* (*virB8*) del sistema Trw de R388. Con el fin de que los resultados fuesen comparables e intentando disminuir al máximo la variabilidad que se obtiene en la señal de los ensayos de Western blot, se han repetido los mismos incluyendo los nuevos mutantes con todos aquellos previamente analizados en de Paz, (2010). Los resultados presentados a continuación coinciden con los obtenidos en el anterior trabajo, aunque se han detectado pequeñas diferencias que pueden ser atribuidas a la diferencia en la metodología utilizada para la toma de muestra. Así por ejemplo, en este trabajo las muestras fueron tomadas partiendo de cultivos en fase exponencial de células *E. coli* D1210, mientras que en el anterior trabajo, fueron tomadas a partir de un cultivo de fase estacionaria de células *E. coli* DH5a.

#### 4.1.2. Efecto del replicón en los niveles de proteínas Trw

Los estudios previos fueron realizados con una serie de mutantes mediante la inserción del transposón Tn5*tac1* en los genes *trw*, pero lamentablemente, no existía ningún mutante en el gen de *trwG* (*virB8*). Dada la importancia de TrwG (VirB8) en los diferentes T4SS estudiados, nos parecía muy interesante añadir este mutante en el estudio de integridad del T4SS de R388. En el laboratorio contábamos con un mutante en el gen de *trwG* (*virB8*) por inserción del interposón  $\Omega$ , plásmido pSU4035 (Bolland *et al.*, 1990). Este mutante posee el replicón p15A, mientras que el resto de los mutantes utilizados tienen el replicón de R388, de muy bajo número de copias.

Con el fin de comparar las cantidades de proteínas Trw producidas en este replicón, con las producidas por los mutantes derivados de R388 (pSU2007), se realizaron Western blot con anticuerpos contra algunas proteínas Trw de la región *Dtr* y *Mpf*, producidas por los plásmidos pSU4028 (Bolland *et al.*, 1990) y pSU2007. El primero es similar a pSU4035 pero con la inserción del interposón  $\Omega$  en *trwA* por lo tanto no afecta a los operones de la región *Mpf*. El segundo es un derivado Km<sup>R</sup> de R388, utilizado como control de los mutantes por inserción de Tn5*tac1* en R388, que son Km<sup>R</sup>.

En la **Figura 34** se observa que las proteínas codificadas la región *Dtr*, TrwB y TrwC, eran detectadas en mayor cantidad en el plásmido pSU4028 en comparación con las detectadas en el plásmido pSU2007.

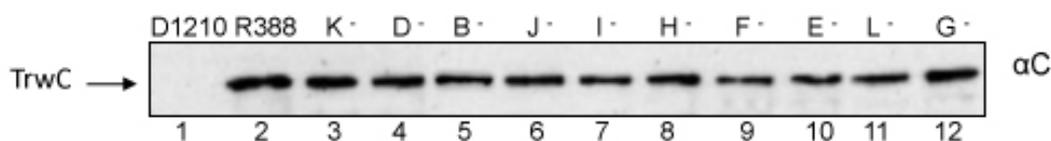


**Figura 34.** Efecto del replicón en los niveles de proteínas Trw. D1210 sin plásmidos (control de inespecificidades) pSU2007: R388 Km<sup>R</sup>. pSU4028:: $\Omega$ *trwA*. La flecha negra delgada representa la proteína detectada A) TrwB, B) TrwC, C) TrwD, D) TrwK. La punta de flecha blanca indica inespecificidades.  $\alpha$  indica el anticuerpo primario utilizado ( $\alpha$ B: anti-TrwB,  $\alpha$ C: anti-TrwC,  $\alpha$ D: anti-TrwD,  $\alpha$ K: anti-TrwK).

La mayor producción de proteínas *Dtr* en el plásmido pSU4028 puede ser una consecuencia de la ausencia de la proteína represora del promotor *P<sub>trwA</sub>*, *TrwA*. En contraste, aquellas producidas por la región *Mpf*, *TrwD* (*VirB11*) (operón 2) y *TrwK* (*VirB4*) (operón 1) (Fig.33), presentaron niveles comparables en ambos plásmidos. Por ello razonamos que en el caso de detectar alguna diferencia en los niveles de proteínas *Mpf* para el mutante en *trwG* (*virB8*), éstas han de ser comparables a las producidas por los derivados de R388.

#### 4.1.3. Influencia de los mutantes *trw* de R388 en los niveles de *TrwC*

La relaxasa *TrwC*, codificada en la región *Dtr* de R388, es indispensable para la conjugación pero dispensable para la formación del T4SS. En la **Figura 35**, se observa que los mutantes en los diferentes genes *trw* producen cantidades comparables de la proteína *TrwC* y a su vez comparables a la del plásmido R388. Este ensayo constituye un control interno de la cantidad de proteína producida por la región *TrwW*.



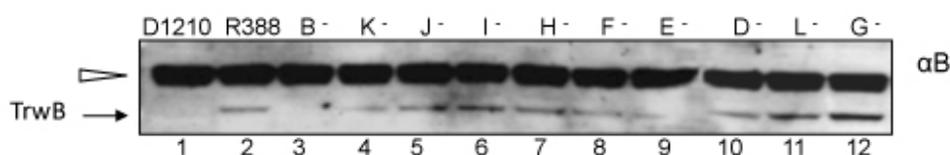
**Figura 35.** Western blot con anti-*TrwC*. Se observan los niveles de *TrwC* en extractos celulares de *E. coli* D1210. En cada calle se indican los mutantes de R388 representados por la letra de la proteína *Trw* que no codifican.  $\alpha$ C: anticuerpo primario anti-*TrwC*. La flecha negra representa la proteína detectada .

#### 4.1.4. Influencia de los mutantes *trw* de R388 en los niveles de *TrwB*

Los T4SS presentan hasta 3 ATPasas citoplasmáticas. Estas proteínas aportan la energía necesaria para la secreción de sustratos así como para el ensamblaje del aparato propiamente dicho. En *At* son llamadas *VirB11* (*TrwD*), *VirB4* (*TrwK*) y la T4CP *VirD4* (*TrwB*). Se ha sugerido que estas interaccionarían unas con otras en el citoplasma en forma independiente del resto de componentes del T4SS (Atmakuri *et al.*, 2004), sin embargo hay poca información disponible al respecto (Waksman & Fronzes, 2010). Para abordar el interrogante de si la T4CP es o no

parte integral del T4SS, decidimos evaluar los niveles de TrwB en los distintos mutantes *trw*, ya que, de ser parte del aparato, sus niveles podrían verse afectados por la ausencia del resto de componentes del T4SS.

Nuestros resultados mostraron niveles similares de TrwB en todos los casos y comparables a los detectados en el plásmido R388 (**Figura 36**). Por ensayos de doble híbrido se había demostrado la interacción entre TrwE (VirB10) y TrwB (Llosa *et al.*, 2003), sin embargo la pérdida de dicha interacción no parece afectar a los niveles de TrwB. La débil señal de TrwB en la línea 9 de la Fig. 36, fue causada por una burbuja. Dada la importancia de esta interacción, este ensayo ha sido repetido y se ha comprobado que no hay variación de los niveles de TrwB para el mutante en *trwE* (*virB10*).



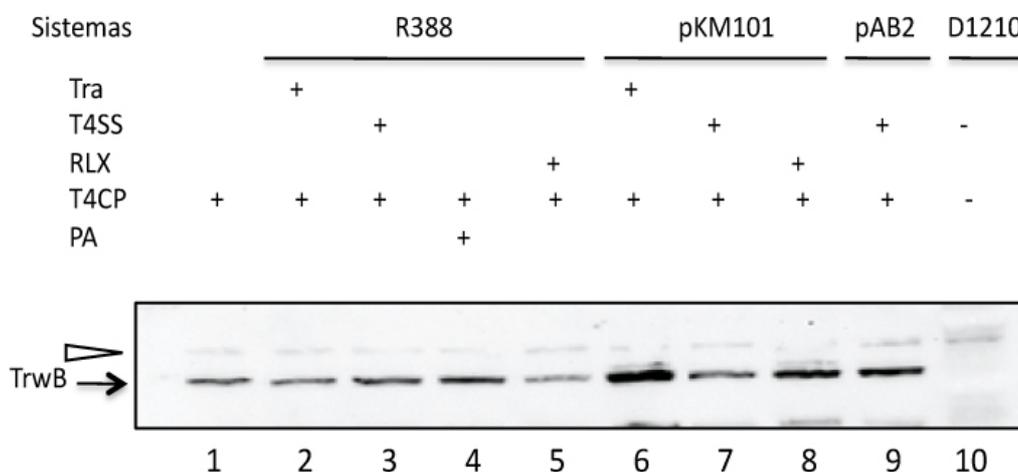
**Figura 36.** Western blot con anti-TrwB. La punta de flecha blanca representa inespecificidades. El resto de símbolos como en la leyenda de la Fig. 35.

Que los niveles de TrwB producidos por los mutantes *trw* no mostraran cambios, sugería que esta proteína no estaba afectada por la presencia o ausencia del T4SS ensamblado. Para extender este análisis, nos hemos preguntado si la presencia de diferentes T4SS y/o de los componentes del relaxosoma podrían influir en los niveles de esta proteína acopladora.

En la **Figura 37**, se observan los niveles de TrwB producidos bajo el control del promotor *Plac* en extractos celulares de *E. coli*. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia del T4SS de R388 (líneas 2 y 3), de pKM101 (líneas 6 y 7) o de *Bt* (línea 9). Estos resultados nos permitieron determinar que la presencia de un T4SS cualquiera no tiene efecto significativo sobre los niveles estables de TrwB.

Con el fin de observar la influencia de los componentes del relaxosoma sobre TrwB, la proteína acopladora fue expresada en *trans* con un conjunto de

plásmidos que codifican para los componentes del relaxosoma de los sistemas de R388 y pKM101.



**Figura 37.** Western blot con anti-TrwB. Células de *E. coli* que expresaban *trwB* bajo el control del promotor lactosa (*Plac*) fueron ensayadas en Western blot para detectar los niveles de TrwB en presencia de la maquinaria conjugativa de los plásmidos R388, pKM101 y el T4SS Trw de *Bt*. TRA: Región de transferencia = *Dtr* + *Mpf* (T4SS). *Dtr*= *RLX* + T4CP; *Dtr*<sub>R388</sub>= *oriT*<sub>R388</sub> + *trwA* + *trwB* + *trwC*; *Dtr*<sub>pKM101</sub>= *oriT*<sub>pKM101</sub> = *traK* + *traJ* + *traI*. *RLX*= *oriT*+relaxasa+ proteína accesoria; *RLX*<sub>R388</sub> = *oriT*<sub>R388</sub> + *trwA* + *trwC*; *RLX*<sub>pKM101</sub> = *oriT*<sub>pKM101</sub> + *traK* + *traI*. T4CP: *Plac-trwB*. PA: Proteína accesoria, TrwA.

Tal y como se muestra en la Fig. 37, los niveles de TrwB, no fueron modificados de forma significativa en presencia del relaxosoma de R388 (línea 5) ni tampoco en presencia del de pKM101 (línea 8). En general, los niveles de TrwB fueron similares en todas las condiciones, aunque cabe mencionar que se observa una señal más intensa cuando está presente el plásmido pKM101, con toda su maquinaria conjugativa (línea 6). Esta diferencia podría ser debida a la variación intrínseca del método.

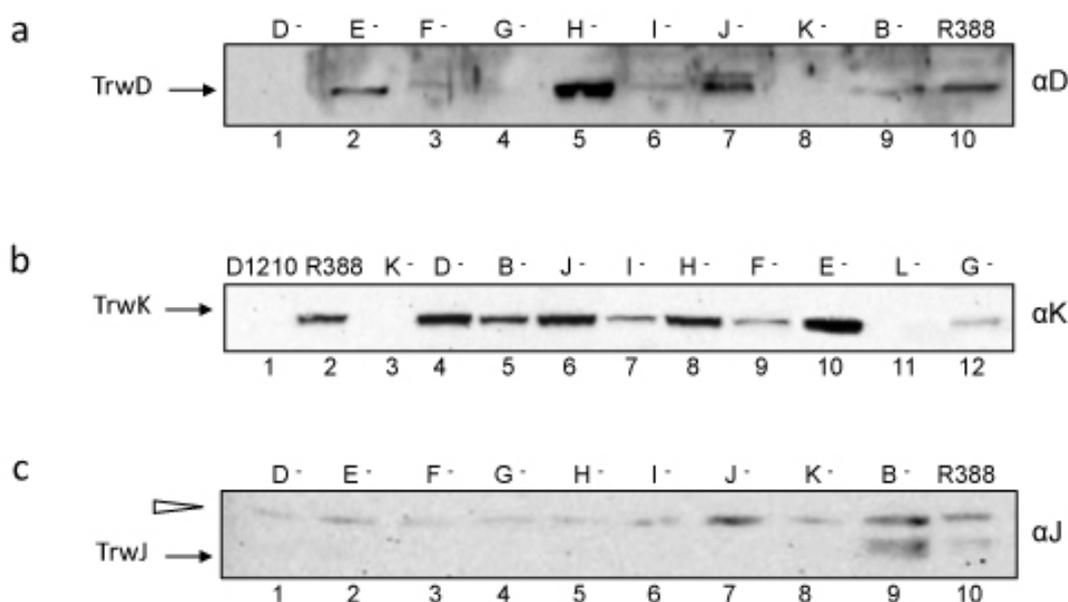
Ensayos *in vitro* demuestran que TrwA interacciona con TrwB $\Delta$ N70 (Llosa *et al.*, 2003) y estimula su actividad ATPasa (Tato *et al.*, 2007). Basándonos en estos datos previos, observamos los niveles de TrwB en un plásmido que co-expresaba ambas proteínas bajo el promotor *Plac*. Las cantidades de TrwB permanecieron sin cambios y fueron similares a las obtenidas en ausencia de TrwA (Fig. 37 línea 1 vs. Línea 4).

De éstos ensayos concluimos que la presencia de un T4SS o de los genes de la región *Dtr*, tanto del propio R388 como de sistemas heterólogos, no modifican la

cantidad de proteína TrwB detectada por Western blot. Estos resultados apoyan el papel de la T4CP como un tercer módulo funcional de la maquinaria conjugativa (Llosa & de la Cruz, 2005), independiente del sustrato y del T4SS.

#### 4.1.5. Influencia de los mutantes *trw* de R388 en los niveles de las proteínas del T4SS de R388

La **Figura 38**, muestra los niveles de diversas proteínas producidos por los diferentes mutantes *trw*. Hemos detectado los niveles de TrwD (VirB11), ATPasa citoplasmática asociada a membrana, de TrwK, proteína integral de membrana y el más conservado de los componentes de los T4SS; y de TrwJ (VirB5) componente del *pilus* conjugativo.



**Figura 38.** Western blot con anti-TrwD, anti-TrwK y anti-TrwJ. La punta de flecha blanca representa inespecificidades. El resto de símbolos como en la leyenda de la Fig.35.

Los homólogos de VirB11 (TrwD) son proteínas citoplasmáticas asociadas a la membrana interna (Krause *et al.*, 2000b) y estarían involucrados, tanto en la transferencia del sustrato (Cascales & Christie, 2004a) como en la biogénesis del *pilus* (Sagulenko *et al.*, 2001a). Nuestros datos revelan que mutaciones en los genes *trw* afectan de manera variada los niveles de TrwD (VirB11) (Fig. 38a). Los

mutantes en los genes *trwF* (*virB9*), *trwG* (*virB8*), *trwK* (*virB4*), y *trwI* (*virB6*) causaron niveles indetectables de TrwD (VirB11). La mutación en la T4CP, *trwB*, provocó una reducción de los niveles de TrwD (VirB11). Por el contrario, se detectaron niveles superiores para los mutantes *trwH* (*virB7*) y *trwJ* (*virB5*), mientras que fueron similares a R388 para el mutante en *trwE* (*virB10*).

La proteína TrwK (VirB4), ha sido detectada en todos los mutantes *trw* (Fig. 38b), aunque con variaciones en las intensidades de la señal. El mutante *trwE* (*virB10*) produjo un incremento de TrwK (VirB4), mientras que los mutantes *trwI* (*virB6*), *trwF* (*virB9*) y *trwG* (*virB8*) generaron un descenso de sus niveles.

En contraste, los niveles de la proteína minoritaria del *pilus* TrwJ se ven completamente afectados por la ausencia de cualquier proteína Trw, a excepción del mutante *trwB*. Por lo tanto, podemos concluir que TrwJ (VirB5) necesita un T4SS formado y estable para su propia integridad (Fig. 38c). Fue muy llamativo que la mutación en *trwB*, no causara ningún cambio en los niveles de TrwJ (VirB5) (Fig. 38c), el cual según los trabajos previos (de Paz, 2010) sería el último componente del T4SS de R388 en ensamblarse. Estos resultados apoyan los datos previos en donde se observaba que TrwB, si bien es necesaria para la transferencia de ADN, no sería requerida para la biogénesis del *pilus* conjugativo (Bolland *et al.*, 1990). Dichas observaciones fueron obtenidas realizando infecciones con el fago específico del grupo IncW PRD1, el cual requiere un T4SS ensamblado para ser infectivo. Otros trabajos en *At* también muestran que la T4CP no es requerida para la biogénesis del *pilus* conjugativo (Lai *et al.*, 2000). Sin embargo, la T4CP TraD producida por las variantes desreprimidas del plásmido R1 (R1-16) - de la familia de *F-like plasmid* - es necesaria para la infección celular por el fago R17, el cual requiere un T4SS ensamblado (Lang *et al.*, 2011).

Aunque de un modo indirecto, estas diferencias que surgen de los ensayos de infección mediados por fagos, sugieren que TrwB<sub>R388</sub> no tendría un rol sobre la estructura funcional del T4SS de R388, como sí lo tendría TraD de R1.

Se han realizado trabajos similares en el T4SS de *At* y los resultados coinciden sólo en parte con los nuestros:

En *At*, la ausencia de proteínas del *core complex* o asociadas a membrana como VirB8 (TrwG) producían niveles muy bajos de VirB4 (TrwK) (Fernández *et al.*, 1996b) lo que coincide en parte con nuestros resultados. Pero nos llaman

particularmente la atención las diferencias encontradas para el mutante en *trwH* (*virB7*). En *At*, su ausencia produce una reducción en los niveles de varias proteínas, incluidas VirB11 (TrwD), VirB4 (TrwK), VirB9 (TrwF), y VirB10 (TrwE) (Fernández *et al.*, 1996a), mientras que en nuestro estudio no causaba ninguna reducción de los niveles de las ATPasas, e incluso hemos detectado una acumulación de TrwD (VirB11) para ese mutante.

En otros sistemas como el de pKM101, la ausencia de VirB7 también (TrwH) afecta el ensamblaje del aparato (Fronzes *et al.*, 2009). Esta reducción de los niveles de proteína son una consecuencia del efecto estabilizador de VirB7 (TrwH) sobre la estructura del *core complex* a través de la interacción con VirB9 (Fernández *et al.*, 1996a,b, Fronzes *et al.*, 2009).

Otra diferencia a destacar es el caso de la proteína VirB8 (TrwG). Ésta interacciona con varios componentes del T4SS (Álvarez-Martínez & Christie, 2009), por ello ha sido propuesto que su posición en la membrana determinaría el sitio de ensamblaje del T4SS (Álvarez-Martínez & Christie, 2009). Nuestros resultados sugieren también que TrwG (VirB8) juega un rol importante en el ensamblaje del T4SS, puesto que su ausencia afecta a los niveles de todas las proteínas de la región *Mpf* estudiadas en esta tesis TrwK (VirB4), TrwD (VirB11) y TrwJ (VirB5).

Por último, cuando miramos el efecto que produce la ausencia de las ATPasas sobre los componentes del *pilus* encontramos diferencias entre nuestro sistema y el de *At*. En el caso de *At*, la ausencia de VirB11 (TrwD) (Sagulenko *et al.*, 2001a) y VirB4 (TrwK) (Yuan *et al.*, 2005) no afecta a los niveles del componente del *pilus* VirB5 (TrwJ), mientras que en R388 la ausencia de ambas ATPasas provocó niveles indetectables para TrwJ (VirB5).

#### **4.1.6. Modelo de ensamblaje del T4SS de R388**

Los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot, nos permiten sugerir un modelo sencillo de ensamblaje del T4SS de R388 basado en los modelos propuestos para *At* y pKM101 (Waksman & Fronzes, 2010), pero con diferencias sugeridas por nuestros datos:

- Los niveles de la T4CP, TrwB, son independientes del resto de los componentes del T4SS.

- Los niveles de la ATPasa citoplasmática TrwD (VirB11) están afectados por la ausencia de las proteínas de membrana TrwK (VirB4), TrwG (VirB8), TrwI (VirB6) y TrwF (VirB9) y no por las proteínas, TrwE (VirB10) y TrwH (VirB7), ni por los componentes del *pilus*.
- La proteína más conservada de los T4SS, TrwK (VirB4) está afectada en ausencia de los componentes del *core complex* y no por los componentes del *pilus*.
- El componente minoritario del *pilus* TrwJ (VirB5) requiere todo el T4SS pero no la T4CP, TrwB (VirD4), para su estabilidad.

El modelo de ensamblaje del T4SS de pKM101 propone que el *core complex* compuesto por VirB7 (TrwH), VirB9 (TrwF) y VirB10 (TrwE) se forma en la membrana interna y luego se inserta en la externa (Fronzes *et al.*, 2009). El transporte de estas proteínas a las membranas y espacio periplasmático sería mediado por factores del huésped. En *At*, se sabe que en el transporte de VirB7 (TrwH) participan las proteínas Sec y probablemente oxidorreductasas periplasmáticas (Fernández *et al.*, 1996a).

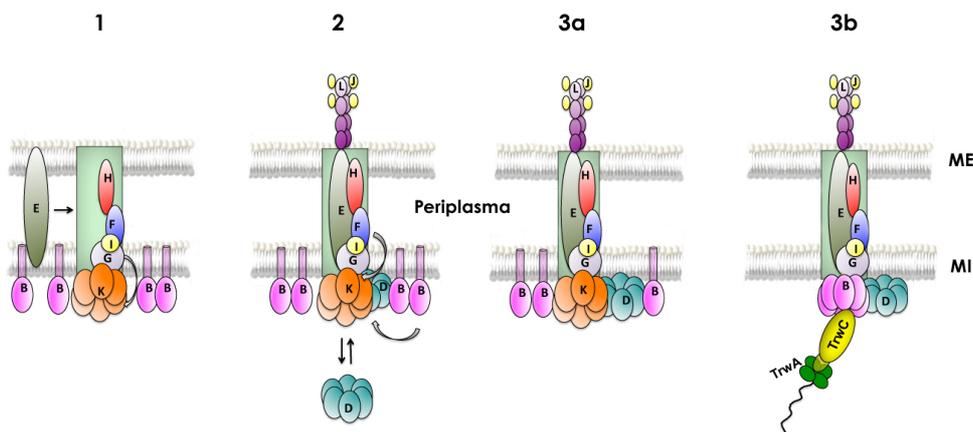
La localización del *core complex* reclutaría a las proteínas VirB6 (TrwI) y VirB8 (VirB8) en la membrana interna y las tres ATPasas VirB4 (TrwK), VirB11 (TrwD) y VirD4 (TrwB) en el citoplasma (Waksman & Fronzes, 2010). Se ha demostrado que este complejo confiere estabilidad a las ATPasas y a los otros componentes (Atmakuri *et al.*, 2004). Este dato coincidiría con los datos obtenidos para el mutante en *trwG* (*virB8*) de nuestro sistema, puesto que su ausencia afecta a la estabilidad de TrwK (VirB4), una de las primeras proteínas necesarias para el ensamblaje del propio T4SS.

El modelo planteado para R388 se representa en 3 pasos ilustrados en la **Figura 39** y descritos a continuación:

**1.** Las proteínas del complejo conservado llamado *core complex*, TrwH (VirB7), TrwF (VirB9), TrwE (VirB10) se localizarían en la membrana externa-periplasma y membrana interna, mientras que TrwI (VirB6) y TrwG (VirB8) se localizarían en la membrana interna tal como ha sido propuesto (Waksman & Fronzes, 2010).

Puesto que los niveles de la T4CP, TrwB, se mostraron independientes de la presencia de proteínas Trw del T4SS de R388, sugerimos que TrwB estaría

distribuida en el perímetro celular de la membrana interna probablemente como monómero. De hecho, una proteína de fusión TrwB-GFP presenta esa localización (Matilla, 2011). La ATPasa TrwK (VirB4) estaría anclada a la membrana interna, interaccionando con los componentes del *core complex*, lo que sugiere que TrwK (VirB4) y el *core complex* se ensamblarían en primer lugar como una unidad. Lo anterior concuerda con la estructura 3D del dominio C-terminal de VirB4 de Tps unida al *core complex* recientemente resuelta (Wallden *et al.*, 2012). Las interacciones proteína-proteína podría influenciar positivamente su estabilidad (se indica con una flecha gris en la Fig.39). Puesto que la ausencia de TrwE (VirB10) no afecta a los niveles de TrwD (VirB11) o TrwK (VirB4), es posible que ésta se ensamble posteriormente a TrwG (VirB8), TrwI (VirB6), TrwF (VirB9) y TrwH (VirB7).



**Figura 39.** Modelo de ensamblaje del T4SS del plásmido R388. Se muestran tres pasos para los cuales, de acuerdo a nuestros ensayos podemos determinar la posición de algunas proteínas en el T4SS. El paso 3, estaría dado por un equilibrio entre a y b. Cada letra representa la proteína correspondiente del sistema Trw de R388. **B:** TrwB (VirD4), **D:** TrwD (VirB11), **E:** TrwE (VirB10), **F:** TrwF (VirB9), **G:** TrwG (VirB8), **H:** TrwH (VirB7), **I:** TrwI (VirB6), **J:** TrwJ (VirB5), **K:** TrwK (VirB4), **L:** TrwL (VirB5). El relaxosoma está representado por el complejo formado por TrwC-TrwA y el ADN. Las flechas grises indican estabilización por parte de las proteínas.

**2.** La proteína TrwD (VirB11) sería estabilizada por el complejo formado por TrwK (VirB4) y el *core complex* en el citoplasma. La T4CP, TrwB (VirD4), aunque en menor grado jugaría un rol estabilizador sobre TrwD (VirB11). Dado que TrwD (VirB11) fue la proteína más afectada ante la ausencia de muchas proteínas Trw, posiblemente la localización dependería del estado de ensamblaje del T4SS y sea una de las últimas en incorporarse. Dicha incorporación ocurriría antes de la adición

del componente minoritario TrwJ (VirB5), puesto que como hemos mencionado el mutante en *trwD* (*virB11*) elimina los niveles de TrwJ (VirB5).

Hemos observado un acúmulo de TrwD (VirB11) en los mutantes *trwH* (*virB7*) y *trwJ* (*virB5*), implicados ambos en la formación del *pilus* (Sagulenko *et al.*, 2001a, Krall *et al.*, 2002), como la propia TrwD (VirB11) (Sagulenko *et al.*, 2001a). Se ha sugerido que existe un *pool* de TrwD (VirB11), dependiendo del estado de ensamblaje del T4SS. Ésta se encontraría libre en el citoplasma o bien asociada a la membrana (Rashkova *et al.*, 1997, Waksman & Fronzes, 2010). Es probable que en ausencia de ensamblaje del *pilus* se altere el equilibrio, provocando un acumulo de TrwD (VirB11).

**3.** En este paso proponemos que existe un equilibrio entre un escenario **a**) y el **b**) mostrados en la Fig. 39. En a), TrwK (VirB4) interacciona directamente con el *core complex*. Esta interacción sería necesaria para el proceso de ensamblaje y/o estabilización del aparato. De hecho, las dimensiones del hexámero de TrwK coinciden con la base de la estructura del *core complex* del T4SS de pKM101 (Peña *et al.*, 2012) generando un canal por donde podrían ser translocados los sustratos y/o los componentes del *pilus*. En b), una vez ensamblado el T4SS, la T4CP, TrwB, interacciona por un lado con el componente del *core complex* TrwE (VirB10) y de forma específica con el complejo nucleoproteico TrwC-ADN que ha de ser transferido (Llosa *et al.*, 2003). Tal y como lo propone el modelo “*shoot and pump*”, después de la translocación del complejo TrwC-ADN, la molécula de ADN de cadena simple, sería bombeada por la ATPasa TrwB (VirD4) hacia fuera de la célula (Llosa *et al.*, 2002).

Es decir, planteamos que un mismo T4SS, una vez ensamblado interacciona con la T4CP en un momento particular que coincide con la transferencia del sustrato conjugativo. Apoyando estos dos escenarios planteados encontramos i) mutantes “desacoplados” que afectan sólo a la estructura del *pilus* o sólo a la transferencia de ADN (Banta *et al.*, 2011), ii) Las ATPasas citoplasmáticas interaccionan formando un complejo de ATPasas citoplasmático independiente del resto de componentes del T4SS. Además, la T4CP no tiene un *partner* fijo (Atmakuri *et al.*, 2004).

Alternativamente, podría pensarse que TrwB y TrwK (VirB4), comparten la localización a la entrada *del core complex* en forma de hetero-multímeros, puesto que sus estructuras C-terminales son muy similares (Wallden *et al.*, 2012, Peña *et*

*al.*, 2012). Sin embargo, el hecho de que TrwK (VirB4) presente dominancia negativa sobre la actividad ATPasa de TrwB, sugiere que la interacción de ambas proteínas con el *core complex* ocurra como se plantea en los escenarios 3a y 3b de la Fig. 39.

Es notable que la principal diferencia que se encuentra en los modelos de ensamblaje de los T4SS radica en la ubicación de las 3 ATPasas citoplasmáticas. El modelo de Walksman & Fronzes, (2010) sitúa a las 3 ATPasas estableciendo una interacción con los componentes del T4SS en la membrana simultáneamente. En el modelo presentado en este trabajo, sin embargo se especula que la T4CP interacciona con el T4SS solo cuando se transfiere en sustrato durante el proceso conjugativo.

#### **4.1.7. Complementación estructural de los mutantes de las proteínas Trw de R388 por el sistema Trw de *Bt***

Al analizar las interacciones entre dos T4SS distintos es interesante diferenciar las posibles interacciones funcionales de las estructurales. Cuando una proteína de un determinado T4SS sustituye a su homóloga en otro T4SS y permite el ensamblaje hablamos de una complementación estructural. Sin embargo, ésta puede ser funcional o no funcional. Estudiando T4SS implicados en conjugación, es posible ensayar la funcionalidad midiendo frecuencias de conjugación.

Trabajos previos han demostrado que existen interacciones funcionales entre las proteínas Trw de R388 con sus homólogas en el sistema Trw de *Bt* (de Paz *et al.*, 2005). Éstas son detectadas mediante la movilización del derivado de R388 en presencia del cósmido pAB2 que codifica para toda la región *trw* de *Bt*. Los mutantes *trwH* (*virB7*), *trwG* (*virB8*), *trwE* (*virB10*) y *trwD* (*virB11*) de R388 fueron complementados con sus respectivos homólogos en *Bt*, aunque con frecuencias de conjugación muy bajas, a excepción del mutante en *trwD* (*virB11*) que muestra frecuencias similares a R388 (de Paz *et al.*, 2005).

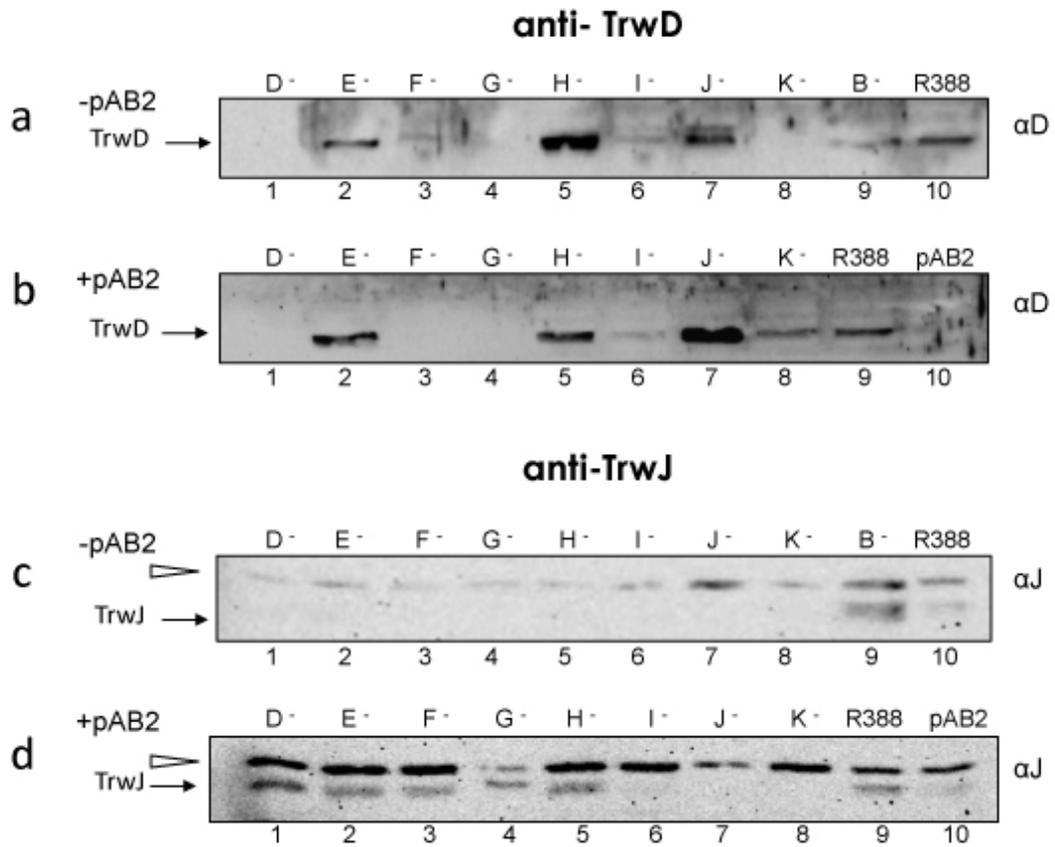
Como se ha expuesto, los niveles de las proteínas TrwD (VirB11) y TrwJ (VirB5) fueron los más afectados en ausencia de los genes *trw* de R388. Esto permite ensayar la posible complementación estructural por parte de sus homólogos en el sistema Trw de *Bt* y además compararlos con los datos existentes de complementación funcional (de Paz *et al.*, 2005). En esta tesis se han realizado

ensayos de Western blot con anti-TrwD y anti-TrwJ para cada mutante *trw* de R388 en presencia del cósmido pAB2.

La **Figura 40** muestra los resultados de las complementaciones por *Bt* comparándolos con los resultados en ausencia de *Bt* tomados de la Fig. 38a y 38c. Se observa que los niveles endógenos de TrwD (VirB11) no fueron restablecidos para la mayoría de los mutantes *trw* en presencia del cósmido pAB2, salvo para el mutante de *trwK* (*virB4*) (Fig. 40, línea 8). Este resultado constituye un claro ejemplo de complementación estructural, puesto que TrwK del sistema Trw de *Bt* no es capaz de sustituir a TrwK de R388 en conjugación, pese a que presentan un 80% de homología (de Paz *et al.*, 2005). La falta de complementación funcional de TrwK de R388 por TrwK de *Bt* habiéndola estructural, podría indicar que la proteína homóloga puede sustituir a la de R388 en el armazón del T4SS, pero no en las interacciones específicas con otros componentes necesarios para la translocación del sustrato. En el caso de los T4SS de *At* y *Bs*, se observó complementación tanto estructural como funcional entre los homólogos VirB4 de ambos sistemas. Esto subraya el hecho de que aunque la arquitectura general sea la misma para distintos T4SS, el proceso de secreción requiere de interacciones específicas que pueden variar de unos sistemas a otros (Yuan *et al.*, 2005).

Por otro lado se observa que la proteína TrwH (VirB7) de *Bt* revierte el efecto del mutante, produciendo una disminución de la acumulación de TrwD (VirB11) observada en el mutante *trwH* (*virB7*) de R388 (Fig. 40, línea 5) en consecuencia de la complementación funcional observada (de Paz *et al.*, 2005).

En presencia del plásmido pAB2, los niveles de TrwJ (VirB5) fueron recuperados para los mutantes en *trwH* (*virB7*), *trwG* (*virB8*), *trwF* (*virB9*), *trwE* (*virB10*), *trwD* (*virB11*) de R388 (Fig. 40). No se observa una recuperación de los niveles de TrwJ (VirB5) para el mutante de *trwI* (*virB6*), al igual que lo para la complementación del mutante en *trwK* (*virB4*). Estos datos se correlacionan exactamente con los datos de complementación funcional obtenidos por de Paz y cols, (2005).



**Figura 40.** Western blot con anti-TrwD y anti-TrwJ. a y c en ausencia de pAB2, b y d en presencia de pAB2. La punta de flecha blanca representa inespecificidades. El resto de símbolos como en la leyenda de la Fig 35.

## 4.2. Análisis estructura/función de la proteína acopladora TrwB

Los datos bioquímicos -unión a ADN y actividad ATPasa dependiente de ADN- y los estructurales, apoyan al modelo “*shoot and pump*” de conjugación bacteriana. En éste, TrwB actuaría como un motor molecular bombeando el ADN a través del canal interno (ICH) de TrwB (Llosa *et al.*, 2002).

TrwB es capaz de interactuar con componentes del *core complex* del T4SS de diferentes sistemas conjugativos, lo que indica que las interacciones que establece el TMD son flexibles y menos específicas que las que tienen lugar en el lado citoplasmático. Éstas son altamente específicas, por lo que TrwB no es capaz de reconocer el relaxosoma de otros sistemas conjugativos (Llosa *et al.*, 2003).

En el capítulo anterior determinamos que la estabilidad de TrwB, es independiente del T4SS y viceversa. Estos datos son muy importantes porque apoyan su rol independiente como un tercer módulo funcional de la maquinaria conjugativa. Sin embargo, su actividad como proteína conectora requiere una serie de funciones simultáneas como: interacción proteína-proteína con el T4SS, con el relaxosoma e hidrólisis de ATP en presencia de ADN.

Nuestro objetivo es determinar qué residuos de TrwB tienen un papel relevante en el reclutamiento y/o translocación del sustrato.

### 4.2.1. Optimización de los ensayos de conjugación en diferentes condiciones

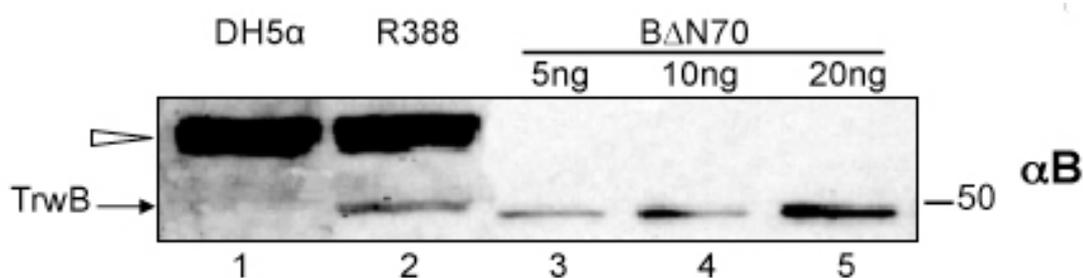
Trabajos previos de nuestro grupo habían determinado un grupo de mutantes de TrwB deficientes en conjugación y otro grupo que no parecían estar afectado significativamente (de Paz, 2010) (Introducción, sección 1.3, Tabla 1). Nos resultaba llamativo que ese grupo de mutantes no lo estuviera, porque de acuerdo a la estructura 3D de TrwB $\Delta$ N70, las mutaciones diseñadas afectarían a la superficie citoplasmática del AAD y a los residuos con carga positiva expuestos en el ICH, respectivamente.

Los ensayos citados se habían realizado por complementación del plásmido pSU1443 (deficiente en *trwB*) con plásmidos multicopia. Existía la posibilidad de que en estas condiciones no se detectasen el efecto de las mutaciones que pudiese compensarse con un alto número de moléculas de TrwB. Por consiguiente, con la

idea de estudiar ese grupo de mutantes, (Tra+), se han probado diferentes condiciones de conjugación.

Para el diseño de las nuevas condiciones de conjugación nos pareció interesante, en una primera instancia, determinar la cantidad de moléculas de TrwB por célula producidas por el plásmido R388.

Mediante ensayos de Western blot se calculó la cantidad de moléculas de TrwB producida por R388 en un cultivo líquido. Para ello se realizó una curva de calibrado utilizando cantidades conocidas de TrwB $\Delta$ N70 purificada, representada en la **Figura 41** (líneas 3-5). Determinamos que hay aproximadamente 3.350 monómeros o 550 hexámeros de TrwB por célula.

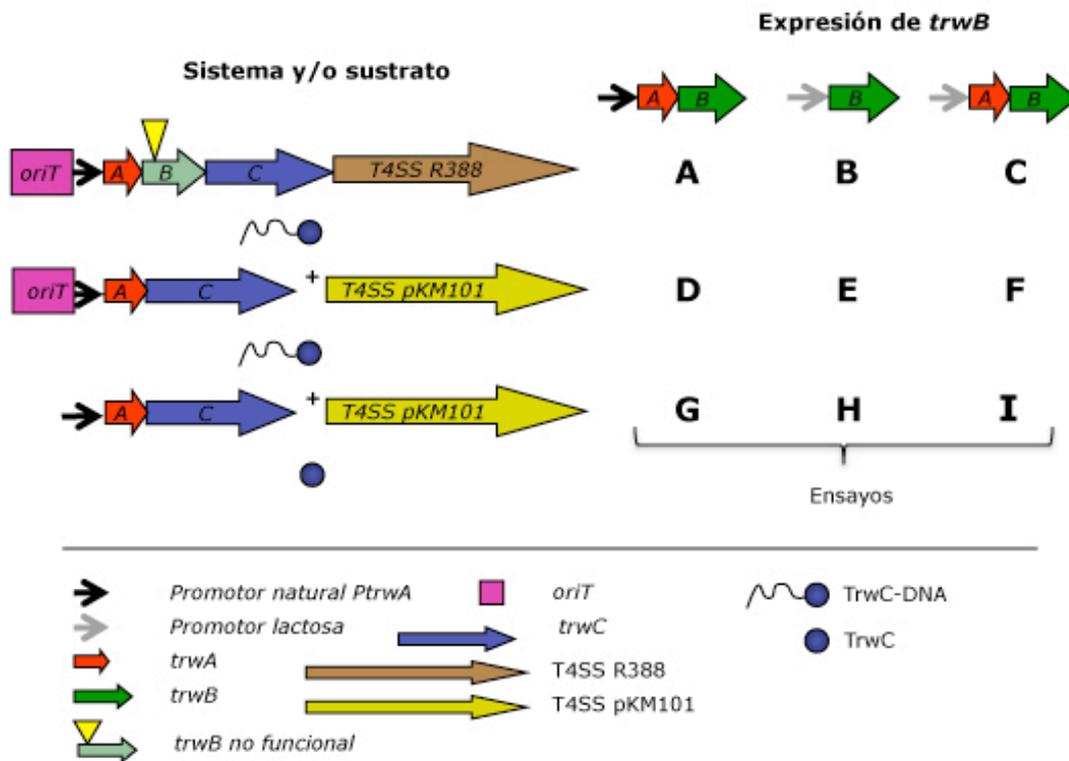


**Figura 41.** Western blot con anti-TrwB. Cuantificación de la cantidad de moléculas de TrwB producidas por R388. La punta de flecha blanca indica inespecificidades y la flecha negra delgada, la proteína TrwB. A la derecha el marcador de peso molecular en kDa. B $\Delta$ N70: TrwB $\Delta$ N70 purificada.

Estas cantidades son llamativas, comparadas con un estudio similar en el sistema de RP4 ha determinado que tan sólo hay unas 5 moléculas por célula de la T4CP TraG (Grahm *et al.*, 2000). Esto sugiere que el promotor natural de R388 *P<sub>trwA</sub>*, el cual dirige la expresión del operón *trwABC*, produce gran cantidad de TrwB. Por tanto, las mutaciones en la proteína que produzcan un fenotipo leve en su actividad podrían no ser detectados por un efecto compensatorio producido por el exceso de proteína salvaje.

Con la idea de construir un sistema donde la cantidad de TrwB tuviera un efecto directo en la frecuencia de conjugación, diseñamos un grupo de ensayos en

donde se modificaron las condiciones de expresión de *trwB* y/o se utilizaron diferentes T4SS para la transferencia de ADN. En la **Figura 42** se muestra un esquema de los diferentes ensayos realizados y a continuación se describen los resultados obtenidos. Este trabajo fue iniciado por Héctor de Paz, por lo que, para presentar los resultados de forma coherente algunos de los datos que se citan pertenecen a de Paz, (2010).



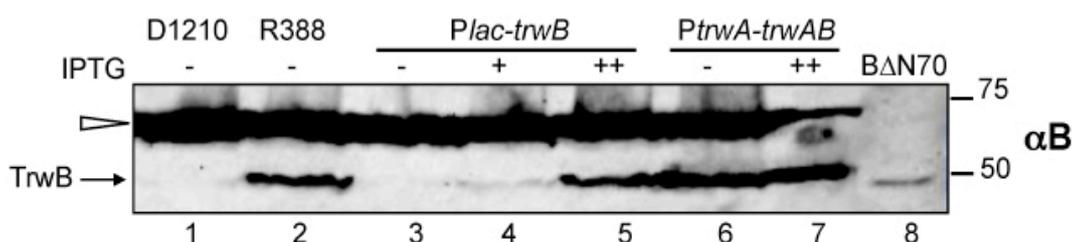
**Figura 42.** Resumen de los diferentes ensayos de conjugación. En los ensayos A-F el sustrato es TrwC-ADN, mientras que en los ensayos G-I es TrwC. Imagen adaptada de de Paz *et al.*, (2010).

Las letras de los ensayos mostrados en los siguientes apartados hacen referencia a los expuestos en la Fig.42.

#### 4.2.1.1. Efecto del nivel de expresión de *trwB* en conjugación

Para estudiar el efecto del nivel de expresión de *trwB* se construyó el plásmido pHP139, en el cual la expresión de *trwB* estaba regulada por el promotor lactosa (*Plac*). La producción de TrwB desde este promotor fue comparada con la del promotor natural *P<sub>trwA</sub>* (pSU4622) (**Figura 43**, tomada de de Paz *et al.*, (2010)).

Puede observarse que los niveles de TrwB se pueden controlar utilizando el *Plac* y distintas condiciones de IPTG (Fig. 43, líneas 3, 4, 5). En el caso del promotor *P<sub>trwA</sub>* (pSU4622) los niveles de la TrwB producidos fueron mayores a los producidos por R388 e incrementados en presencia de IPTG (Fig. 43, comparar, líneas 2, 6, y 7).

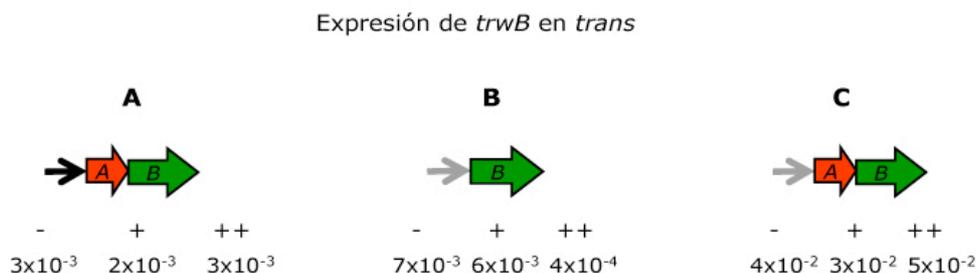


**Figura 43.** Western blot con anti-TrwB. *trwB* es expresada a distintos tiempos de inducción. TrwB está indicada por la flecha negra. La punta de flecha blanca señala una banda inespecífica. En la parte superior se indican las condiciones de inducción con IPTG: - (sin IPTG), + (1 hora de IPTG) y ++ (3 horas de IPTG). A la derecha, marcador de pesos moleculares en kDa. Imagen tomada de de Paz, 2010.

Los plásmidos pHP139 y pSU4222, fueron ensayados en conjugación para complementar el derivado de R388 deficiente en TrwB (pSU1443) (**Figura 44**, ensayos, A y B) bajo diferentes condiciones de inducción. Los resultados mostraron que, incluso en ausencia de inducción, la cantidad de TrwB producida desde el promotor lactosa fue suficientemente alta para complementar la movilización de pSU1443.

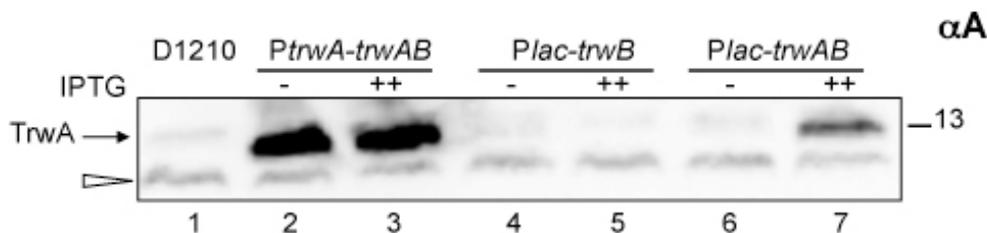
Tras 3 horas de inducción de la expresión desde el promotor *Plac* (ensayo B), la frecuencia de conjugación cayó 1 log (Fig. 44, ensayo B). Esta caída se podría deber al exceso de TrwB en la célula. Sin embargo, los niveles de TrwB observados

por Western blot eran similares al ensayo A (Fig. 43, comparar línea 5 y 7). Una causa de esto podría atribuirse a que en el ensayo A hay mayor producción de TrwA, por el plásmido pSU4622 (ver debajo la **Figura 45**, líneas 2 y 3 vs líneas 4 y 5).



**Figura 44.** Ensayos de conjugación. Frecuencias de conjugación del plásmido pSU1443 cuando es complementado en *trans* con *trwB* bajo diferentes condiciones de expresión. A, pSU4622 (*P<sub>trwA</sub>::trwB*); B, pHP139 (*P<sub>lac</sub>::trwB*); C, pDEL003 (*P<sub>lac</sub>::trwAB*). Inducción con IPTG, (-), sin IPTG, (+) 1 hora, (++) 3 horas. Los datos representan el promedio de 5 a 10 ensayos independientes. Símbolos como la Fig. 42.

Por lo tanto construimos otro plásmido adicionando al extremo 5' de *trwB* el gen *trwA* en el plásmido pHP139. Se obtuvo el plásmido pDEL003 el cual, también fue ensayado en conjugación por complementación del derivado de R388 (pSU1443) (Fig. 44, ensayo C). En estos nuevos ensayos, la co-expresión de *trwA* y *trwB* produjo un incremento de 1 log en la frecuencia de conjugación desde la primera hora de inducción con IPTG, aunque pasada las 3 horas la frecuencia de conjugación se mantuvo constante, respecto al mismo sistema sin *trwA* (Fig. 44, ensayo B). En la Fig. 45, líneas 4-7, se observa la cantidad de TrwA producida desde el promotor *P<sub>lac</sub>*. Al parecer la presencia de TrwA contrarresta el efecto deletéreo del exceso de TrwB (Fig.44, ensayos B y C. Fig. 45 línea 5 y 7).

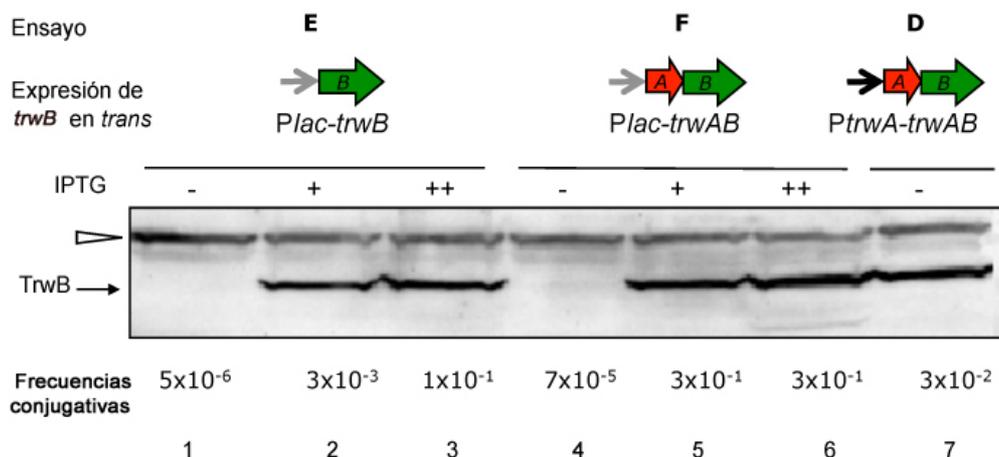


**Figura 45.** Western blot con anti-TrwA. *trwA* es expresada bajo el promotor natural *PtrwA* o *Plac* a distintos tiempos de inducción. TrwA está indicada por la flecha negra, la punta de flecha blanca señala una banda inespecífica. En la parte superior se indican las condiciones de inducción con IPTG: - (sin IPTG) o ++ (3 horas de IPTG). A la derecha, marcador de pesos moleculares en kDa.

#### 4.2.1.2. Efecto del T4SS de pKM101

Utilizamos el T4SS del plásmido pKM101 para la movilización de ADN. La maquinaria conjugativa de este plásmido está relacionada con la del plásmido R388 y se ha demostrado que los T4SS de ambos plásmidos son intercambiables funcionalmente (Llosa *et al.*, 2003). Los plásmidos que codificaban *trwB* bajo las diferentes condiciones de expresión (*PtrwA* o *Plac*, +/- IPTG), fueron ensayados en conjugación en presencia del T4SS de pKM101 (*pKM101Δmob*) y de los componentes del relaxosoma *oriT-trwA-trwC* (plásmido pHP138). Los tres plásmidos son compatibles y pueden estar presentes en la misma bacteria.

Los niveles de TrwB fueron detectados por Western blot a partir de extractos de las propias células donadoras. En la **Figura 46**, se muestran los ensayos realizados y las frecuencias obtenidas.



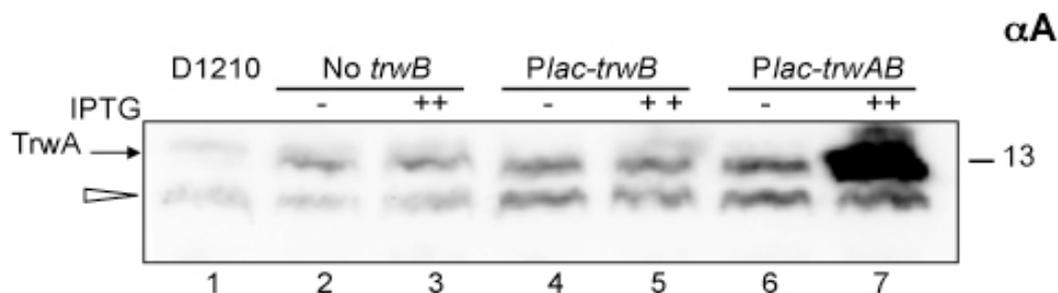
**Figura 46.** Western blot con anti-TrwB a partir de extractos de células donadoras. *trwB* es expresada bajo el promotor *Plac* o promotor natural *PtrwA* a distintos tiempos de inducción en presencia de pKM101 $\Delta$ *mob* y pHP138. Las frecuencias de conjugación se muestra debajo del gel y corresponden a los ensayos de conjugación D-E-F. Los símbolos igual que en la Fig. 42 y 45. Los valores de las frecuencias representan el promedio de 5 a 10 ensayos independientes.

En ausencia de inducción, no se detectaron niveles de TrwB (Fig.46, línea 1 y 4), lo cual está correlacionado con una frecuencia de conjugación muy baja (Fig. 46 ensayos E y F). Después de inducir con IPTG, observamos que la frecuencia de conjugación era dependiente de la cantidad de proteína expresada desde el *Plac*, (Fig. 46, ensayos E y F, líneas 2-3 y 5-6). En estas condiciones el plásmido que expresa *trwB* desde el promotor natural (*PtrwA*) mostró frecuencias conjugativas de  $3 \times 10^{-02}$  (sin inducción),  $7 \times 10^{-02}$  (tras 1 hora de inducción) y de  $2 \times 10^{-1}$  (después de 3 de inducción) (Fig.46, ensayo D).

Utilizando una combinación de condiciones de expresión de *trwB* y el T4SS del plásmido pKM101 encontramos que solo la frecuencia de conjugación era dependiente de la cantidad de TrwB y ésta, a su vez, era el factor limitante en el ensayo previamente diseñado en de Paz, (2010), llamado "ensayo de conjugación en condiciones limitantes de TrwB". Por lo tanto éste fue seleccionado para el estudio de los mutantes Tra+, publicados en de Paz, (2010).

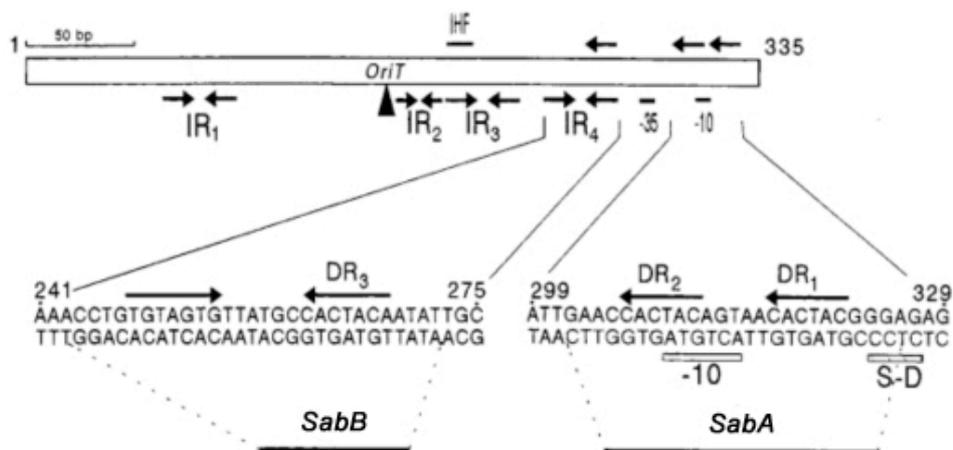
En el ensayo F de la Fig. 46, *trwB* es coexpresada junto con *trwA* bajo el control del promotor *Plac*. En estas condiciones detectamos un incremento significativo de la frecuencia de conjugación tras la inducción (comparar Fig. 46, ensayos E vs. F, líneas 2 y 5). Sin embargo este incremento no es debido a una

mayor cantidad de TrwB en la célula, tal y como puede observarse en la Fig. 46, líneas 2-3 y 5-6. Analizamos los niveles de TrwA en esas mismas células (**Figura 47**) y observamos que esa diferencia significativa entre los ensayos E y F de la Fig. 46 podría atribuirse a la cantidad de TrwA presente (Fig. 15, líneas 5 vs 7 ).



**Figura 47.** Western blot con anti-TrwA a partir de extractos de células donadoras. Leyenda igual que en la Fig. 45.

La expresión de *trwA* desde su propio promotor es autorregulada por la unión de la propia TrwA al *oriT* (Moncalián *et al.*, 1997). La producción de TrwA en el plásmido pHP138 (*oriT-trwAC*) está autoreprimida, según las cantidades de TrwA detectadas por Western blot (Fig. 47, Líneas 2-5). El plásmido pHP138 incluye el *oriT* completo y por lo tanto, los sitios *SbaA* y *SbaB*. En contraste en el plásmido pSU4622, la secuencia promotora *P<sub>trwA</sub>* comienza en el nucleótido 270 de la secuencia del *oriT* (Llosa *et al.*, 1991), incluyendo el sitio de unión TrwA *SbaA*, pero no *SbaB* (**Figura 48**). Llamativamente en este plásmido se detectaron grandes cantidades de TrwA (Fig. 45, línea 2 y 3). Estos datos sugieren que TrwA necesitaría ambos sitios de unión *SbaA* y *SbaB* para reprimir a su propio promotor. Por lo tanto nuestros hallazgos deberían conducir a una redefinición del promotor *P<sub>trwA</sub>*.



**Figura 48.** Esquema del *oriT* de R388. Las flechas indican la presencia de iterones directos (Drs) e invertidos (Irs). El sitio *nic* se indica con una punta de flecha negra vertical. Los sitios de unión de TrwA *SabB* y *SabA* se muestran ampliados. Imagen adaptada de Moncalián *et al.*, 1997.

Estos datos sugieren, que o bien TrwA es ella misma un factor limitante, o bien la co-expresión de ambas proteínas (*trwA-trwB*) es importante para la función de TrwB *in vivo* en concordancia con el efecto estabilizador de TrwA observado en la Fig 46. Es posible que la formación de un complejo TrwA-TrwB favorezca el reclutamiento y la translocación del sustrato.

#### 4.2.1.3. Efecto de la expresión de *trwB* sobre la translocación de la relaxasa TrwC

Para abordar el propósito inicial de determinar regiones de TrwB involucradas en el contacto con el sustrato, también hemos utilizado el ensayo triparental descrito por Draper y cols, (2005). Este ensayo permite detectar el paso de TrwC a la célula receptora independiente de que haya transferencia de ADN. Utilizando este ensayo, los autores demostraron la translocación de TrwC independiente de ADN, es dependiente de la presencia de TrwB.

Las células donadoras fueron transformadas con 3 plásmidos compatibles: uno que codifica para *trwB* bajo el control del promotor natural *P<sub>trwA</sub>* o *P<sub>lac</sub>*, otro que codifica para *trwAtrwC* (*pET29::trwAC*), y un tercero que codifica para el T4SS de *pKM101* (*pKm101Δmob*). Ninguno de ellos contiene el *oriT*, por lo que no hay movilización de ADN. Las bacterias donadoras fueron mezcladas con una segunda

cepa portadora de un derivado de R388 deficiente en *trwC* (pSU1445) y una tercer cepa sin plásmido. La translocación de TrwC desde la primera célula a la segunda es dependiente de la expresión de *trwB* y es detectada por la subsecuente movilización de pSU1445 a una tercer cepa generando un transconjugante.

Las condiciones de expresión de *trwB* fueron idénticas a las ya mostradas en los ensayos de conjugación. Con el fin de regular la producción de TrwB, los ensayos han sido realizados en la cepa *LacI<sup>q</sup>* D1210 (**Figura 49**, ensayos G-H-I) y en un sistema no reprimido utilizando DH5 $\alpha$  como célula donadora (Fig.49, ensayos J-K-L).

Expresión de *trwB* en trans

Célula donadora									
	-	+	++	-	+	++	-	+	++
D1210	<b>G</b>			<b>H</b>			<b>I</b>		
	$2 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-4}$
DH5 $\alpha$	<b>J</b>			<b>K</b>			<b>L</b>		
	$2 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-3}$	$7 \times 10^{-4}$

**Figura 49.** Ensayos triparentales. En este sistema TrwC es translocada desde la primera célula donadora a la segunda en ausencia de ADN. Leyenda igual que en la Fig. 42. Los datos representan el promedio de 5 a 10 ensayos independientes.

En la Fig.49 se muestran las frecuencias de translocación de TrwC. En estos ensayos, la translocación de TrwC, es dependiente de la concentración de TrwB. Por otro lado, cuando *trwB* es co-expresada con *trwA* bajo el control del promotor *P<sub>lac</sub>*, observamos que la frecuencia de translocación se incrementa 10 veces. Esto sugiere que la coexpresión de *trwAB* tiene un efecto directo en el reconocimiento del sustrato. Este efecto también ha sido observado cuando el sustrato es TrwC-ADN en los ensayos de conjugación (Fig.46, líneas 2 y 5).

Cuando *trwB* fue expresada desde DH5 $\alpha$  (Fig.49, ensayos J-K-L), detectamos translocación de TrwC aún en ausencia de IPTG, lo que era de esperar para un

sistema no reprimido, y las frecuencias obtenidas fueron 10 veces mayores respecto al mismo ensayo en D1210 (Fig. 49, ensayo G).

#### 4.2.2. Efecto de los mutantes de TrwB en la translocación del sustrato

Para ver el efecto de las mutaciones de TrwB en la translocación de ADN, se utilizaron las condiciones limitantes de conjugación y ensayos triparentales para la translocación de TrwC. Esta parte del trabajo fue comenzada por Héctor de Paz (de Paz, 2010) y completada en el presente trabajo. Los resultados han sido publicados en de Paz *et al.*, 2010, por lo que sólo se revisan aquí brevemente los ensayos de conjugación. Los datos se muestran en la **Tabla 7** y la **Figura 50** resume los resultados de de Paz y cols, (2010).

En la Tabla 7, las letras E y J hacen referencia a los ensayos realizados bajo diferentes condiciones de conjugación explicadas en las secciones anteriores e ilustradas en la Fig. 42.

Los mutantes de TrwB que resultaron ser Tra+ en condiciones estándar de conjugación (Introducción, Tabla 1) fueron ensayados bajo el control del promotor *P<sub>lac</sub>* y del T4SS de pKM101 (sistema limitante de TrwB) (Tabla 7, ensayos E). También analizamos los mutantes en el ensayo triparental para estudiar el efecto de las mutaciones de TrwB en la translocación de la relaxasa TrwC sin ADN (Tabla 7, ensayo J).

**Tabla 7.** Efecto de los mutantes de TrwB en la transferencia de ADN y TrwC

<b>Tipo de ensayo<sup>1</sup></b>	<b>E</b>			<b>J</b>
<b>Promotor de <i>trwB</i></b>	<b><i>P<sub>lac</sub></i></b>			<b><i>P<sub>trwA</sub></i></b>
<b>Coexpresión de <i>trwA</i></b>	<b>NO</b>			<b>Sí</b>
<b>Transferencia de ADN</b>	<b>Sí</b>			<b>No</b>
<b>IPTG</b>	-	+	++	-
<b>Mutantes en <i>trwB</i> (dominios)</b>				
Salvaje	5x10 <sup>-6</sup>	2x10 <sup>-3</sup>	5x10 <sup>-2</sup>	4x10 <sup>-3</sup>
Q390A (NBD)	5x10 <sup>-8</sup>	2x10 <sup>-7</sup>	4x10 <sup>-4</sup>	<7x10 <sup>-7</sup>
R240A E241A (AAD)	3x10 <sup>-7</sup>	3x10 <sup>-4</sup>	2x10 <sup>-2</sup>	6x10 <sup>-4</sup>
H244A W245A (AAD)	1x10 <sup>-8</sup>	7x10 <sup>-5</sup>	2x10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>-6</sup>
D252A D253A (AAD)	6x10 <sup>-7</sup>	3x10 <sup>-4</sup>	2x10 <sup>-1</sup>	8x10 <sup>-4</sup>
N271D (AAD/ICH)	4x10 <sup>-7</sup>	4x10 <sup>-4</sup>	4x10 <sup>-2</sup>	4x10 <sup>-6</sup>
K275A (ICH)	2x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	4x10 <sup>-2</sup>	2x10 <sup>-4</sup>
K398A R417S (ICH)	<b>1x10<sup>-5</sup></b>	<b>2x10<sup>-2</sup></b>	<b>2x10<sup>-1</sup></b>	7x10 <sup>-5</sup>
K421A D425A (ICH)	1x10 <sup>-7</sup>	2x10 <sup>-3</sup>	1 x10 <sup>-4</sup>	4x10 <sup>-3</sup>

**Tabla 7.** Frecuencias de conjugación con los distintos mutantes de TrwB bajo distintas

condiciones experimentales. <sup>1</sup> E y J hace referencia al tipo de ensayo explicado en las secciones anteriores. En E y J las cepas son D1210 y DH5 $\alpha$ , respectivamente. El ensayo E muestra la transferencia de ADN en presencia de los mutantes de TrwB. En el ensayo J se muestra el efecto de los mutantes de TrwB sobre la translocación de TrwC independiente de ADN. Los datos representan la media de 2-9 experimentos independientes. La disminución en las frecuencias conjugativas respecto de la proteína salvaje se señalan en gris claro cuando la diferencia es de 1-2 log o en gris oscuro cuando la diferencia es mayor de 3 log. Las frecuencias mayores a la proteína salvaje se indican en negrita. La inducción con IPTG se indica como: -, + y ++ que representa 0, 1 y 3 horas de inducción respectivamente. Los datos mostrados fueron tomados de Paz y cols, (2010).

Los resultados de la Tabla 7 muestran que al ensayarlos en el sistema limitante (ensayo E) algunos mutantes mostraron un fenotipo interesante. El mutante (Q390A), localizado en la región de unión a nucleótidos, era 100 veces menos eficiente que la proteína salvaje. Los mutantes en ciertos residuos en el ICH mostraron fenotipos interesantes. Mientras que el doble mutante K398A R417S fue 10 veces más eficiente que la proteína salvaje, para el doble mutante K421A D425A se detectó una disminución de 2 log en la frecuencia de conjugación.

Estos datos sugieren que el ICH de TrwB tiene un papel relevante en la función de la proteína.

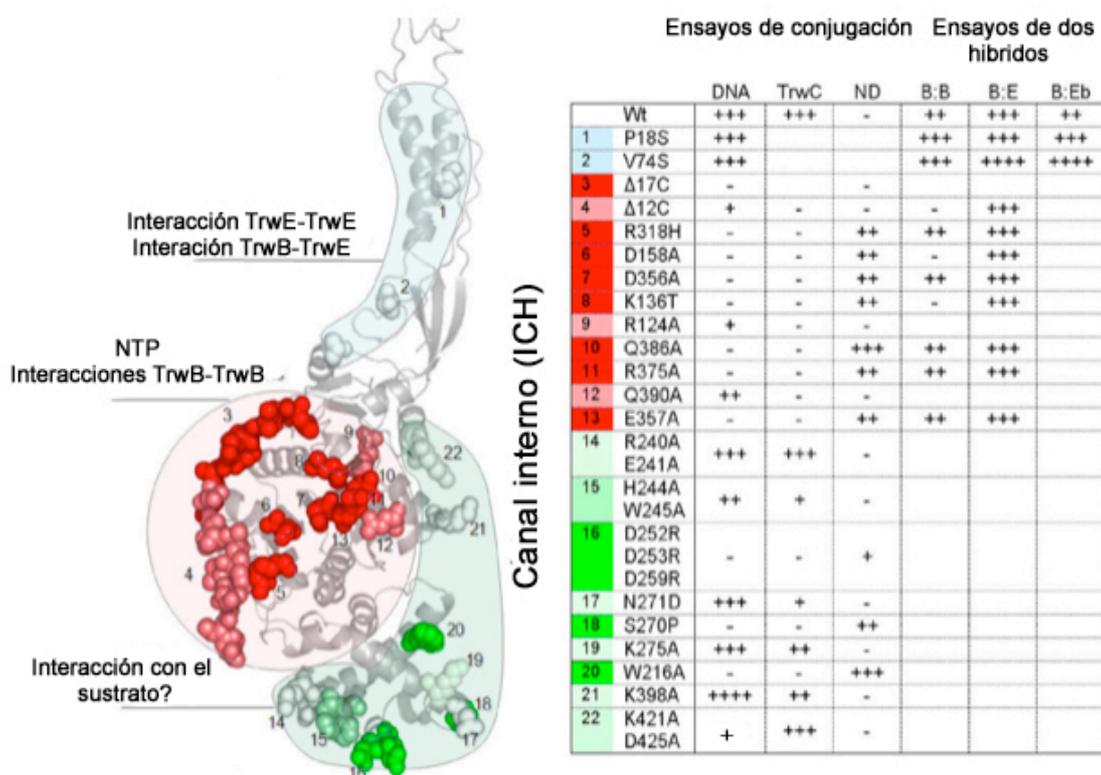
Con el fin de determinar si alguna de las mutaciones en TrwB afecta específicamente al transporte de TrwC, se realizaron ensayos de conjugación triparentales (Tabla 7, ensayo J). En primer lugar vemos que todos los mutantes Tra<sup>-</sup>, mostrados en la Tabla 1 de la Introducción, deficientes o afectados severamente en la transferencia de ADN (K136T, R124A, D158A, D356A, E357A, R375A, Q386A, W216A, S270P, R318H, triple mutante AAD y mutantes  $\Delta$ 12C), eran deficientes para el transporte TrwC en ausencia de ADN:  $< 4 \times 10^{-07}$  transconjugantes por célula donadora en comparación con una frecuencia de  $4 \times 10^{-3}$  de TrwB salvaje (de Paz *et al.*, 2010) y respecto a aquellos que eran Tra<sup>+</sup> en los ensayos estándar de conjugación (Fig. 50).

El mutante Q390A (NBD) y el doble mutante H244A W245A (AAD), se mostraron afectados en la transferencia de TrwC. Curiosamente, el mutante K398A localizado en el interior del ICH, y los mutantes K275A y N271D en la entrada del ICH, no fueron afectados en la transferencia de ADN, pero mostraron una disminución significativa en el transporte de TrwC.

En resumen, todos los mutantes afectados en la transferencia de ADN, estaban también afectados en la translocación de TrwC. Es interesante que algunos

mutantes no estaban afectados en la transferencia de ADN pero sí lo estaban en la translocación de TrwC (Tabla 7).

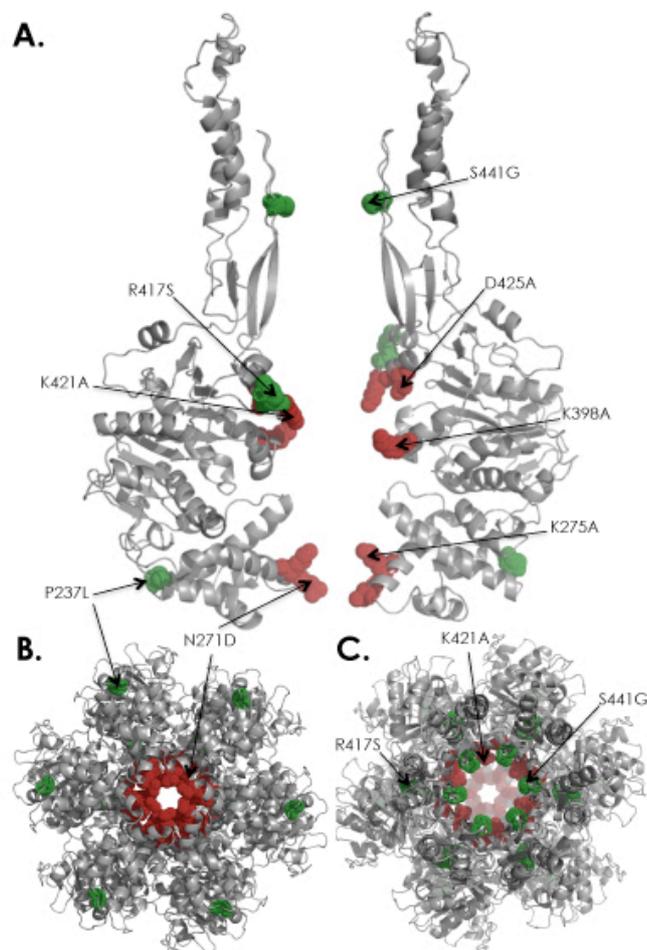
Los residuos afectados específicamente en el transporte de TrwC se encuentran en el interior o en la entrada del ICH (K398, K275, y especialmente N271). Esta ubicación sugiere que podrían tener un papel en el reclutamiento de TrwC.



**Figura 50.** Resumen de los datos obtenidos en el estudio de los distintos mutantes de TrwB, en cuanto a su funcionalidad en conjugación (ADN), translocación de TrwC sin ADN, dominancia negativa (ND) y los distintos análisis mediante el ensayo de dos híbridos bacteriano, indicándose las proteínas analizadas sin su prefijo Trw (B: TrwB; E: TrwE; Eb: TrwE del sistema Trw de *bartonella*). La imagen de la izquierda señala la localización de los residuos en un monómero de TrwB. Se indica la posible función de cada dominio y el efecto de los mutantes mediante un código de colores. Los colores oscuros significan mutaciones que afectan más a la funcionalidad de la proteína. El mutante K398A contiene la mutación adicional R417S. Imágen adaptada de Paz y cols, (2010).

### 4.2.3. Caracterización de los residuos del ICH del hexámero de TrwB afectados en conjugación

Los resultados anteriores indican que los mutantes de un grupo de lisinas localizadas en el ICH de TrwB K275A, K398A R417S, y K421A D425A y el mutante N271D, localizado a la entrada citoplasmática del ICH, presentaban fenotipos interesantes tanto en la transferencia del complejo TrwC-ADN como en la de TrwC sin ADN por lo que merecían ser estudiados en profundidad. En la **Figura 51**, se resaltan los residuos mutados que serán analizados en profundidad en este apartado.



**Figura 51.** Representación en cintas de la estructura de TrwB en la que el TMD ha sido modelado. A) Dos monómeros de TrwB enfrentados. Los residuos mutados son señalados en código de color. Las mutaciones puntuales se indican en rojo. Las mutaciones espontáneas se indican en verde. B) Vista citoplasmática del hexámero de TrwB. C) Vista opuesta del hexámero de TrwB.

#### 4.2.3.1. Construcción de mutantes

Teniendo en cuenta que algunos de los mutantes ensayados contenían mutaciones adicionales, decidimos construir y ensayar plásmidos que codificaran exclusivamente para los mutantes en los residuos del ICH que queríamos estudiar.

Durante la construcción de los nuevos mutantes, encontramos que aparecían mutaciones espontáneas adicionales con frecuencias mucho mayores a las esperadas. De hecho, la alta frecuencia con la que aparecían estas mutaciones podría reflejar un efecto compensatorio sobre la mutación original, que posiblemente tendría un efecto tóxico en la célula.

El mutante original K398A (pHP170), fue en su momento muy difícil de obtener, y cuando se secuenció se encontró que contenía la mutación adicional R417S (de Paz *et al.*, 2010), localizada muy cerca del ICH. De manera similar, cuando construimos el mutante K275A (plásmido pDEL009) encontramos que algunas de las colonias analizadas presentaban mutaciones adicionales, lo que nos permitió identificar el mutante triple P237L K275A S441G. El residuo P237 estaba localizado en el dominio AAD, y el residuo S441, se localizaba en el ICH pero muy próximo a la membrana. Por lo que decidimos también incluirlo en nuestro análisis. Para ello, a partir de este triple mutante, construimos dos plásmidos que resultaron en P237L K275A (pDEL014) y S441G (pDEL015).

#### 4.2.3.2. Caracterización *in vivo* de los mutantes

Para el estudio de los mutantes de TrwB analizados en de Paz y cols, (2010) y los nuevos obtenidos en este trabajo, se han optimizado las condiciones del ensayo de conjugación en los sistemas limitante y triparental, como por ejemplo, variando el volumen en el que se crecían las células donadoras y/o tiempos de incubación.

Los plásmidos que codifican *trwB* (salvaje y nuevos mutantes) fueron ensayados en estas nuevas condiciones para estudiar la transferencia de ADN, (**Tabla 8**, ensayos E y M) o la translocación de TrwC independiente de ADN (ensayo H).

**Tabla 8.** Ensayos de conjugación con mutantes de TrwB en el ICH

Tipo de ensayo <sup>1</sup>		E	M	H
Sustrato		TrwC-ADN	TrwC-ADN	TrwC
TrwA		+	-	+
Plásmido	Mutante en <i>trwB</i>			
C-	-	<1,7 x 10 <sup>-06</sup>	<3,4 x10 <sup>-06</sup>	<4,8 x10 <sup>-06</sup>
pHP139	Salvaje	3,3 x 10 <sup>-01</sup>	<3,1 x10 <sup>-06</sup>	2,46 x10 <sup>-04</sup>
pHP145	<i>N271D</i>	2,8 x 10 <sup>-02</sup>	<7,5 x10 <sup>-06</sup>	7,6 x10 <sup>-06</sup>
pDEL009	<i>K275A</i>	7,2 x 10 <sup>-02</sup>	<2,6 x10 <sup>-06</sup>	1,4 x10 <sup>-05</sup>
pHP171	<i>K398A</i>	<b>1,0</b>	<b>3,5 x10<sup>-04</sup></b>	<b>1,6 x10<sup>-03</sup></b>
pDEL002	<i>K421A</i>	<b>1,4</b>	6,7 x10 <sup>-06</sup>	<b>2,2 x10<sup>-03</sup></b>
pDEL009c	<i>P237L K275A S441G</i>	4,3 x 10 <sup>-04</sup>	nd	<4,8 x10 <sup>-07</sup>
pDEL014	<i>P237L K275A</i>	1,2 x 10 <sup>-01</sup>	nd	1,9 x10 <sup>-04</sup>
pDEL015	<i>S441G</i>	5,0 x 10 <sup>-03</sup>	<5,6 x10 <sup>-06</sup>	<4,1 x10 <sup>-06</sup>
pHP148	<i>K275A K398A</i>	1,8 x 10 <sup>-01</sup>	6,57 x10 <sup>-05</sup>	5,2 x10 <sup>-04</sup>
pHP169	<i>K421A D425A</i>	1,3 x 10 <sup>-03</sup>	<2,9 x10 <sup>-06</sup>	7,0 x10 <sup>-06</sup>
pHP170	<i>K398A R417S</i>	2,45 X 10 <sup>-01</sup>	<4,1 x 10 <sup>-06</sup>	3,9 x 10 <sup>-04</sup>

**Tabla 8.** Los ensayos se realizaron usando la cepa D1210 como donadora. En los ensayos E y M se muestra el efecto de los mutantes de TrwB sobre la transferencia de ADN usando el sistema limitante en presencia o ausencia de TrwA (+/-TrwA), y en el H el efecto sobre la translocación de la relaxasa TrwC. En todos los ensayos se utilizaron los plásmidos derivados de pHP139 (*Plac-trwB*) y el T4SS de pKM101. Las frecuencias mayores a la proteína salvaje se indican en negrita. Las menores en gris. < significa por debajo del límite de detección. Las frecuencias representan la media de 3-10 experimentos independientes. <sup>1</sup> Los ensayos E y H son los mismos indicados en la Fig. 42.

En estos nuevos ensayos, los mutantes en el ICH de TrwB mostraron variaciones de las frecuencias conjugativas respecto a la proteína salvaje (Tabla 8, ensayo E). Para el caso de los mutantes localizados en la entrada citoplasmática de TrwB, *N271D* y *K275A*, la frecuencia de conjugación mostró una disminución modesta. Sin embargo, los mutantes que protruyen hacia el canal interno y más cercanos al NTP, *K398A* y *K421A*, mostraron un incremento casi 1 log superior que la proteína salvaje. Los mutantes dobles *K275A K398A* y *K398A R417S* se

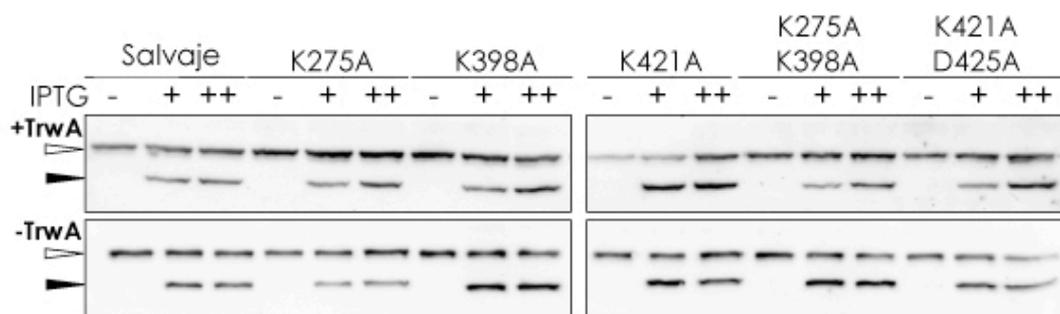
comportaban como la proteína salvaje. Curiosamente, cuando el mutante K421A fue ensayado junto con la mutación adicional D425A, se encontró que ésta provocaba una disminución de 2 log en la transferencia de ADN. Los fenotipos encontrados para los dobles mutantes, sugieren que las mutaciones (K417S y D425A) tendrían un efecto compensatorio sobre la mutación original K398A y K421A, respectivamente.

El triple mutante P237L K275A S441G obtenido durante la construcción del plásmido pDEL009, mostró una reducción importante en la frecuencia de conjugación, observamos que la mutación S441G era responsable de la disminución en la transferencia de ADN (Tabla 8, ensayo E). Este residuo S441 está localizado dentro del ICH, próximo a la región transmembrana (Fig. 51), por lo que sería también un candidato para la interacción con el sustrato conjugativo.

La proteína accesoria TrwA es importante para la función de TrwB *in vivo*. Como hemos observado, la co-expresión de *trwA* y *trwB* produce un incremento de la frecuencia conjugativa tras una hora de inducción de la expresión desde el *Plac* (Fig. 46, ensayo E vs. F).

Por lo tanto, las mutaciones en TrwB podrían afectar específicamente la interacción entre ambas proteínas. Se llevaron a cabo ensayos de conjugación en condiciones limitantes de TrwB pero en ausencia de TrwA. Para los nuevos ensayos se construyó el plásmido pDEL017 que codifica *oriT+trwC* (Tabla 8, ensayo M) para reemplazar el plásmido pHP138 que codifica para *oriT+trwA+trwC* (Tabla 8, ensayo E). Los resultados mostraron niveles muy bajos o indetectables para la transferencia de ADN (Tabla 8, ensayo M). Solo se detectaron transconjugantes para los mutantes K421A, K275A K398A, y particularmente, para K398A. Estos resultados sugieren que las mutaciones K398A, K421A y K275A afectan la interacción funcional entre TrwA y TrwB.

Llevamos a cabo ensayos de Western blot de las células donadoras para determinar si la presencia/ ausencia de TrwA tenía algún efecto en los niveles de TrwB o sus mutantes, pero no observamos diferencias significativas en las cantidades detectadas (**Figura 52**). Estos datos a su vez, indican que los fenotipos observados no son causados por una disminución/aumento de la cantidad de TrwB en la célula, sino por las propias mutaciones.



**Figura 52.** Western blot con anti-TrwB a partir de extractos de células donadoras. *trwB* es expresada desde el *Plac* a distintos tiempos de inducción con IPTG: sin (-), 1 hora (+) y 3 horas (++) , en presencia de pKM101 $\Delta$ *mob* y pHP138 (+TrwA) o pDEL017 (-TrwA) como en los ensayos de conjugación de la Tabla 8 (ensayos E y M). En la parte superior se indican los mutantes analizados. La punta de flecha negra indica la banda específica mientras que la punta de flecha blanca indica inespecificidades.

En el apartado 4.2.1.3. habíamos realizado una serie de ensayos triparentales con TrwB salvaje y encontramos que usando DH5 $\alpha$  como donadora se obtenían las mayores frecuencias conjugativas. Por esta razón, estas células fueron seleccionadas para estudiar el efecto de los mutantes Tra+ detectados en de Paz *et al.*, (2010) sobre la translocación de TrwC (Tabla 7, ensayo J). En esos ensayos observamos que la co-expresión constitutiva de los mutantes de *trwB* desde el promotor natural *P<sub>trwA</sub>* afectaba a la viabilidad de las células donadoras. Cuando estas células fueron analizadas, detectamos que los plásmidos no eran estables después de prologados períodos de crecimiento. Los análisis de ADN mostraban especies aberrantes (datos no mostrados).

Para eliminar este problema, la cepa D1210 *lacI<sup>Q</sup>* fue utilizada como donadora. El ensayo triparental optimizado se realizó co-transformando células D1210 con los plásmidos que codifican para *trwB* y los mutantes bajo el control del promotor *Plac* (iguales a los del sistema limitante de TrwB). Así, también fue posible controlar la expresión de *trwB* y correlacionarla con la translocación de TrwC. De manera similar al ensayo del apartado 4.2.1.3, se utilizó un plásmido que codifica para *trwAtrwC* (plásmido pET29::*trwAC*) y otro que codifica para el T4SS de pKM101 (pKm101 $\Delta$ *mob*). Ninguno de ellos es movilizable.

Después de realizar los ensayos de conjugación en estas condiciones, hemos analizado la estabilidad de los plásmidos y observado que todos mantenían su estructura (datos no mostrados).

En estas nuevas ensayos, encontramos una correlación entre la transferencia de ADN y la translocación de TrwC para todos los mutantes del ICH (Tabla 8, ensayo H), en contraste con algunas inconsistencias encontradas en los ensayos previos que eran difíciles de interpretar (Tabla 7, ensayo J). Los mutantes K398A y K421A, localizados en el ICH cercanos a la membrana interna, mostraron frecuencias de translocación casi 1 log mayores que TrwB salvaje, mientras que para los mutantes N271D y K275A se encontró una disminución en la translocación de TrwC de alrededor de 1 log, respecto de TrwB salvaje. Fue notable, que el incremento detectado para el mutante K421A fue revertido por la mutación adicional D425A. De manera similar, detectamos un fenotipo intermedio para los dos dobles mutantes K275A K398A y K398A R417S, respecto del mutante simple K398A. La mutación S441G, próxima a la membrana, abolió el transporte de TrwC en las condiciones ensayadas.

#### **4.2.3.3. Caracterización *in vitro* de los mutantes del ICH de TrwB**

El análisis *in vivo* de los mutantes del ICH de TrwB sugirió que los residuos K275, K398 y K421 tienen un rol especial tanto en la transferencia del complejo TrwC-ADN como en la translocación de TrwC sin ADN. Por ello decidimos llevar a cabo una serie de ensayos *in vitro* para caracterizar en profundidad este grupo de lisinas que, por su carga positiva serían los candidatos para establecer interacciones proteína-ADN durante la transferencia del sustrato conjugativo.

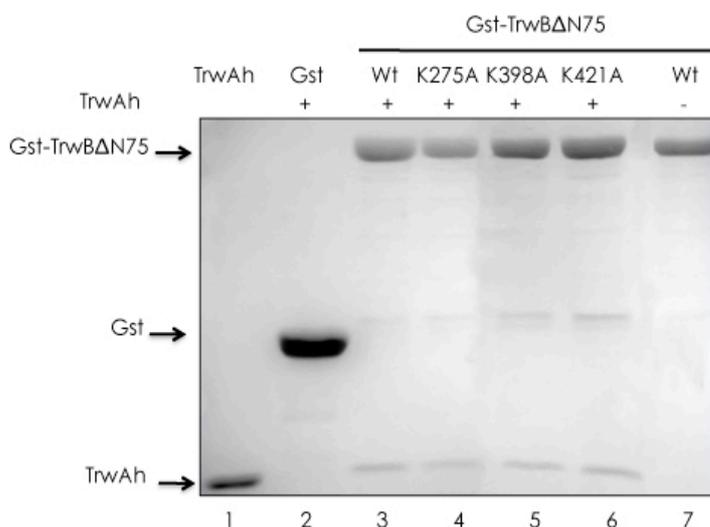
Para ello, en el trabajo *in vitro*, hemos utilizado las proteínas derivadas de TrwB $\Delta$ N70 mutantes. Se han purificado los mutantes de TrwB $\Delta$ N70 K275A, K421A y K398A. Los mutantes dobles K275A K398A y K421A D425 habían sido purificado por el Dr. Héctor de Paz. TrwB $\Delta$ N70 salvaje y TrwA con una cola de histidinas (TrwA-h) fueron purificadas por la Dra. Inmaculada Matilla. Los protocolos de purificación se describen en el apartado de metodología.

#### **Interacción con TrwA y ADN**

Trabajos previos habían demostrado que TrwB $\Delta$ N70 une ADN plasmídico (Moncalián *et al.*, 1999a) e interacciona específicamente con la proteína accesoria TrwA (Llosa *et al.*, 2003).

Con el objetivo de determinar si las mutaciones en el ICH de TrwB tienen algún efecto en la interacción con TrwA, se realizó un ensayo de cromatografía de

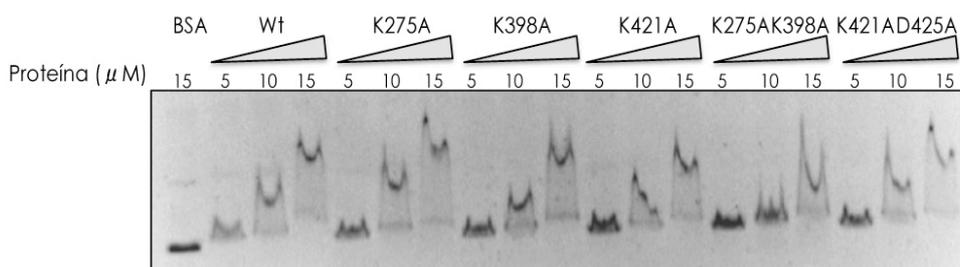
afinidad como el descrito por Llosa y cols, (2003). El dominio soluble citoplasmático de TrwB $\Delta$ N75 y de los mutantes, K275A, K398A y K421A fue fusionado al C-terminal de la enzima *glutathione sepharose transferase* (GST). Las fusiones aisladas a partir de sobrenadantes de extractos celulares fueron unidas a la resina de *glutathione-sepharose*. Una vez pegadas a la resina se aplicó a la resina TrwA-h previamente purificada. Los complejos TrwB $\Delta$ N75-TrwAh fueron eluidos de la resina con glutatión reducido. Los resultados obtenidos (**Figura 53**) muestran que los tres mutantes ensayados retuvieron la proteína TrwA-h al igual que la proteína TrwB $\Delta$ N75 salvaje. Con lo cual estas mutaciones no han provocado una pérdida de afinidad con la proteína TrwA-h, en las condiciones de este ensayo.



**Figura 53.** Interacción entre TrwB $\Delta$ N75 y TrwA-h. GST: glutatión sefarosa transferasa. TrwAh: TrwA fusionada a una cola de histidinas. GST-TrwB $\Delta$ N75: fusiones de TrwB $\Delta$ N75 y/o sus mutantes. La presencia /ausencia de TrwA se indica como + y -, respectivamente. Línea 1: 2  $\mu$ g de TrwA-h. Línea 2: eluidos de GST con incubación previa con TrwA-h. Líneas 3-6: eluidos de las proteínas de fusión previamente incubadas con TrwA-h. Línea 7: GST-TrwB $\Delta$ N75 sin incubación TrwA-h. La flecha negra indica las proteínas eluidas.

Posteriormente quisimos evaluar la capacidad de unión a ADN de estos mutantes. Se realizaron ensayos de retardo en gel de agarosa (EMSA) como estaba descrito en Moncalián y cols, (1999) utilizando proteínas purificadas y ADN superenrollado (pUC8). Como se observa en la **Figura 54**, todos los mutantes ensayados fueron capaces de retardar ADN de forma inespecífica, de manera similar a la proteína salvaje. Por tanto, las mutaciones descritas no han causado

deficiencias en la capacidad de unión a ADN en estas condiciones experimentales.



**Figura 54.** EMSA de TrwB $\Delta$ N70 y mutantes en presencia de 10 ng de ADN superenrollado y concentraciones crecientes de monómeros de TrwB $\Delta$ N70: 5, 10 y 15  $\mu$ M.

### Ensayos de actividad ATPasa

TrwB, es hasta el momento la única T4CP que presenta actividad ATPasa *in vitro*, la cual es fuertemente estimulada en presencia de ADN y TrwA (Tato *et al.*, 2007).

En los anteriores ensayos no encontramos diferencias en la interacción con TrwA o ADN entre los mutantes de TrwB $\Delta$ N70 y la proteína salvaje. Sin embargo, y dado que ambos sustratos son estimuladores de la actividad ATPasa, decidimos estudiar el efecto de las mutaciones en el ICH de TrwB sobre la función estimuladora de la actividad ATPasa de ambos sustratos.

Mediante el ensayo acoplado para la hidrólisis de ATP (Tato *et al.*, 2005), se midió la actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70 y cada mutante en presencia o en ausencia de los diferentes inductores, utilizando proteínas purificadas como se describe en metodología.

### Optimización del ensayo

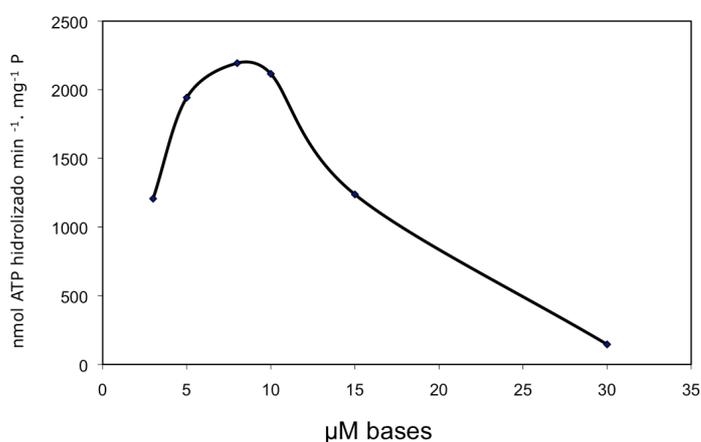
Previamente había sido determinada la actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70 en presencia de ADN de cadena doble y simple (Tato *et al.*, 2005, 2007). Altas concentraciones de ADN de cadena doble no inhiben la actividad ATPasa, mientras que la actividad ATPasa es inhibida fuertemente en presencia de ADN de cadena simple una vez que se alcanza la máxima actividad.

A partir de una concentración de 0,3  $\mu$ M de monómeros de TrwB $\Delta$ N70, la hidrólisis de ATP es proporcional a la concentración de TrwB $\Delta$ N70. A partir de esa

concentración crítica se produciría el ensamblaje de los hexámeros de TrwB sobre el ADN (Tato *et al.*, 2007).

Por lo tanto para los ensayos realizados en este trabajo han sido empleadas las concentraciones de los inductores de la actividad ATPasa descritas por Tato y cols (2007): 0,3  $\mu\text{M}$  de monómero, 10  $\mu\text{M}$  de pb de ADN superenrollado (pUC8) y 0,2  $\mu\text{M}$  de tetrámero de TrwA.

Dado que la actividad es inhibida a altas concentraciones de ADN de cadena simple, se ha realizado una curva de saturación de la actividad enzimática con el fin de determinar la concentración óptima del sustrato. Los ensayos fueron realizados midiendo la actividad ATPasa a concentraciones fijas de Trw $\Delta\text{N}70$  (0,3  $\mu\text{M}$  de monómero), en presencia de concentraciones crecientes de ADN de cadena simple de los bacteriofagos M13mp18 o  $\phi\text{x}174$  y a un pH de 6,2. La menor concentración de ADN que producía la mayor actividad fue seleccionada para los subsecuentes ensayos de actividad ATPasa. La **Figura 55**, muestra la actividad ATPasa de Trw $\Delta\text{N}70$  en presencia de concentraciones crecientes de ADN de cadena simple (M13).

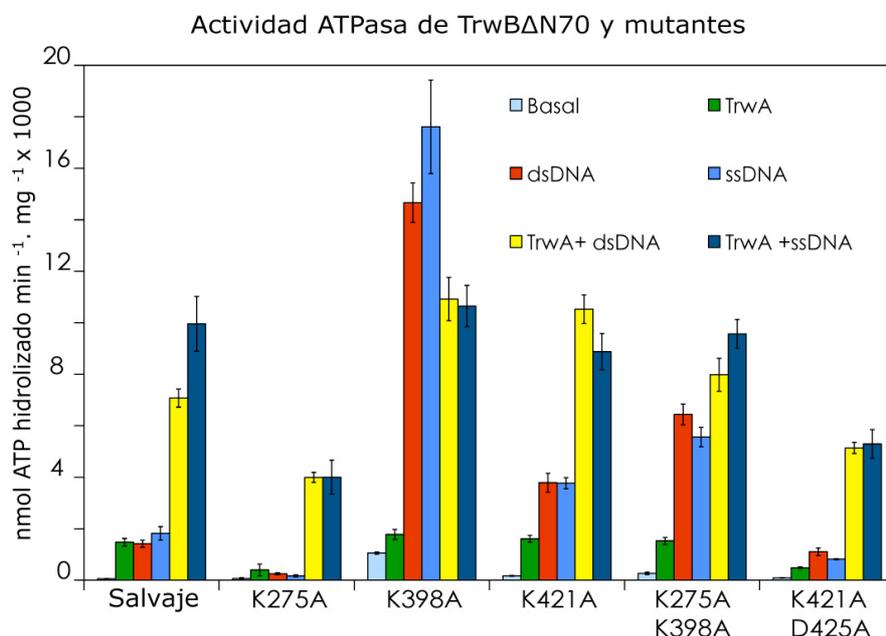


**Figura 55.** Estimulación de la actividad ATPasa de Trw $\Delta\text{N}70$  en presencia de concentraciones crecientes de ADN de cadena simple circular del fago M13.

### Determinación de la actividad ATPasa de Trw $\Delta\text{N}70$ y mutantes

Los valores absolutos de actividad ATPasa para cada proteína en presencia/ausencia de sustratos de ADN, TrwA, o de una combinación de ambos se muestran en la **Figura 56**. Los ensayos fueron iniciados adicionando Trw $\Delta\text{N}70$  y/o

mutantes a la mezcla de reacción.



**Figura 56.** Estimulación de la actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70 y mutantes usando concentraciones fijas de 0,3  $\mu$ M de monómeros de TrwB $\Delta$ N70 y en presencia de 5 mM ATP, 5  $\mu$ M de bases de ADN de cadena simple (ssDNA), o 10  $\mu$ M de pares de bases (pb) de ADN de cadena doble (dsDNA). 0,2  $\mu$ M de tetrámero de TrwA o una combinación de sustratos. El efecto de los estimuladores de la actividad ATPasa se muestra en código de color. Los datos representan la media de al menos 5 experimentos independientes.

Todos los sustratos estimularon la actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70. Así mismo, la combinación de TrwA con los sustratos de ADN tuvo un efecto sinérgico sobre la actividad enzimática de TrwB $\Delta$ N70, en concordancia con los datos obtenidos por Tato y cols, (2007).

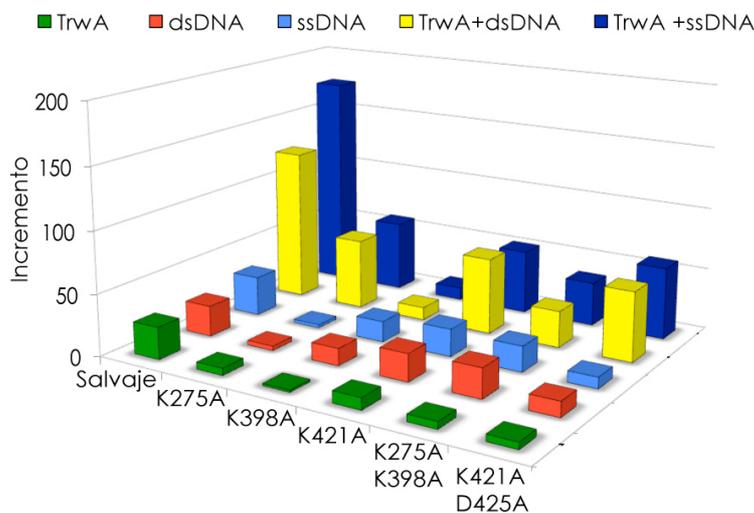
En general los mutantes en el ICH, mostraron valores basales de actividad ATPasa levemente incrementados con respecto a la proteína salvaje. Lo que sugiere que los residuos mutados podrían estar implicados en la regulación de la actividad de la proteína. Este incremento fue 1,2 (K275A); 3 (K421A); 4,7 (K275A K398A) y 1,6 (K421A D425A), respecto a la proteína salvaje. Sin embargo, es significativo el incremento producido por el mutante K398A. Para este mutante se obtuvieron valores de actividad ATPasa 18 veces mayores respecto a la proteína salvaje (Fig. 56, barras color celeste).

Cuando TrwA es adicionada a la mezcla de reacción en ausencia de ADN, observamos valores de actividad similares a TrwB $\Delta$ N70 para los mutantes K398A, K421A y K275A K398A, mientras que en los mutantes K275A y K421A D425A los valores obtenidos eran más bajos (Fig. 56, barras verdes).

La adición de sustratos de ADN de cadena doble (barras rojas) o de cadena simple (barras azules-claras) produce un incremento de la actividad para todos los mutantes respecto a sus niveles basales. Los mutantes K421A y particularmente K398A, mostraron una actividad superior de 2, 3 y 10 veces respectivamente si se compara con TrwB $\Delta$ N70. Curiosamente la mutación K275A en el mutante simple K398A (K275A K398A) y la mutación adicional D425A en el mutante K421A (K421A D425A), provocaron una disminución de la actividad de 3 a 4 veces con respecto a sus mutantes simples. Estas mutaciones tendrían efectos compensatorios sobre las mutaciones originales K398A y K421A. Este mismo efecto ha sido observado en los ensayos *in vivo* (Tabla 8). Independientemente de sus valores absolutos de actividad ATPasa, todos los mutantes mostraron incrementos significativos de la actividad en presencia de los sustratos de ADN, con la excepción del mutante K275A, localizado a la entrada del ICH. No se observaron diferencias significativas al añadir sustratos de ADN de cadena simple o doble.

Al añadir TrwA y ADN, la mayoría de los mutantes mostraron valores absolutos de actividad ATPasa mucho más altos que en presencia de TrwA o ADN por separado (Fig. 56). Cabe destacar que el mutante K275A, mostró valores de actividad ATPasa cuantificables sólo en presencia de ambos inductores. Fue llamativo que, el mutante K398A, mostrara una disminución de la actividad en estas condiciones respecto a la actividad en presencia de ADN, asemejándose a la proteína salvaje. Es interesante que en las condiciones presumiblemente más parecidas a las fisiológicas, es decir en presencia de TrwA y ADN, es dónde se observan menos diferencias entre la proteína salvaje y los mutantes. Esto explicaría el moderado efecto de estos mutantes en los ensayos de conjugación.

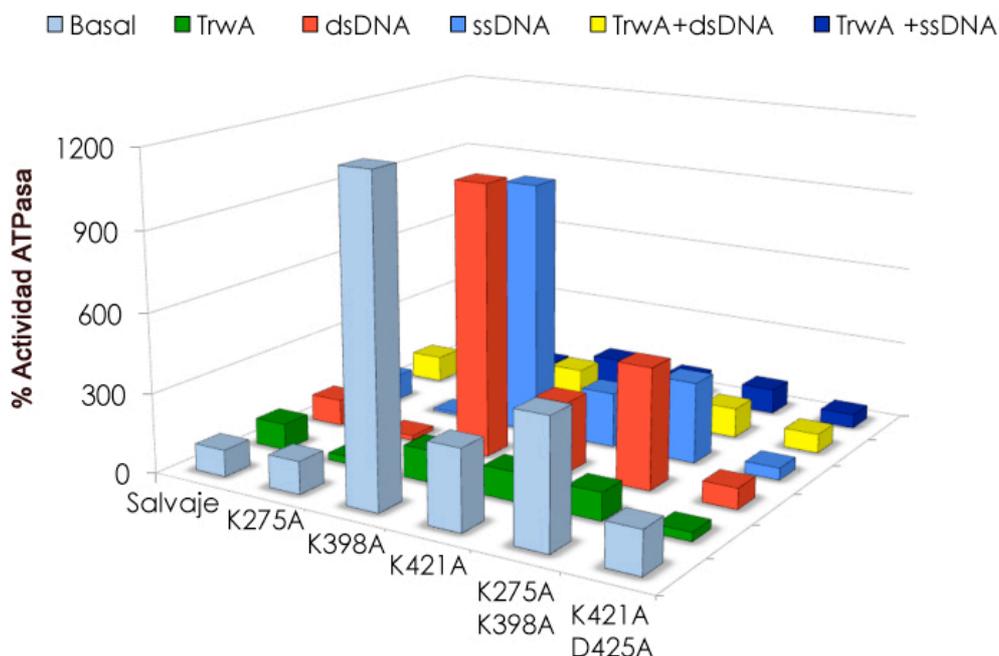
Con idea de comparar el efecto de los residuos mutados con respecto a la proteína salvaje, se han representado en la **Figura 57** los valores de actividad ATPasa relativos para cada proteína. Es decir, los valores absolutos obtenidos en presencia de los diferentes sustratos sobre la actividad basal de cada mutante.



**Figura 57.** Incremento de la actividad ATPasa respecto a la actividad basal al añadir TrwA y/o ADN. Se representa la relación del valor de la actividad ATPasa sobre la actividad basal de la proteína, basándose en los datos mostrados de la Fig. 56.

Los residuos mutados afectan significativamente a la estimulación de la actividad de TrwB $\Delta$ N70 en presencia de los diferentes inductores. Lo más llamativo es la pérdida de estimulación de la actividad en presencia de TrwA (sola sin ADN) en todos los mutantes, así como el nivel de estimulación en presencia de ambos inductores afectando sobre todo el mutante K398A. El mutante K275A no es estimulado por ADN (solo sin TrwA).

Finalmente la **Figura 58** muestra los datos de la actividad ATPasa de los mutantes en relación a la proteína salvaje, es decir dando un valor de 100% a la actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70 en cada condición ensayada. En esta gráfica queda patente que los fenotipos más destacables son el incremento de la actividad basal, y con ADN de los mutantes K398A y K421A, y la pérdida de estimulación por TrwA o ADN de K275A.



**Figura 58.** Representación del porcentaje (%) de actividad ATPasa de TrwB $\Delta$ N70 y mutantes, basándose en los datos de la Fig. 56.

#### 4.2.4. Recapitulación de los datos obtenidos para los mutantes

Los resultados de este capítulo muestran que los mutantes en el ICH de TrwB afectan a la actividad de la proteína tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo que los residuos con cargas positivas en el ICH tienen un rol importante en dicha actividad.

Los datos mostraron una correlación entre la transferencia de ADN y TrwC, es decir, los requerimientos de TrwB son los mismos en cuanto a la transferencia del complejo ADN-TrwC y TrwC sola (Tabla 8).

Observamos una correlación entre los valores obtenidos *in vivo* e *in vitro*. Los mutantes que presentaban mayores frecuencias conjugativas en presencia/ ausencia de TrwA y translocación de TrwC, mostraban mayores valores absolutos de actividad ATPasa y viceversa (Tabla 8, Fig. 56). Al igual que TrwB $\Delta$ N70 (Tato *et al.*, 2007), los mutantes del ICH fueron estimulados por los sustratos de ADN (cadena simple y doble) y TrwA, pero con diferentes niveles de inducción.

Los mutantes localizados a la entrada del ICH (N271D y K275A) estaban más afectados en los ensayos *in vivo* e *in vitro*, mostrando menores niveles de actividad que la proteína salvaje. Mientras que aquellos ubicados en el interior (K398A y K421A), mostraron mayores frecuencias de transferencia de ADN y TrwC, así como mayores valores absolutos de actividad ATPasa (Tabla 8 y Fig. 56).

En general, los mutantes afectados en la transferencia de ADN se ven también proporcionalmente afectados en la translocación de TrwC en el ensayo triparental y en los ensayos de actividad ATPasa (Tabla 8 y Fig. 56).

Por lo tanto, todo parece indicar que el motor de translocación de ADN de TrwB también está implicado en la translocación de la relaxasa TrwC. Además, se resalta la importancia de la actividad ATPasa de TrwB en conjugación y en la translocación de TrwC sin ADN. De hecho, ninguno de los resultados obtenidos apoya un papel específico de TrwB en la translocación de ADN. Es decir no hemos identificado residuos específicos afectando la transferencia de ADN, que no afectasen la translocación de TrwC, lo cual hubiera permitido mapear la región de interacción TrwB-ADN.

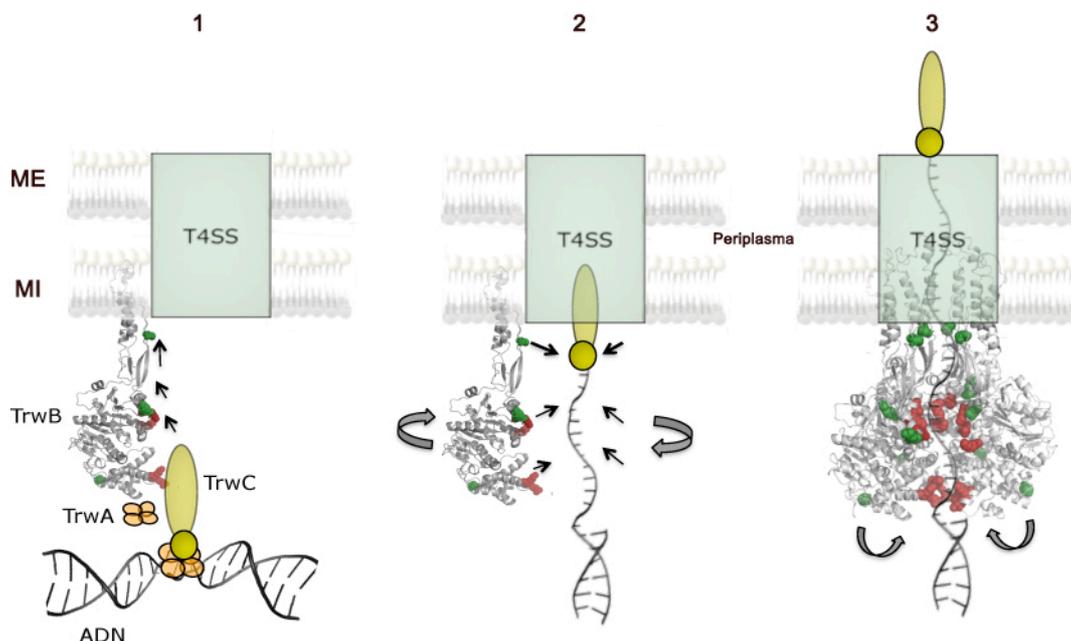
Nuestros datos apuntan a que TrwB es un motor molecular que transloca el sustrato a través de su ICH, para lo que participan residuos cargados positivos presentes en dicho canal.

#### **4.2.4.1. Modelo de translocación del sustrato por TrwB**

Basándonos en la localización de los residuos mutados y los fenotipos observados hemos pensado un modelo sencillo de reclutamiento del sustrato conjugativo que se muestra en la **Figura 59**.

En este modelo, 3 zonas del ICH tendrían una participación especial:

- La primera, representada por los residuos K275 y N271, localizados a la entrada del canal citoplasmático y candidatos para un primer contacto con los componentes del relaxosoma (TrwA-TrwC-ADN).
- La segunda zona donde se localizarían los residuos K398 y K421, incrustados en la parte media superior y cercanos al sitio de unión e hidrólisis de nucleótidos. Estos actuarían como lanzaderas del sustrato.
- Por último, la zona del ICH donde está localizado el residuo S441G.



**Figura 59.** Modelo de translocación del sustrato conjugativo por la proteína acopladora TrwB.

**Paso 1.** Los monómeros de TrwB estarían distribuidos en la membrana citoplasmática, como ya comentamos en el modelo de la Fig. 39 (sección 4.1) y reconocería el sustrato. Ya ha sido previamente observada la interacción proteína-proteína de monómeros de TrwB con TrwA y con TrwC (Llosa *et al.*, 2003) y su afinidad inespecífica por ADN (Moncalián *et al.*, 1999).

Es posible que los residuos ubicados en la entrada del ICH (N271D, K275A) tengan un rol especial en los primeros contactos que establece TrwB con el relaxosoma. Toda la superficie interior del ICH también haría contactos con TrwC y con el ADN (se indica con flechas negras).

El mutante K275A, que es capaz de unir ADN e interacciona con TrwA *in vitro*, pero no muestra incrementos significativos de la actividad ATPasa en presencia de TrwA y sustratos de ADN por separado, como sí se observa para el resto de los mutantes. Sin embargo, se obtuvieron valores cuantificables en presencia de los componentes del relaxosoma TrwA-ADN. Este residuo podría estar implicado en la interacción con el sustrato de ADN y la presencia de TrwA atenuaría

el efecto favoreciendo el reconocimiento del sustrato, lo cual estimularía la actividad ATPasa.

**Paso 2.** Después de la interacción inicial con la superficie del ICH de TrwB, la relaxasa TrwC sería dirigida hacia el T4SS.

Las lisinas K398 y K421, podrían tener un papel regulador en la translocación del sustrato. La actividad ATPasa es necesaria para la translocación del sustrato, por lo que la interacción de las lisinas dispararía dicha actividad, generando mayores frecuencias de transferencia de ADN y proteína. Es probable que TrwA juegue un papel en la regulación, puesto que los mutantes en estas lisinas se vieron afectados en respuesta a TrwA tanto *in vivo* (Tabla 8) como *in vitro* (Fig.56).

Por último en la parte superior de ICH, el mutante S441G, afectado en los ensayos *in vivo* de conjugación, podría tener un rol durante el transporte del sustrato, así como en la traducción de la señal para la activación de la apertura del T4SS.

**Paso 3.** Posteriormente, ocurriría la hexamerización de TrwB alrededor de la molécula de ADN unida covalentemente a TrwC (se indica con flechas grises).

Se muestra el hexámero de TrwB albergando la cadena de ADN en el interior del hexámero. De acuerdo con el modelo "shoot and pump" (Llosa *et al.*, 2002), el resto de la molécula de ADN será bombeada hacia el exterior gracias a la actividad ATPasa de TrwB; pero ninguno de los datos que hemos obtenido permite confirmar este punto, al no haber obtenido ningún mutante que afecte la transferencia de ADN y no afecte la translocación de TrwC.

En suma, tanto la entrada citoplasmática al ICH como la región próxima a la membrana serían puntos críticos de reconocimiento o interacción, mientras que la zona media del ICH proteína regularía el paso del sustrato conjugativo.

Un punto controvertido en este modelo, es si la relaxasa TrwC es translocada a través del ICH del hexámero de TrwB, ya que sus dimensiones serían superiores al tamaño del ICH de TrwB. Los ensayos triparentales de conjugación nos muestran que la translocación de TrwC independiente de ADN se ve fuertemente afectada por las mutaciones en el ICH. Dichos datos apuntan por lo tanto a que existe un contacto entre el ICH de TrwB y TrwC. Por lo tanto existen

varias posibilidades para el transporte de TrwC. i) TrwC sería translocada en un estado desplegado. ii) TrwC no pasaría por el ICH, sino que TrwB establecería contactos con ésta para acercarla al T4SS, y finalmente TrwC es secretada por otro sitio. iii) En tercer lugar proponemos el modelo presentado en la Fig 59. En éste hay una interacción TrwB-(monómero)-TrwC, cuando TrwC es translocada, TrwB hexameriza alrededor del ADN y lo transfiere.

#### 4.2.4.2. El ICH de TrwB y su relación con otros motores moleculares

El NBD de TrwB es similar al de la familia de proteínas AAA+. Dentro de esta familia se encuentran motores moleculares que acoplan la hidrólisis de ATP al movimiento de sustratos de ADN y/o ARN a través de su canal interno para cumplir diversas funciones (Waksman *et al.*, 2000). Mancini y cols, (2004), han propuesto un modelo para el acoplamiento de hidrólisis de nucleótidos y translocación de ácidos nucleicos (Introducción, 1.4.). En ese trabajo se encontró que la lisina K421, contenida en el motivo de unión y translocación de ARN, sería clave para la unión de ARN, puesto que la sustitución por una alanina anula la actividad ATPasa dependiente de ARN.

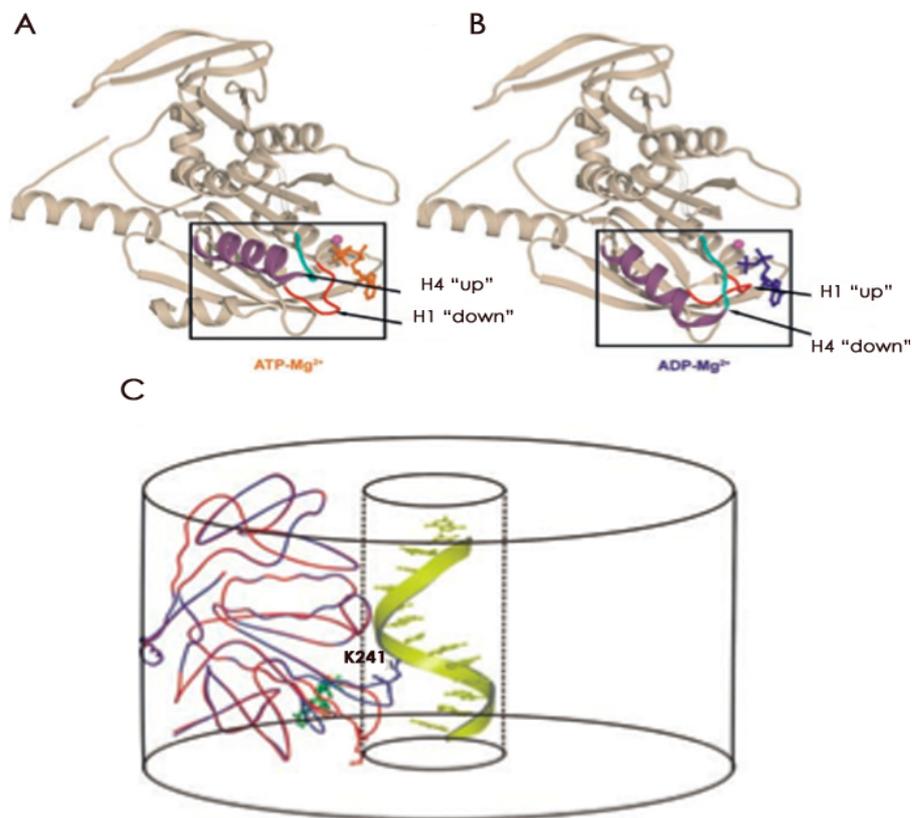
El motivo que contiene la lisina involucrada en la unión a ARN adopta dos orientaciones dependiendo del estado en que se encuentre el NTP (unido a AMPcPP-Mg<sup>+2</sup> o ADP-Mg<sup>+2</sup>). Estos movimientos fueron asociados con una translocación de ~6 Å del ARN unido a la lisina 241 a través del canal central de la proteína P4 (Mancini *et al.*, 2004) (**Figura 60**).

Este mecanismo podría ser compartido por otras proteínas de la familia RecA/AAA+. Tal es así, que se ha localizado un equivalente estructural del residuo de lisina K241 de P4 en el factor Rho, K326 (Rabhi *et al.*, 2011). Este residuo y una lisina adicional K283, protruyen el canal interno, y estarían involucrados en la unión a ARN. Una mutación por alanina reduce la actividad ATPasa y cambia el patrón de proteólisis de la proteína Rho. Como resultado de los cambios conformacionales producidos tras la hidrólisis de nucleótidos, se propone que la lisina K326 sería un traductor de la señal mecanoquímica al resto de la proteína mediante el arrastre del ácido nucleico a través del poro central.

Una función similar ha sido propuesta para el residuo de triptófano 216 (W216A) de TrwB, el cual está localizado dentro del canal interno del hexámero de TrwB (Introducción, sección 1.3.). La sustitución por una alanina anula la

conjugación en la proteína salvaje. Al igual que se observa para P4 y Rho, la actividad ATPasa dependiente de ADN de TrwB $\Delta$ 70 W216A es nula y tiene efecto dominante negativo *in vivo* e *in vitro*, aunque no tiene efecto en la oligomerización (Tato *et al.*, 2005).

En base a los resultados obtenidos, podemos especular con una posible implicación de las lisinas que protruyen el canal interno de TrwB $\Delta$ 70 en la translocación del sustrato de manera similar al papel de K241 en P4 o K326 en Rho.



**Figura 60.** Cambios conformacionales que acompañan la hidrólisis de nucleótidos en la proteína P4. Estructura unida a A) AMPcPP-Mg<sup>+2</sup> y B) ADP-Mg<sup>+2</sup>. Se señalan los motivos H1 y H4 del dominio RecA y sus posiciones relativas dependiendo del estado de la proteína. C) Representación de un monómero unido a AMPcPP-Mg<sup>+2</sup> en donde se señala la posición de la lisina K241 interaccionando con el ARN de cadena simple, en el contexto de un hexámero (cilindro). Imagen adaptada de Kainov y cols, (2006).

### **4.3. Determinación de la señal de translocación (TS) de la relaxasa TrwC**

Los datos obtenidos para las TS de relaxasas a través de sus propios sistemas conjugativos son actualmente limitados y provienen de los estudios realizados para TraI de los plásmidos R1 y F (TraI<sub>R1/F</sub>) (Lang *et al.*, 2010) y de MobA del plásmido R1162 (Parker & Meyer, 2007). A diferencia de las TS identificadas para los efectores de T4SS implicados en virulencia, que requieren de un dominio C-terminal con carga positiva (Álvarez-Martínez & Christie, 2009), las TS de estos dos sistemas conjugativos son internas y extensas (Introducción, sección 2.6.2).

La relaxasa conjugativa TrwC es translocada a través de su propio T4SS durante la conjugación y en ausencia de ADN. En ambos casos la translocación depende de la presencia de la T4CP TrwB (Draper *et al.*, 2005). Además, TrwC es translocada en presencia de ADN por el T4SS VirB/D4 de *Bh* (Fernández-González *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no conocemos las regiones involucradas en el reconocimiento de TrwC para ninguno de los dos sistemas.

Para abordar el estudio de la TS de la relaxasa TrwC, diseñamos un ensayo triparental de conjugación. Mientras se llevaban a cabo estos ensayos, fue publicado por el grupo de la Dra. Ellen Zechner el trabajo sobre la TS de la relaxasa conjugativa TraI<sub>R1/F</sub> (Lang *et al.*, 2010), utilizando el ensayo de CRAFT (*Cre recombinase Reporter Assay for Translocation*) (Vergunst *et al.*, 2000). Por este motivo establecimos una colaboración con este laboratorio y llevamos a cabo un estudio similar para determinar la TS de la relaxasa TrwC, adaptando el ensayo de CRAFT para el sistema del plásmido R388.

#### **4.3.1. Diseño de un ensayo triparental para la determinación de la TS de TrwC**

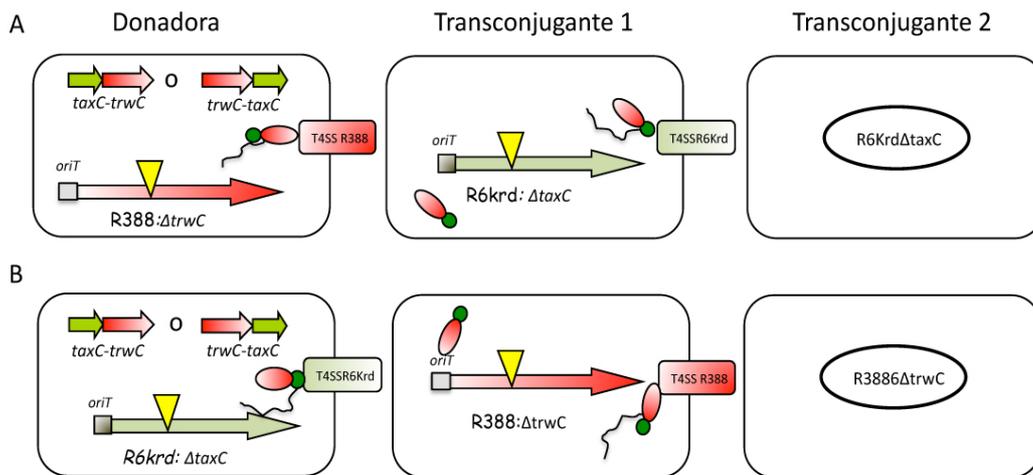
Con el objetivo de delimitar la TS de la relaxasa TrwC, se ha diseñado una estrategia basada en un ensayo triparental de conjugación (Draper *et al.*, 2005). La idea es fusionar los fragmentos de TrwC que se quieren ensayar, a la relaxasa de otro sistema conjugativo, que actuará como reportera de la translocación. Para ello contábamos con la posibilidad de utilizar sistemas conjugativos compatibles, como el de R388 y R6K, que no ejercen exclusión de superficie uno sobre otro. Además,

las relaxasas codificadas pertenecen a diferentes familias y sólo son capaces de reconocer los *oriT*s de sus respectivos sistemas.

La puesta a punto de esta técnica sería una herramienta de gran valor para el estudio de las TS de diferentes relaxasas o incluso de otras proteínas exportadas por distintos T4SS.

#### 4.3.1.1. Construcción de proteínas de fusión entre TrwC y TaxC

En la **Figura 61 A**, se muestra el esquema del ensayo triparental diseñado para estudiar la TS de TrwC. En primer lugar se construyeron dos fusiones TaxC-TrwC (pDEL021) y TrwC-TaxC (pDEL023) (Tabla 5 de metodología). Éstas fueron transformadas en bacterias donadoras que contenían un plásmido derivado de R388 deficiente en TrwC (pSU1458). En este sistema, todos los elementos necesarios para mediar la transferencia de ADN por conjugación están presentes en *cis*, con la excepción de la relaxasa TrwC que es aportada en *trans* como una proteína de fusión con TaxC.



**Figura 61.** Esquema del ensayo triparental diseñado para la determinación de la TS de A) TrwC y B) TaxC.

Las bacterias donadoras se mezclaron con dos cepas, una que contenía el derivado de R6Krd deficiente en TaxC y otra sin plásmido. El transporte de las fusiones - TaxC-TrwC o TrwC-TaxC - sería detectado por la complementación de la mutación *taxC* en el transconjugante 1, generando el transconjugante 2. El primer paso de translocación implicaría un reconocimiento específico de la TS de TrwC

codificada en la fusión con TaxC por el T4SS de R388. Una vez que la proteína de fusión alcanzase la segunda célula, TaxC movilizaría al plásmido *taxC* por conjugación hacia la tercera célula generando un transconjugante 2. Por lo que, al final del proceso el número de transconjugantes tipo 2 sería proporcional a la cantidad de proteína translocada desde la primera célula donadora a la segunda, y esto dependería de la presencia de una TS. Así pues, la eficiencia de la señal de translocación se estimaría por la frecuencia de conjugación.

Siguiendo el mismo razonamiento, este ensayo sería de utilidad para el estudio de la TS de TaxC, tan sólo invirtiendo el orden de las donadoras (Fig. 61 B).

En primer lugar debíamos conocer la eficiencia de las proteínas de fusión en sus respectivos sistemas conjugativos, para posteriormente probar el ensayo triparental. Si el sistema funcionaba, posteriormente construiríamos un conjunto de fusiones de TaxC con fragmentos de TrwC de diversos tamaños. Las fusiones podrían ser realizadas en el N-terminal o en el C-terminal de la proteína. Las diferentes fusiones nos permitirían mapear la TS de TrwC en el ensayo triparental.

#### 4.3.1.2 Ensayos triparental de conjugación con la fusión TaxC-TrwC

Una vez diseñado el ensayo y construidas las fusiones, probamos la capacidad de estas proteínas de mediar la transferencia de ADN por complementación de plásmidos deficientes en TrwC o TaxC. Para ello realizamos ensayos de conjugación estándar a partir de cultivos en fase estacionaria. En la **Tabla 9**, se muestran las frecuencias de conjugación obtenidas como el número de transconjugantes por el número de bacterias donadoras.

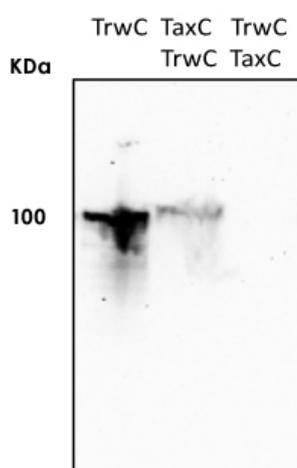
**Tabla 9.** Ensayos de conjugación estándar de las fusiones TrwC-TaxC y TaxC-TrwC

Plásmidos	Proteína	Frecuencia de conjugación (pSU1445)	Frecuencia de conjugación (pSU4707)
pSU19	-	$<5,62 \times 10^{-08}$	$<4,70 \times 10^{-07}$
pSU1086	TrwC	$1,12 \times 10^{-01}$	$< 2,50 \times 10^{-07}$
pSU4768	TaxC	$<4,07 \times 10^{-08}$	$4,57 \times 10^{-01}$
pDEL021	TaxC-TrwC	$1,39 \times 10^{-02}$	$2,72 \times 10^{-02}$
pDEL023	TrwC-TaxC	$3,32 \times 10^{-02}$	$2,89 \times 10^{-03}$

**Tabla 9.** Frecuencias de conjugación de las fusiones TaxC-TrwC y TrwC-TaxC. Los valores son el promedio de 2-5 experimentos independientes.

En la Tabla 9, se puede observar que ambas fusiones eran capaces de complementar la falta de TrwC en el plásmido pSU1445 y la ausencia de TaxC en el plásmido pSU4707. Con la excepción de la fusión TrwC-TaxC, que para la movilización del derivado de R6Kdrd mostraba una caída de 2 log, el resto mostraron una diferencia de un log en la frecuencia de conjugación respecto a las de las proteínas TrwC y TaxC salvajes.

También se realizaron ensayos de Western blot para observar los niveles de las proteínas de fusión utilizando un anticuerpo policlonal anti-TrwC (**Figura 62**).



**Figura 62.** Western blot con anti-TrwC. TrwC: producida por el derivado pSU2007. TaxC-TrwC y TrwC-TaxC, producidas por los plásmidos pDEL021 y pDEL023, respectivamente.

Como se observa en el Western blot de la Fig. 62, TrwC es detectada sólo cuando se encuentra fusionada a TaxC en su N-terminal. Cuando TaxC se encuentra fusionada hacia el C-terminal de TrwC, la proteína no es detectada. Sin embargo los resultados mostrados en la Tabla 9, indican que esta fusión es funcional en conjugación. Ya hemos observado anteriormente que niveles indetectables de relaxasa son suficientes para complementar una mutación *trwC* en conjugación (datos no mostrados) esto podría explicar el nivel más bajo de complementación de *taxC* por la fusión TrwC-TaxC. Por lo tanto, para los siguientes ensayos triparentales seleccionamos la fusión más estable, TaxC-TrwC.

En la **Tabla 10** se muestra el número de transconjugantes 2 obtenidos en ensayos triparentales a diferentes tiempos de conjugación en placa, usando la fusión TaxC-TrwC y el derivado de R388, pSU1458 en la primera célula donadora.

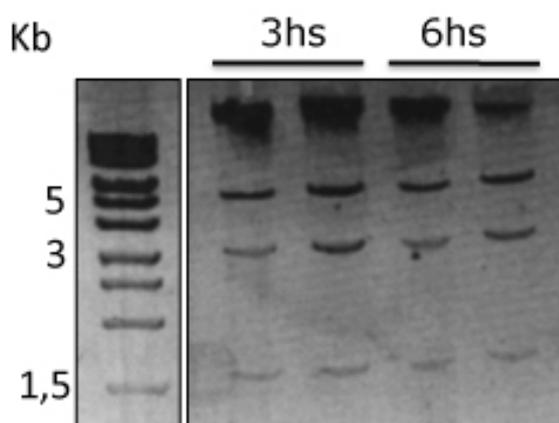
**Tabla. 10.** Ensayos triparentales de conjugación con la proteína TaxC-TrwC

Proteína	Nº de Transconjugantes 2 por ml*		
	3 horas	6 horas	15 horas
TrwC	0	0	0
TaxC-TrwC	15	100	3

**Tabla 10.** Resultados representativos de los ensayos de conjugación triparentales a diferentes tiempos de conjugación. \* Las células donadoras contadas eran  $\sim 50-200 \times 10^4$

Los datos mostrados en la Tabla 10, representan una frecuencia de conjugación del orden de  $1 \times 10^{-06}$  y  $1 \times 10^{-07}$  transconjugantes/ donadora 1 (portadoras del plásmido pSU1458). A fin de optimizar los ensayos se probaron varias condiciones de conjugación. Así, por ejemplo, utilizamos células donadoras en fase estacionaria y en fase exponencial, obteniéndose frecuencias parecidas. También se han obtenido resultados similares cuando se cambiaba el orden de las donadoras, es decir, el primer plásmido movilizado era el pSU4707 (deficiente en TaxC) (datos no mostrados).

Para confirmar la transferencia de ADN, se realizaron réplicas de los transconjugantes 2 y se extrajo el ADN plasmídico. Estos ADNs fueron digeridos posteriormente con la enzima EcoRI. En la **Figura 63** se muestra el patrón de digestión para dos transconjugantes obtenidos a las 3 y 6 horas de conjugación. Los fragmentos obtenidos son los esperados para el plásmido pSU4707, el cual ha sido movilizado por conjugación desde el transconjugante 1 y generando de este modo el transconjugante 2 (Fig. 61 A).



**Figura 63.** Análisis de los transconjugantes por digestión con EcoRI en gel de agarosa al 1%.

En estos ensayos las frecuencias de conjugación fueron mucho más bajas a las esperadas. Esta disminución se produciría desde el transconjugante 1 al 2, puesto que en los ensayos de complementación estándar la fusión TaxC-TrwC es capaz de transferir los derivados de R388 o de R6Kdrd con frecuencias iguales a las proteínas salvajes (Tabla 9). Aunque son muchos son los factores que podrían estar involucrados en esta disminución, creemos que este ensayo triparental podría ser optimizado por ejemplo, utilizando relaxasas de otros sistemas fusionadas a TrwC. Desconocemos si TaxC es funcional en la célula receptora. Mientras se realizaban en nuestro laboratorio estos ensayos, fue publicado por Lang y cols (2010) el ensayo de CRAfT para la determinación de la TS de TraI<sub>R1/F</sub>. Por este motivo, preferimos establecer una colaboración con el grupo de la Dra. Ellen Zechner para llevar a cabo un estudio similar para la TS de la relaxasa TrwC.

#### 4.3.2. Determinación de la TS de TrwC mediante ensayos CRAfT

El estudio de la TS de TrwC se ha basado en el artículo publicado por Lang y cols, (2010). En dicho artículo, fue utilizado el sistema basado en la translocación de fragmentos de la relaxasa fusionados a la recombinasa Cre, que actúa como reportera en la célula receptora (Introducción, sección 1.2.4.2.). De esta forma fueron determinadas dos TS en TraI<sub>R1/F</sub> denominadas TSA y TSB.

En ese trabajo los autores no encontraron mucha similitud en la secuencia primaria entre TSA y TSB de TraI<sub>R1/F</sub>. Por ello llevaron a cabo un análisis de similitud de plegamiento entre ambas TS con el servidor *fold recognition server*

GenTHREADER (Jones, 1999, McGuffin & Jones, 2003). La predicción de estructura terciaria mostró como mejor molde la estructura N-terminal de la proteína RecD2 de *D. radiodurans* (PDB-entry:3e 1s). De estos análisis detectaron que había un grupo de residuos conservados entre las TS de TraI<sub>R1/F</sub> y la secuencia de RecD2. Posteriores análisis determinaron que también estarían presentes en MobA de R1162.

Los residuos conservados identificados en ambas TS, fueron GERLRVT (aa 715 al 721) en TSA<sub>R1/F</sub> y GDRMRFT (aa 1342 al 1348) en TSB<sub>R/F</sub>. Experimentalmente los autores demostraron que al realizar el cambio R1344Q en la TSB de TraI<sub>R1/F</sub> la translocación del fragmento de TraI<sub>R1/F</sub> que contenía la TSB mutada disminuía significativamente (Lang *et al.*, 2010).

#### 4.3.2.1 Análisis de secuencia de la posible TS de TrwC

Estudios filogenéticos determinaron que el módulo RecD/TS también estaba conservado en TrwC, y éste se localizaría entre los aa 705-895 (Lang *et al.*, 2010). Quisimos confirmar la predicción de plegamiento terciario del fragmento de TrwC<sub>705-895</sub> utilizando el mismo servidor *fold recognition server* GenTHREADER y Phyre<sup>2</sup> (Kelley & Sternberg, 2009). Para ambos programas el resultado también mostró como mejor molde la estructura N-terminal de la proteína RecD2 de *Deinococcus radiodurans* (PDB-entry:3e 1s).

Continuamos el análisis de la posible TS de TrwC mediante un alineamiento con el programa Blast de toda la secuencia de TrwC contra la regiones TSA o TSB de TraI<sub>R1/F</sub>. También hemos extendido el estudio de la TS al de la relaxasa TraI del plásmido pKM101 (**Figura 64**). Como control negativo, se hizo una búsqueda similar en TaxC, pero no presentaba ninguna similitud con TSA ni con TSB.

En estos alineamientos se detectó un grupo de residuos, GDTIRIT comprendido entre los aa 796-802 de TrwC que alineaban tanto con TSA como con TSB de TraI<sub>R1/F</sub>. Estos residuos han sido designados en este trabajo como TS1. A pesar de la similitud, era llamativa la ausencia precisamente del residuo de arginina (R) cuya mutación en TraI confirmó la importancia de la TS (Lang *et al.*, 2010). Se detectó un segundo grupo de residuos en TrwC, GDRMKV comprendidos entre los aa 813-818, similar a la secuencia consenso que existe entre la TSA y TSB de TraI<sub>R1/F</sub> (G[E/D]R[L/M]R[V/F]T); aunque no alineaba con ninguna de las dos,

contenía una R en la posición adecuada. Esta segunda región de TrwC la hemos denominado TS2.

En los alineamientos con TraI de pKM101, encontramos un grupo de residuos GDKVMVT comprendidos entre los aa 799-805 que alinean con TSA y TSB de TraI<sub>R1/F</sub>. Al igual que para TrwC, detectamos un segundo grupo de residuos en TraI de pKM101, GDRFTV, comprendidos entre los aa 816-821, similar a la secuencia consenso entre TSA y TSB de TraI<sub>R1/F</sub>. A estos dos grupos de residuos, también los hemos denominados TS1 y TS2 de TraI de pKM101.

		TS1		TS2	
TrwC_R388	792	ELAV <b>GDTIRIT</b> TRNDKHLDLANG <b>GDRMKV</b> VAVE	822		
		+A G+ +R+T		L ++ GDR++V +VE	
TSA_R1/F	711	PVAD <b>GERLRVT</b> GKIPGLRVSGG <u>DRLQ</u> VASVS	742		
TraI_pKM101	794	ELAP <b>GDKVMVT</b> TRNDKTLDVANG <b>GDRFTV</b> KTVE	825		
		+A G+++ VT		L V+ GDR V +V	
TSA_R1/F	711	PVAD <b>GERLRVT</b> GKIPGLRVSGG <u>DRLQ</u> VASVS	742		
TrwC_R388	792	ELAV <b>GDTIRIT</b> TRNDKHLDLANG <b>GDRMKV</b> VAVE	822		
		++ GD +R T++D+			
TSB_R1/F	1338	RVGT <b>GDRMRF</b> TKSDRERGVANSVWTVTAVS	1369		
TraI_pKM101	794	ELAP <b>GDKVMVT</b> TRNDKTLDVANG <b>GDRFTV</b> KTVE	825		
		+ GD++ T++D+		+TV	
TSB_R1/F	1338	RVGT <b>GDRMRF</b> TKSDRERGVANSVWTVTAVS	1369		

**Figura 64.** Alineamientos de secuencia de TrwC de R388 y TraI de pKM101 con TSA y TSB de TraI<sub>R1/F</sub>. En negrita están resaltados los grupos de residuos conservados en TSA y TSB de TraI<sub>R1</sub> y las TS1 y TS2 de TrwC y pKM101 definidas en este trabajo.

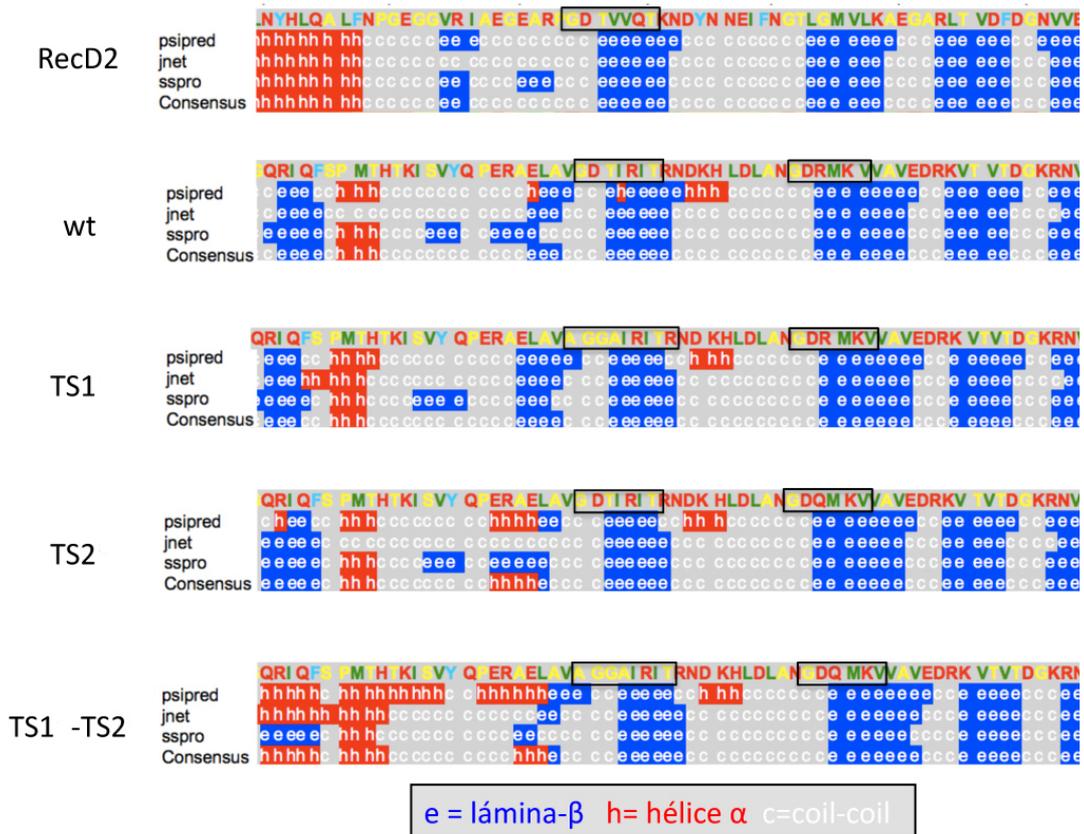
Las TS1 y TS2 de TrwC propuestas en este trabajo, estaban contenidas en la región de TrwC comprendida entre los aa 705 al 895 tal y como propuso Lang y cols (2010).

#### 4.3.2.2. Diseño de mutantes puntuales en la posible TS de TrwC

Ante la predicción de las TS1 y TS2 de TrwC se nos planteó la duda de qué residuos mutar para comprobar su funcionalidad, ya que la región de TrwC en la que definimos la TS1, se parecía más a la TSB de TraI<sub>R1/F</sub>, pero ésta no presentaba el residuo de arginina conservado (R1344) en la TS de TraI<sub>R1/F</sub> que sería crítico para la translocación. No obstante, la región de TrwC TS2 presentaba la R815 que podría tener una función similar al de la R1344 en la TSB de TraI<sub>R1/F</sub>. Además, la secuencia de la TS2 era similar a la secuencia consenso (G[E/D]R[L/M]R[V/F]T). Por lo que decidimos alterar la parte más conservada de la TS1 y realizar en la TS2 de TrwC una sustitución R→Q igual que la realizada en la TSB de TraI<sub>R1/F</sub>.

Para la TS1 el cambio diseñado originalmente consistía en tres residuos dentro de la TS1, GDTIRIT por NGGIRIT. Después de numerosos intentos por conseguir este mutante sin resultados, se diseñó otra mutación que consistía en sustituir GDTIRIT por AGAIRIT. Por un error en el momento de realizar el pedido de los cebadores a la casa comercial, se obtuvo finalmente el mutante AGGAIRIT, que añadía un aa en la secuencia de TrwC pero no afectaba el marco de lectura. En la TS2 realizamos el cambio GDRMKV por GDQMKV. También se realizó un mutante doble de las TS de TrwC (TS1 (AGGAIRIT) + TS2 (GDRMKV)). Cuando se analizaron las secuencias para confirmar las mutaciones encontramos que en una de las colonias analizadas había un cambio en la TS1 que generaba un segundo mutante doble (TS1(VGGARIT)+TS2(GDRMKV)).

En el diseño de los mutantes también se tuvo en cuenta que las mutaciones introducidas no cambiaran la predicción de estructura secundaria. Dicha predicción se realizó con el programa (Phyre<sup>2</sup>) (Kelley & Sternberg, 2009), porque es posible obtener un consenso de la estructura secundaria basada en tres programas de predicción. El análisis de estructura secundaria para los mutantes diseñados (**Figura 65**) no mostró cambios sustanciales para la mutación en TS1, pero sí un ligero cambio en la estructura adyacente a la propia región de la TS en el mutante TS2, pero que no afectaba a la lámina beta conservada con la estructura de RecD2.



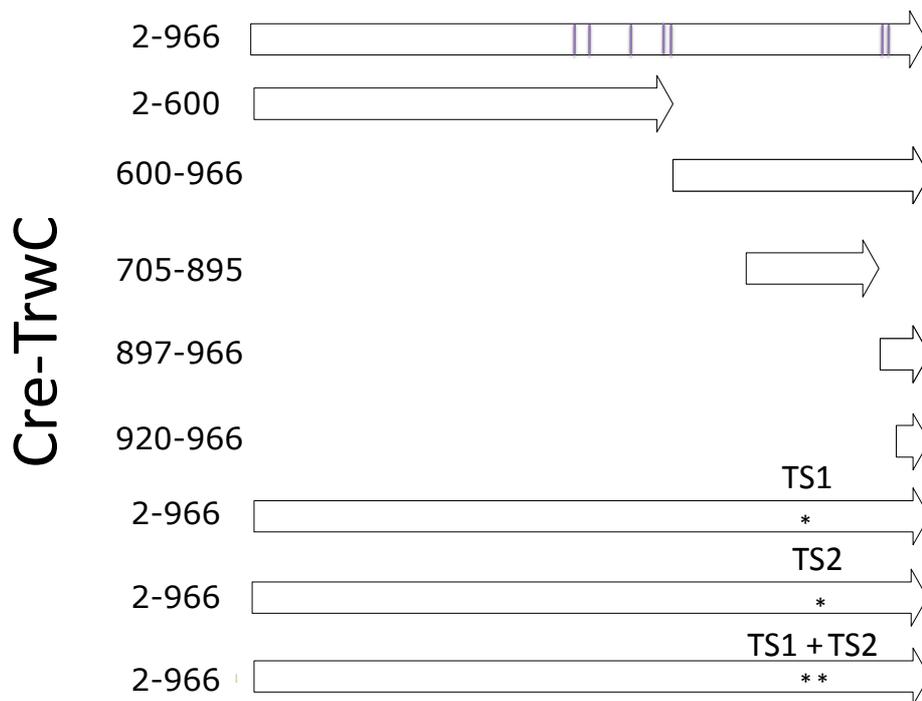
**Figura 65.** Predicción de estructura secundaria para RecD2, TrwC y los mutantes en la TS1, TS2 y el doble mutante TS1-TS2. Los aa se representan en código de color: pequeños y polares, amarillo; hidrofóbicos, verde; cargados, rojo y aromáticos y cisteína, celeste. A la izquierda se indican los tres programas utilizados para generar una predicción de estructura secundaria consenso. Los recuadros negros indican las TS1 y TS2 de TrwC y sus mutantes.

#### 4.3.2.3. Diseño de fusiones Cre-TrwC

Para la determinación de la TS de TrwC empleamos el ensayo CRAFT previamente desarrollado para la determinación de la TS de proteínas VirB y VirF por el T4SS de *At* (Vergunst *et al.*, 2000) y posteriormente adaptado para la determinación de la TS de la relaxasa conjugativa MobA (Parker & Meyer, 2007) y TraI<sub>R1/F</sub> (Lang *et al.*, 2010). La detección de la TS de la proteína translocada es indirectamente observada por la actividad de la recombinasa Cre en las células receptoras. Por tanto, es necesario construir fusiones de Cre con la proteína para la que se quiere detectar la TS.

Una vez analizadas las posibles regiones y diseñados los mutantes puntuales en las TS, el siguiente paso fue la construcción de las fusiones Cre-TrwC. En todas

las construcciones, se clonaron los fragmentos de *trwC* fusionados al extremo 3' del gen *cre* (Tabla 5 de metodología). De la colaboración establecida con el laboratorio de la Dra. Ellen Zechner se contaba para este trabajo con las fusiones Cre-TrwC y Cre-TrwC<sub>705-895</sub> (Tabla 4 de metodología). Por tanto fueron diseñados otro grupo de fusiones: Cre-TrwC<sub>2-600</sub>; Cre-TrwC<sub>600-966</sub>; Cre-TrwC<sub>895-966</sub> y Cre-TrwC<sub>920-966</sub>, lográndose una colección de fusiones Cre-TrwC (**Figura 66**) que en conjunto comprendían toda la secuencia de TrwC y nos permitían ensayar separadamente la región que supuestamente incluía la TS de TrwC, y el extremo C-terminal, que se requiere para la translocación por los T4SS implicados en virulencia (Introducción sección 1.2.4.). Además construimos las fusiones de Cre-TrwC que contenían las mutaciones en las TS1 y TS2.



**Figura 66.** Esquema representativo de las fusiones Cre-TrwC. A la izquierda están indicados con números los fragmentos de TrwC fusionados al C-terminal de la proteína Cre. Los motivos helicasa de TrwC están indicados en TrwC<sub>2-966</sub> con barras en vertical. Las mutaciones en las TS1 y TS2 están indicadas con un asterisco.

#### 4.3.2.4 Estabilidad de las fusiones Cre-TrwC

Antes de realizar los ensayos de CRAFT, los plásmidos que codificaban las fusiones de *cre-trwC* fueron probados para confirmar la capacidad de recombinación de Cre. Para ello, las construcciones fueron electroporadas a las células receptoras del ensayo CRAFT (CHS26Cm::LTL), donde la recombinación mediada por Cre da lugar a la expresión del gen que confiere resistencia a Cm. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB Ap (selección de transformantes) y LB Ap+Cm (selección de recombinantes). Se observó que las fusiones construidas eran funcionales para la recombinación mediada por Cre, puesto que se obtuvieron recombinantes en placas de LB Ap+Cm. Aunque las células fueron transformadas con cantidades iguales de ADN plasmídico, hemos detectado variabilidad entre los ensayos. Por ello, los datos fueron normalizados dividiendo el número de recombinantes (Ap+Cm) por el número de transformantes (Ap). Como se muestra en la **Tabla 11**, la fusión Cre-TrwC y sus derivados mantienen la actividad de Cre, aunque la eficacia es menor que la de la proteína Cre salvaje.

**Tabla 11.** Ensayos de estabilidad indirecta de las fusiones Cre-TrwC

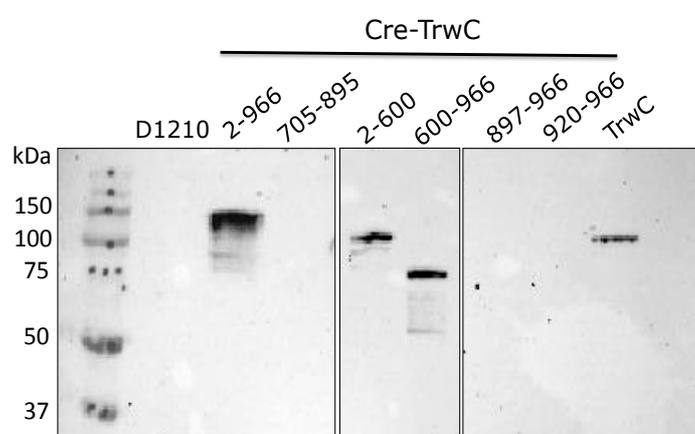
Fusiones Cre-TrwC	%
Cre	100
Cre-TrwC	18
Cre-TrwC <sub>2-600</sub>	41
Cre-TrwC <sub>600-966</sub>	53
Cre-TrwC <sub>705-966</sub>	91
Cre-TrwC <sub>987-966</sub>	99
Cre-TrwC <sub>920-966</sub>	56
Cre-TrwC <sub>TS1</sub>	84
Cre-TrwC <sub>TS2</sub>	14
Cre-TrwC <sub>TS1-TS2</sub>	9,8

**Tabla 11.** Estabilidad de las fusiones Cre-TrwC estimada por la tasa de recombinación mediada por la recombinasa Cre. Los porcentajes fueron obtenidos dividiendo el número de recombinantes por el número de transformantes. Los datos representan la media de 3-7 experimentos independientes

Estos ensayos, aunque de un modo muy indirecto, constituyen una prueba de la estabilidad y funcionalidad de las proteínas de fusión. Sin embargo, es posible que en las fusiones de Cre-TrwC, sólo el fragmento correspondiente a Cre sea funcional, aunque la región fusionada derivada de TrwC no adquiera el plegamiento

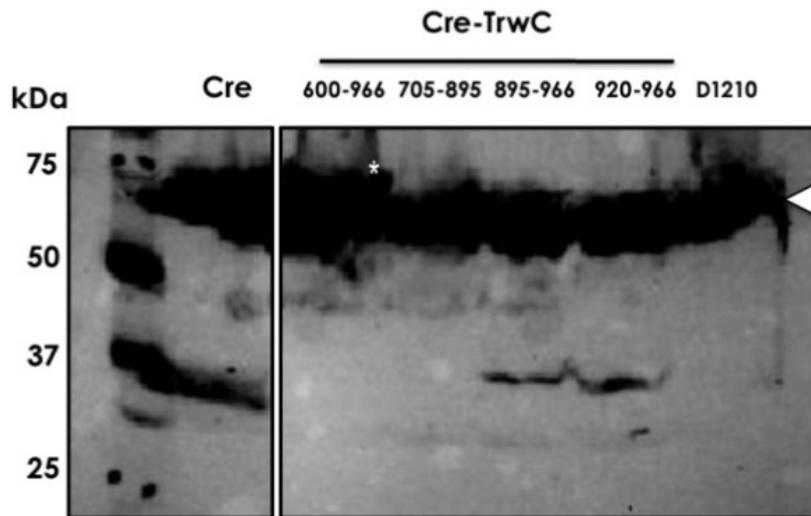
adecuado. Consecuentemente, estimamos los niveles de las fusiones Cre-TrwC mediante ensayos de Western blot.

Se obtuvieron extractos proteicos a partir de células de *E. coli* D1210 y/o MS614 en fase estacionaria portadoras de los plásmidos que codifican para las fusiones Cre-TrwC. Las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo policlonal contra TrwC (**Figura 67**). Sólo se detectó señal para las fusiones de Cre-TrwC, Cre-TrwC<sub>2-600</sub> y Cre-TrwC<sub>600-966</sub>. Los fragmentos de menor tamaño, Cre-TrwC<sub>705-895</sub>; Cre-TrwC<sub>895-966</sub> y Cre-TrwC<sub>920-966</sub> no fueron detectados con este anticuerpo.



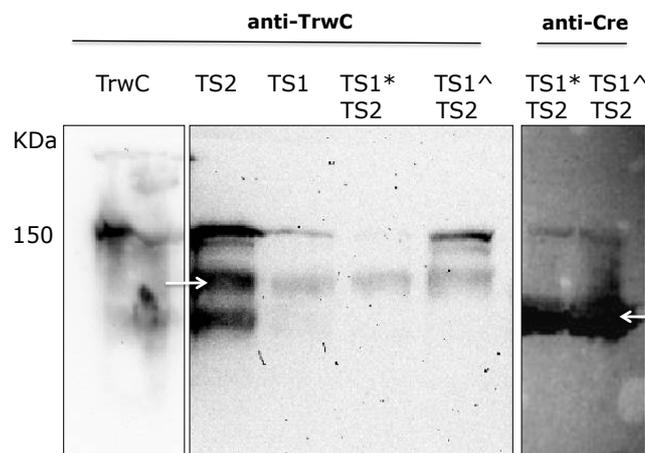
**Figura 67.** Western blot con anti-TrwC. En la parte superior del gel se indica con número los aa de la región de TrwC que ha sido fusionada al extremo C-terminal de la recombinasa Cre. D1210: control sin plásmidos ; TrwC: proteína purificada (control positivo). A la izquierda del gel se indica con números el marcador de peso molecular en kDa. Tamaños esperados de las proteínas: TrwC=105 kDa; Cre-TrwC =146 kDa; Cre-TrwC<sub>2-600</sub>= 105 kDa; Cre-TrwC<sub>600-966</sub>= 79 kDa; Cre-TrwC<sub>705-895</sub>= 57 kDa; Cre TrwC<sub>897-966</sub>=45 kDa; Cre-TrwC<sub>920-966</sub>= 42 kDa.

La falta de señal podría deberse a que estas proteínas de fusión fuesen inestables o a falta de reconocimiento del anticuerpo. Por esta razón, realizamos un Western blot usando un anticuerpo policlonal contra la recombinasa Cre. El incremento del peso molecular entre la proteína Cre (38 kDa) y las fusiones Cre-TrwC<sub>705-895</sub> (57 kDa); Cre-TrwC<sub>895-966</sub> (45 kDa) y Cre-TrwC<sub>920-966</sub> (42 kDa), nos permitiría detectar la presencia de la fusión. Los resultados (**Figura 68**) muestran una señal para las proteínas Cre-TrwC<sub>895-966</sub> y Cre-TrwC<sub>920-966</sub>, aunque no para la fusión Cre-TrwC<sub>705-895</sub>.



**Figura 68.** Western blot con anti-Cre. La banda inespecífica se indica con una punta de flecha blanca. Leyenda igual que en la Fig. 67. Cre= 37 KDa; \*Cre-TrwC<sub>600-966</sub>= 79 KDa (no puede determinarse con seguridad debido a la banda inespecífica); Cre-TrwC<sub>705-895</sub>= 57 KDa; Cre TrwC<sub>897-966</sub>=45KDa; Cre-TrwC<sub>920-966</sub>= 42 KDa.

Por último, verificamos los niveles de las proteínas de fusión Cre-TrwC con mutaciones en TS1 y TS2 (**Figura 69**). Todas las fusiones pudieron ser detectadas con uno u otro anticuerpo, aunque no pudimos obtener un único gel que comparara los niveles de todas respecto a la proteína salvaje de forma convincente.

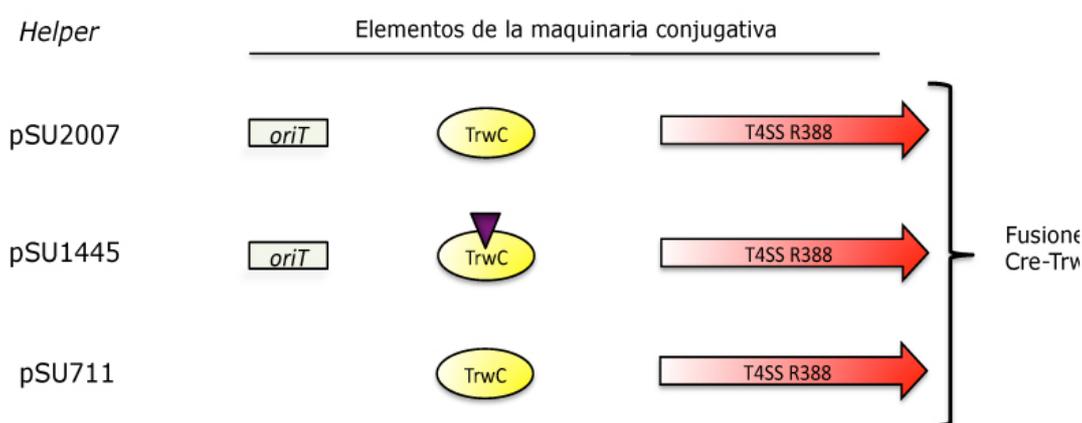


**Figura 69.** Western Blot con anti-TrwC y anti-Cre. La fusión Cre-TrwC (salvaje o mutantes en las TS) aparece a la altura de 150 KDa. El resto de bandas son inespecíficas y se indican con flechas blancas. Los símbolos \* y ^ indican la versión de la mutación en TS1 (AGGAIRIT o VGGAIRIT, respectivamente).

#### 4.3.2.5. Ensayos CRAFT para la determinación de la TS de TrwC

Brevemente, en este ensayo la recombinasa Cre, fusionada a otra proteína, sirve de reportera de translocación a la célula receptora. La bacteria donadora fue co-transformada con un plásmido que proveería toda la maquinaria conjugativa de R388 y con los plásmidos que codificaban las fusiones de *cre-trwC* indicadas en la Fig. 66. La bacteria receptora, contiene un *cassette* de resistencia a Cm interrumpido por un segundo *cassette* de resistencia a Tc, flanqueado por sitios *loxP*. La translocación de las proteínas de fusión Cre-TrwC, se detecta por la recombinación mediada por Cre entre los dos sitios *loxP* en la célula receptora; de modo que el ensayo se basa en una conjugación, y la eficiencia de translocación de la proteína fusionada a Cre se estima por la frecuencia de recombinantes resistentes a Cm, resultado de la recombinación mediada por Cre.

En los ensayos CRAFT se utilizaron tres variantes de R388 (*helpers*) para aportar en *trans* la maquinaria de translocación de Cre-TrwC (**Figura 70**). En el primer sistema hemos utilizado el plásmido pSU2007, un derivado de R388 resistente a Km<sup>R</sup> con todos sus elementos conjugativos, incluyendo la proteína TrwC salvaje. En el segundo sistema hemos utilizado el plásmido pSU1445, que a diferencia del anterior tiene un transposón Tn5*tac1* en *trwC*, por lo que en este sistema la única fuente de la proteína es la producida por las fusiones de Cre-TrwC. El último sistema se diferencia de los dos anteriores porque no hay movilización de ADN, para lo cual usamos el plásmido pSU711 que posee deletcionada una región del *oriT* y no es transmisible por conjugación.



**Figura 70.** Esquema de los plásmidos derivados de R388 utilizados en los ensayos de CRAFT en combinación con las fusiones de Cre-TrwC.

Conseguimos de este modo tres variantes del ensayo de CRAFT que nos permitirán conocer el efecto de TrwC salvaje o la movilización de ADN sobre la translocación de las diferentes proteínas de fusión.

Los resultados de la translocación de las fusiones de Cre-TrwC en presencia de pSU2007, pSU1445 y pSU711 se muestran en la (Tabla 12).

**Tabla 12.** Translocación de Cre-TrwC en presencia de 3 sistemas distintos

Plásmidos helpers	pSU2007	pSU1445	pSU711
T4SS <sub>R388</sub>	+	+	+
TrwC <sub>salvaie</sub>	+	-	+
<i>oriT</i>	+	+	-
Fusiones Cre-TrwC	Translocación de proteínas		
Cre	$1,56 \times 10^{-07}$	$< 7,68 \times 10^{-08}$	$< 1,68 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>2-966</sub>	$7,37 \times 10^{-04}$	$2,04 \times 10^{-06}$	$1,73 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>2-600</sub>	$4,38 \times 10^{-05}$	$1,01 \times 10^{-07}$	$1,41 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>600-966</sub>	$4,53 \times 10^{-04}$	$2,29 \times 10^{-06}$	$1,30 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>705-895</sub>	$1,60 \times 10^{-05}$	$8,57 \times 10^{-08}$	$8,16 \times 10^{-08}$
Cre-TrwC <sub>897-966</sub>	$4,73 \times 10^{-06}$	$2,39 \times 10^{-08}$	$< 6,97 \times 10^{-08}$
Cre-TrwC <sub>920-966</sub>	$7,03 \times 10^{-07}$	$9,59 \times 10^{-08}$	$1,40 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>TS1</sub>	$9,70 \times 10^{-05}$	$3,11 \times 10^{-07}$	$1,51 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>TS2</sub>	$3,68 \times 10^{-04}$	$4,37 \times 10^{-07}$	$2,01 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>TS1*+TS2</sub>	$4,77 \times 10^{-05}$	$2,22 \times 10^{-07}$	$2,31 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>TS1+TS2</sub>	$1,08 \times 10^{-05}$	$2,29 \times 10^{-07}$	$1,47 \times 10^{-07}$

**Tabla 12.** Mapeo funcional de la TS de TrwC. Se indican la translocación de las proteínas de fusión (recombinantes/donador) utilizando los diferentes plásmidos *helpers*. Las frecuencias representan la media de 3-7 experimentos independientes.

En primer lugar, analizaremos los resultados obtenidos en presencia del plásmido pSU2007. En cada ensayo se determinó la transferencia del plásmido conjugativo (pSU2007), que fue en todos los casos alrededor de 1 transconjugante/donador (datos no mostrados).

Los datos obtenidos en la Tabla 12 indican que la fusión de Cre-TrwC<sub>600-966</sub> fue translocada casi tan eficientemente como Cre-TrwC, por lo tanto la TS de TrwC debe estar incluida en esta región, que incluye la TS sugerida por Lang y cols, (2010) así como las dos señales propuestas en nuestro análisis.

Detectamos también recombinantes para la fusión Cre-TrwC<sub>2-600</sub>, aunque la frecuencia cayó 1 log respecto de las dos fusiones anteriores. Por lo tanto estos resultados, a primera vista, nos estarían indicando de la existencia de una TS adicional para TrwC.

La posible TS de TrwC contenida en la fusión de Cre-TrwC<sub>705-895</sub> fue también translocada, aunque hay una caída en la frecuencia de translocación de 1 log respecto de las fusiones de Cre-TrwC o Cre-TrwC<sub>600-966</sub>. Ésta puede ser atribuida a una menor estabilidad de la proteína puesto que en nuestros ensayos de Western blot no ha sido posible su detección.

Las fusiones C-terminales Cre-TrwC<sub>897-966</sub> y Cre-TrwC<sub>920-966</sub> mostraron frecuencias de translocación casi indetectables, lo que nos indicaría que esta región de TrwC no estaría implicada en el reconocimiento, o tendría un papel poco relevante.

El mutante en la TS1 afecta la translocación de la proteína y presenta una diferencia de 1 log respecto a la proteína salvaje, así como el doble mutante, TS1+TS2. Sin embargo el mutante en la TS2 no se muestra afectado, lo que sugiere que los residuos contenidos en la TS1 representarían la TS real de la proteína.

La translocación de Cre-TrwC<sub>2-600</sub> resultaba sorprendente. Consideramos la posibilidad de que la proteína salvaje TrwC aportada por pSU2007 interaccionase con TrwC<sub>600</sub> y así facilitase el reconocimiento de TrwC<sub>600</sub> y su translocación. Llevamos a cabo el ensayo CRAFT utilizando un derivado de R388 deficiente en TrwC (pSU1445). En este nuevo sistema la única fuente de la proteína TrwC es la producida por las fusiones de Cre-TrwC. En la **Tabla 13** se muestran las frecuencias de transferencia de ADN y de translocación de proteínas.

En primer lugar, analizaremos los resultados de transferencia de ADN. Las fusiones que contenían la proteína completa (Cre-TrwC y los mutantes en las TS) eran capaces de movilizar al plásmido pSU1445. La frecuencia de conjugación en presencia de Cre-TrwC es 4 órdenes de magnitud inferior a la de pSU2007. Aunque en parte pueda deberse al descenso en la conjugación cuando la relaxasa se aporta en *trans*, esto indica que la proteína de fusión es muy poco eficaz en conjugación. Los mutantes en TS1 y TS2 mostraron una frecuencia del 1,35% y 3% respecto a la de Cre-TrwC.

Sorprendentemente, han sido detectados transconjugantes para el fragmento de Cre-TrwC<sub>2-600</sub>. Aunque la frecuencia es muy baja, el resultado era inesperado, porque se sabe que la actividad helicasa de TrwC es esencial para la conjugación (César *et al.*, 2006). Una posible explicación es que el plásmido

pSU1445 produzca un fragmento C-terminal de TrwC, que podría complementar la fusión Cre-TrwC<sub>2-600</sub>; la complementación intragénica entre fragmentos N-terminales y C-terminales de TrwC se ha visto con anterioridad (Llosa *et al.*, 1996). Otra posibilidad sería que esos pocos transconjugantes se hayan formado por recombinación entre el plásmido con la fusión y pSU1445, reconstituyendo el gen *trwC* funcional. Hay que hacer notar que en estas conjugaciones hemos utilizado como donadora una cepa Rec+, como estaba descrito en ensayos previos (Parker & Meyer, 2007, Lang *et al.*, 2010).

Ni los fragmentos pequeños (Cre-TrwC<sub>705-895</sub>, Cre-TrwC<sub>897-966</sub> y Cre-TrwC<sub>920-966</sub>) ni la fusión Cre-TrwC<sub>600-966</sub> fueron capaces de mediar la transferencia de ADN. Estos resultados eran los esperados porque estas proteínas no contienen el dominio relaxasa necesario en conjugación.

**Tabla. 13. Translocación de Cre-TrwC mediada en presencia de pSU1445**

Fusiones Cre-TrwC	Movilización de ADN (pSU1445)	Translocación de TrwC*
Cre	$6,33 \times 10^{-08}$	$< 7,68 \times 10^{-08}$
Cre-TrwC <sub>2-966</sub>	$1,94 \times 10^{-04}$	$2,04 \times 10^{-06}$
Cre-TrwC <sub>2-600</sub>	$2,64 \times 10^{-06}$	$1,01 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>600-966</sub>	$4,78 \times 10^{-08}$	$2,29 \times 10^{-06}$
Cre-TrwC <sub>705-895</sub>	$< 1,81 \times 10^{-08}$	$8,57 \times 10^{-08}$
Cre-TrwC <sub>897-966</sub>	$< 3,22 \times 10^{-08}$	$2,39 \times 10^{-08}$
Cre-TrwC <sub>920-966</sub>	$< 3,88 \times 10^{-08}$	$9,59 \times 10^{-08}$
Cre-TrwC <sub>TS1</sub>	$2,63 \times 10^{-05}$	$3,11 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>TS2</sub>	$5,89 \times 10^{-05}$	$4,37 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>TS1*+TS2</sub>	$2,70 \times 10^{-05}$	$2,22 \times 10^{-07}$
Cre-TrwC <sub>TS1+TS2</sub>	$2,45 \times 10^{-05}$	$2,29 \times 10^{-07}$

**Tabla 13.** Mapeo funcional de la TS de TrwC. Se indican la movilización del plásmido pSU1445 mediada por Cre-TrwC. Las frecuencias se indican como transconjugantes/ donador y la translocación de las proteínas de fusión como recombinantes/donador utilizando el plásmido *helper* pSU1445. \* Datos tomados de la Tabla 12.

En cuanto a los datos de translocación de proteínas (Tabla 13), las mayores frecuencias fueron detectadas para Cre-TrwC y Cre-TrwC<sub>600-966</sub>, mientras que fueron muy bajas o casi indetectables para los fragmentos más pequeños.

Las diferencias observadas entre la translocación de fragmentos de TrwC por pSU2007 o por pSU1445 apuntan a que la translocación de TrwC requiere de la formación del relaxosoma y/o de interacciones que estabilicen estas fusiones, de manera similar a lo observado en los ensayos de Cre para TraI<sub>R1/F</sub> (Lang & Zechner, 2012). Sin embargo este sistema no nos permite determinar el efecto que tendría la transferencia de ADN sobre la translocación de las proteínas de fusión.

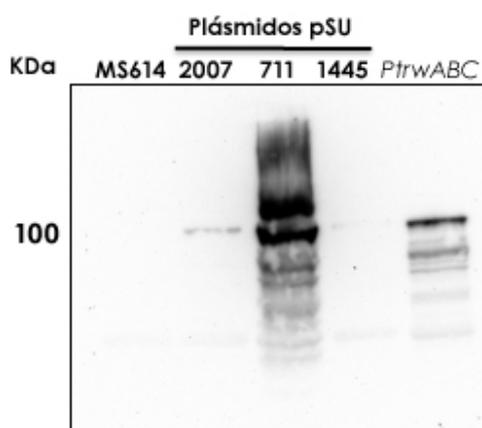
Dado que TrwC puede ser translocada en ausencia de ADN (Draper *et al.*, 2005), intentamos un ensayo en estas condiciones utilizando el plásmido pSU711 ( $\Delta oriT$ ). Este es un derivado de R388 que presenta una delección en el *oriT* y por tanto no es movilizable. En la Tabla 12, se muestran las frecuencias de translocación en presencia de pSU711.

Rápidamente observamos que las frecuencias de translocación de fusiones Cre-TrwC eran casi indetectables. Estos resultados fueron llamativos porque como ya se ha comentado, TrwC salvaje puede ser translocada en forma independiente de ADN.

El hecho de que los niveles de translocación de las fusiones Cre-TrwC, sean casi indetectables puede deberse a una competencia entre la proteína salvaje y la fusión por la T4CP. Quisimos entonces comprobar los niveles de TrwC salvaje producidos por el plásmido pSU711. Para ello, realizamos un ensayo de Western blot mostrado en la **Figura 71**.

Observamos que el plásmido pSU711 producía niveles muy altos de TrwC salvaje comparado con los plásmidos pSU2007 y pSU1445. Esto puede ser debido a que el plásmido pSU711 tiene una delección en el *oriT* que abarca uno de los sitios de unión de TrwA, proteína que actúa como represora del operón *trwABC*. Por lo tanto, este ensayo no nos permite separar el efecto que tiene la presencia de la proteína salvaje frente al efecto de la transferencia de DNA, puesto que los altos niveles de TrwC producidos por este plásmido estarían inhibiendo la translocación de las proteínas de fusión. Una forma alternativa de estudiar el efecto de la translocación de DNA sería ensayar una fusión de Cre con un mutante puntual TrwC

en la actividad helicasa (César *et al.*, 2006); dicha proteína permitiría la formación del relaxosoma, pero no la transferencia conjugativa del DNA.



**Figura 71.** Western blot con anti-TrwC de los derivados de R388 utilizados como *helpers* en los ensayos de CRAFT. La región *Dtr* de R388, clonada en el vector pET29c, fue también comparada y está indicada como *PtrwABC*.

Por último, para descartar que la mayor frecuencia de translocación en presencia de pSU2007 se debiese a que las proteínas eran transportadas pasivamente por su capacidad de unirse a ADN transferido, realizamos los anteriores ensayos añadiendo el plásmido RSF1010 no autotransferible. Este plásmido es transferido por conjugación a través del T4SS de R388 (Cabezón *et al.*, 1997). No hemos detectado incremento alguno en las frecuencias de translocación (datos no mostrados). Previamente ya se había demostrado que la transferencia de un plásmido movilizable no afectaba a la translocación de TrwC en ensayos triparentales en ausencia de transferencia de R388 (Draper *et al.*, 2005).

En resumen, los datos obtenidos en los ensayos CRAFT nos han permitido determinar experimentalmente la existencia de una TS en TrwC, que está localizada entre los aa 705-895 dentro del módulo conservado RecD/TS definido por Lang y cols, (2010). Dentro de esta región, la secuencia que hemos denominado TS1 (GDTIRIT, aa 796-802), seleccionada por su alineamiento con TraI, parece ser de especial relevancia para la translocación de la proteína.

La TS de TrwC, al igual que las definidas para MobA de R1162 y TraI<sub>R1/F1</sub>, no presenta la localización ortodoxa en la región N-terminal o C-terminal encontradas

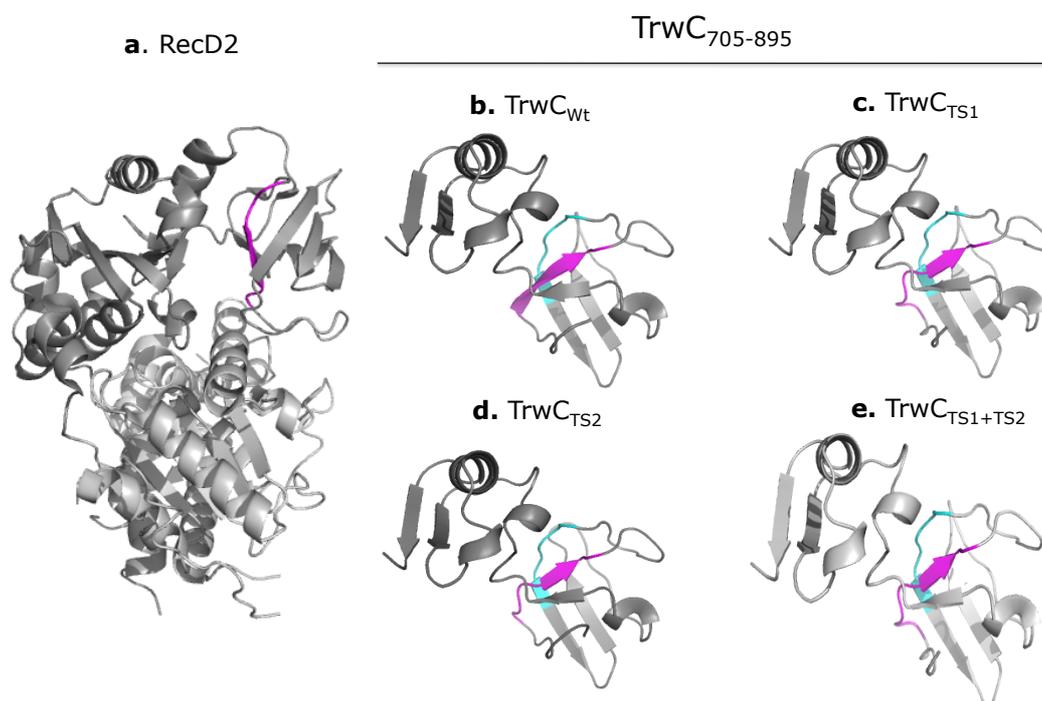
en las TS de los efectores de diferentes T4SS implicados en virulencia (Álvarez-Martínez & Christie, 2009), sino que está localizada en el tercio terminal de la proteína. Además, tampoco presenta las secuencias conservadas para los efectores de diferentes T4SS: los motivos cargados positivos localizados en el C-terminal de los efectores del T4SS de *At* (Vergunst *et al.*, 2005) o los dominios BID encontrados en los efectores Bep de *Bartonella spp* (Schulein *et al.*, 2005). A diferencia de TrwC, las relaxasas MobA de R1162 (Mob<sub>Q</sub>) (Parker & Meyer, 2007) y TraI<sub>R1/F</sub> (Mob<sub>F12</sub>) (Lang *et al.*, 2010) presentan dos TS asociadas a los dominios relaxasas y helicasas, y son capaces de mediar la translocación de ambos dominios en forma independiente. La existencia de ambas TS en la familia Mob<sub>F12</sub> habría sido causada por una duplicación génica a lo largo de la evolución. En contraste, TrwC (Mob<sub>F11</sub>) contiene una TS, la que hemos definido como TS1. Dado que la TS1 está asociada al dominio helicasa, el dominio relaxasa no podría ser translocado por sí solo. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que cuando se co-expresan los fragmentos N-terminales N293, N348 o N450 con el fragmento helicasa C774, existe complementación aunque con frecuencias unos 4 órdenes de magnitud inferior a la de la proteína salvaje (Agúndez *et al.*, 2011). Sería interesante añadir la secuencia TS1 al dominio relaxasa de TrwC para ver si la complementación alcanza niveles similares a los observados para TraI. Tampoco podemos descartar que ese débil nivel de complementación se deba a la presencia de una débil TS adicional en la región N-terminal de TrwC, lo que explicaría también la translocación de baja frecuencia observada para N600 (Tabla 12).

Las relaxasas MobA de R1162 y de RSF1010 (idénticas en secuencia) pueden ser translocadas por T4SS implicados en conjugación y en la translocación de efectores. MobA de RSF1010 es reconocida por el T4SS de *At* a través de su extremo C-terminal (Vergunst *et al.*, 2005), mientras que MobA de R1162 presenta dos TS internas, (sig1 y sig2), responsables de su translocación por el T4SS de R751 (Parker & Meyer, 2007). Puesto que la relaxasa TrwC, además de mediar la transferencia de ADN por su propio T4SS durante la conjugación (Draper *et al.*, 2005), media la transferencia de un derivado de R388 dentro de células humanas a través del T4SS VirB/D4 de *Bh*, nos planteamos cuáles serían las TS para este T4SS. TrwC no presenta ninguna de las señales de secreción descritas para los efectores del sistema VirB/D4 de *Bh* (Schulein *et al.*, 2005).

En nuestro laboratorio, la Dra Anabel Alperi ha transferido los mutantes en las TS1 y TS2 de TrwC a plásmidos que contienen toda la región *Dtr* de R388 y ha

ensayado su movilización tanto en conjugación bacteriana (mediada por el T4SS de R388) como a células humanas (mediada por el T4SS de *Bh*). Los resultados muestran que la mutación en TS1 casi elimina la transferencia conjugativa (como observamos al ensayar este mutante con pSU1445), mientras que se observa una caída leve en la transferencia mediada por *Bh*. La mutación en TS2 apenas afecta a ambos procesos. Estos datos sugieren que TrwC posee una única TS la cual es reconocida por su propio T4SS. La translocación por el T4SS VirB/D4 de *Bh*, requiere además de la presencia de la T4CP (TrwB) de otras proteínas que aún están pendientes de determinar.

Una pregunta importante es la naturaleza de las TS de los T4SS, es decir, si están basadas en el reconocimiento de una secuencia aminoacídica específica, o de una estructura tridimensional, o una combinación de ambas. En nuestro diseño de mutaciones en las posibles TS, hicimos una predicción de estructura secundaria intentando que las alteraciones introducidas no la alterasen, para poder adjudicar el efecto observado, de hacerlo, al reconocimiento específico de secuencia. Como se observa en la estructura secundaria (Fig. 65), la hoja beta que contiene el consenso y que está conservada en RecD2 no se altera en ninguno de los mutantes diseñados según diversos programas de predicción, aunque sí se ve algún efecto en la región circundante. Para profundizar en el posible efecto de las mutaciones en la estructura de la proteína, nos pareció interesante modelar la estructura 3D del fragmento de TrwC<sub>705-895</sub> con las mutaciones realizadas. Para ello se ha utilizado el programa swiss-model. El molde fue seleccionado automáticamente por el programa, y fue precisamente la cadena A de la estructura cristalina del compuesto binario de RecDs con ADN de *Deinococcus radiodurans* (PDB-entry: 3GP8\_A). En la **Figura 72** se muestra la estructura N-terminal de RecD2 (a), y el modelo 3D del fragmento de TrwC salvaje (b), mutante en TS1 (c), mutante en TS2 (d) y mutante en TS1+TS2 (e). Puede observarse la similitud entre la estructura de RecD2 de *Deinococcus radiodurans* y nuestro modelo, en las 2 láminas- $\beta$  paralelas conectadas por un loop a una hélices- $\alpha$  que se proyecta hacia el observador. Si bien estas regiones también contribuirían al reconocimiento según lo descrito para TraI<sub>R1/F</sub> (Lang *et al.*, 2010), la región que contiene el consenso de residuos conservados para TSA y TSB de TraI<sub>R1/F</sub> se encontraría en el arreglo de láminas- $\beta$  antiparalelas, indicado en la Fig. 71 A en color fucsia.



**Figura 72.** a) Representación tridimensional de la estructura de Rec2D (PDB-entry:3e 1s). La región con similitud estructural a TSA y TSB de TraI<sub>F/R1</sub> ha sido resaltada en gris oscuro en dicha estructura. b-e ) Modelado 3D de la región de TrwC<sub>705-895</sub>. En las estructuras se resalta en fucsia los residuos consenso de la TS1 y en celeste la TS2. b) TrwC salvaje, c) mutante TS1, d) mutante en TS2 y e) mutante TS1+TS2.

A pesar de las predicciones de estructura secundaria, en 3D se observó un acortamiento de la lámina  $\beta$  en el mutante TS1. Estas discrepancias hacen pensar que cualquier cambio en la secuencia produce cambios impredecibles en la estructura 3D. Por lo tanto, no podemos asegurar que el efecto observado en los mutantes TS se deba a la pérdida de un reconocimiento de secuencia aminoacídica específica, podría tratarse de la pérdida de un elemento estructural. Será necesario analizar más mutantes para poder determinar la naturaleza de la TS de TrwC.

#### **4.4. La interfase entre el T4SS y la célula receptora: conjugación a levaduras y mitocondrias**

La versatilidad biológica de los T4SS incluye la elección del destino de sus sustratos, que puede ser el medio extracelular u otra célula, procariota o eucariota. El estudio de los determinantes de esta elección es de difícil abordaje molecular, dado el escaso conocimiento que se tiene de los receptores, si los hay, en la célula de destino. Con respecto a la transferencia de ADN a una célula receptora, múltiples estudios previos indican que dicha célula puede ser de naturaleza procariota o eucariota (Heinemann & Sprague, 1989, Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987). Nos propusimos analizar los límites de esta flexibilidad utilizando dos tipos de recipientes de la conjugación diferentes a las bacterias: células de levadura y mitocondrias.

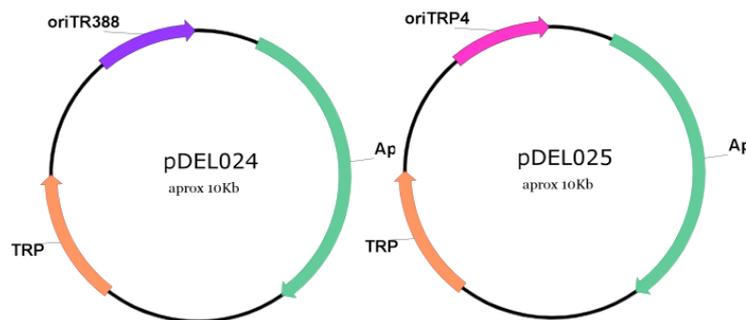
La conjugación de bacterias a levaduras había sido demostrada (Heineman & Sprague, 1989, Bates *et al.*, 1998). Nuestro propósito era demostrar que la procesividad de este mecanismo es extensible también cuando la célula receptora es una célula de origen eucariota, lo que sugeriría que se podría utilizar la conjugación para introducir en células eucariotas moléculas de ADN de gran tamaño, como genes humanos con sus secuencias reguladoras. Por otro lado, introducir ADN por conjugación dentro de mitocondrias daría lugar a una técnica molecular altamente preciada en el campo de la genética mitocondrial. Por conjugación se podrían transformar mitocondrias *in vivo*, es decir desde dentro de la célula, algo que aún no ha sido posible. Creemos que ambos modelos podrían ser utilizados como métodos de transformación y/o modificación genética de células eucariotas y/o de organelos.

##### **4.4.1. Transferencia de BACs de bacterias a levaduras por conjugación**

Trabajos previos habían demostrado que una molécula de ADN plasmídico podía ser introducida por conjugación desde una bacteria a una levadura (Heinemann & Sprague, 1989, Bates *et al.*, 1998). Basándonos en esos datos nos preguntamos si una molécula de cualquier tamaño, por ejemplo un cromosoma artificial bacteriano (BAC) sería también transferido por conjugación a levaduras. Para verificar lo anterior, primero se debieron reproducir los resultados de conjugación a levaduras previamente publicados, como se describe a continuación.

#### 4.4.1.1 Ensayos de conjugación a levaduras

Para comprobar que era factible la conjugación entre bacterias y levaduras, repetimos los ensayos previamente publicados por Heinemann & Sprague, (1989). Para ello construimos el plásmido movilizable a levaduras pDEL025 (**Figura 73**). Éste posee el *oriT* de RP4, un origen de replicación para bacterias y otro para levaduras, así como un marcador de selección en ambas células. Para su movilización se utilizó la cepa donadora S17.1 $\lambda$ pir, la cual aporta la maquinaria conjugativa porque posee integrado en su genoma el plásmido RP4. También construimos un plásmido similar que codificaba el *oriT* de R388, pDEL024 (Fig. 73). En este caso se usó como cepa donadora DH5 $\alpha$  y un derivado de R388 resistente a Km (pSU2007), para proveer la maquinaria conjugativa. Como células receptoras usamos la cepa de levadura *S. cerevisiae* L40.

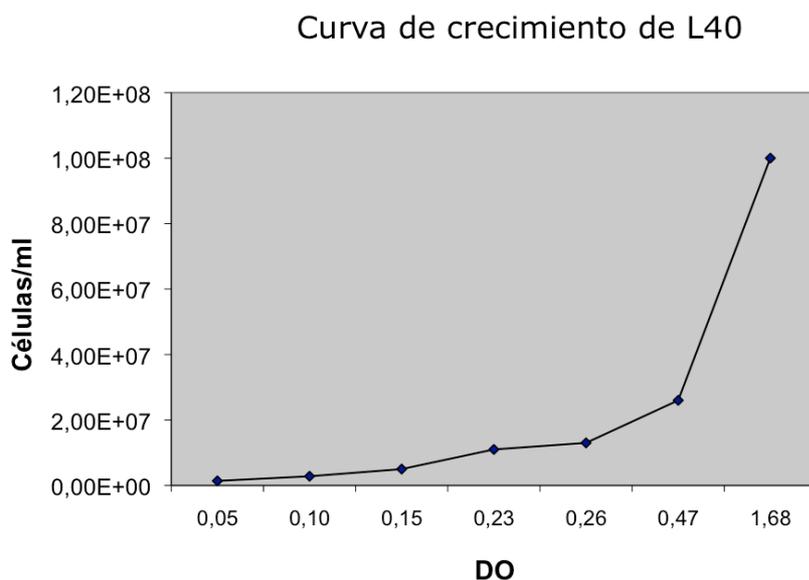


**Figura 73.** Plásmidos movilizables a levaduras. Cada plásmido lleva un marcador de selección para bacteria ( $Ap^R$ ) y levadura ( $Trp^+$ ). pDEL024 contiene el *oriT* de R388 y pDEL025 el de RP4.

En primer lugar comprobamos la movilización de los plásmidos construidos entre bacterias. Todos los plásmidos fueron eficientemente movilizados, pDEL024 con una frecuencia mayor a 1 y pDEL025 con una frecuencia de  $\sim 2 \times 10^{-01}$  transconjugantes por donador.

Posteriormente llevamos a cabo los experimentos de conjugación a levadura. En ellos se mezclaron  $2 \times 10^8$  bacterias y levaduras, ambas en fase exponencial, clave en estos experimentos. Para obtener las células en fase exponencial se realizaron las diluciones explicadas en metodología (sección 3.4.4.2.). La cantidad de bacterias fue calculada teniendo en cuenta que una

unidad de densidad óptica (DO) corresponde a  $1 \times 10^8$  células/ml. En el caso de las levaduras se ha realizado una curva de crecimiento para poder correlacionar la DO con el número de levaduras (**Figura 74**).



**Figura 74.** Curva de crecimiento de L40 realizada a partir de un cultivo o/n diluido 1/50 durante 20 horas.

Las mezclas de conjugación fueron colocadas sobre discos de acetato en placas de YPD-glucosa sin selección e incubadas 1 hora a 30°C. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio líquido selectivo (Trp<sup>-</sup>) y sembradas en el mismo medio selectivo sólido. Con el fin de eliminar cualquier bacteria donadora, adicionamos a estas placas Nx o Sm cuando las donadoras eran S17.1 $\lambda$ pir o DH5 $\alpha$ , respectivamente. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 5 días.

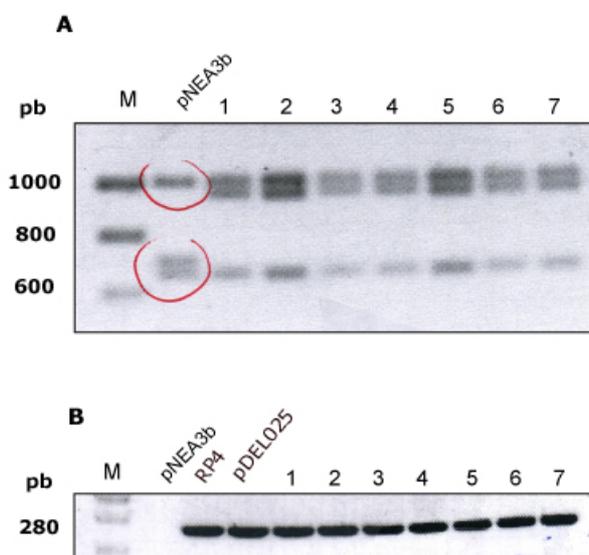
Dado que los plásmidos movilizable eran Trp<sup>+</sup>, de ocurrir transferencia de ADN por conjugación entre bacterias y levaduras observaríamos crecimiento en las placas de Trp<sup>-</sup>. En la **Tabla 14** se muestran los resultados obtenidos, y se observa que solo se obtuvieron transconjugantes (Trp<sup>+</sup>) cuando los plásmidos eran movilizados por el sistema conjugativo de RP4. Las frecuencias obtenidas fueron similares a las descritas previamente por Heineman & Sprague, (1989) y Bates y cols, (1998).

**Tabla 14.** Conjugación a levaduras usando el T4SS de RP4 y R388

Donadoras	Frecuencias
S17.1 $\lambda$ pir	
C- (pNEA3b)	$< 1,6 \times 10^{-06}$
<i>oriT</i> RP4 (pDEL025)	$1,1 \times 10^{-05}$
DH5 $\alpha$	
C- (pNEA3b)	$< 8,6 \times 10^{-07}$
<i>oriT</i> R388 (pDEL024)	$< 3,5 \times 10^{-07}$

**Tabla 14.** Frecuencias de conjugación de los plásmidos movilizables a levaduras. Las frecuencias fueron expresadas como nº transconjugantes/donador y son las medias de 4-5 experimentos independientes.

Los transconjugantes fueron replicados en placas selectivas y crecidos en medio líquido selectivo. De estos cultivos se extrajo ADN plasmídico que fue luego transformado a *E. coli*, desde donde se extrajo nuevamente para su posterior análisis. El análisis por restricción lo realizamos por comparación del vector pNEA3b sin *oriT* con el de los transconjugantes, con las enzimas EcoRV (corta el vector) y XhoI (extremo del *oriT* de RP4). También se realizó sobre estos ADNs una PCR específica para el *oriT* de RP4. En la **Figura 75 A**, se observa la diferencia entre el vector pNEA3b y los transconjugantes y en Fig. 43 B los productos de PCR con el tamaño correspondiente al *oriT* de RP4, de 280 pb.



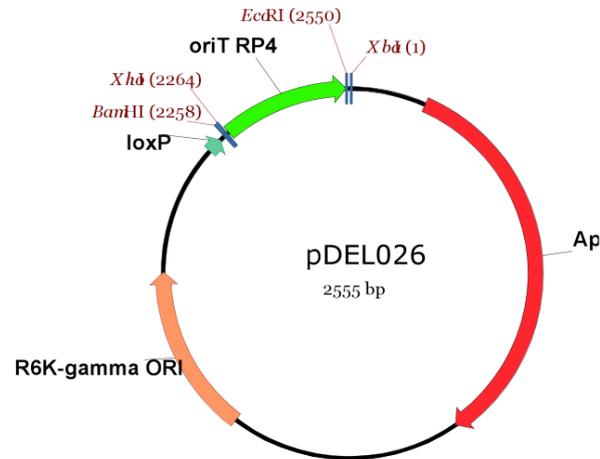
**Figura 75.** Análisis de los transconjugantes. A) Análisis por restricción del ADN con EcoRV/XhoI. B) PCR específica para el *oriT* de RP4. Líneas 1-7, ADN plasmídico aislado de distintos transconjugantes y amplificado en *E. coli*. M, marcador de pesos moleculares.

Los resultados indicaron que en nuestras condiciones de laboratorio era posible reproducir la conjugación a levaduras utilizando el sistema de RP4. Sin embargo, no hemos observado transferencia de ADN utilizando el sistema de R388. Estos datos refuerzan una vez más la flexibilidad del sistema conjugativo de RP4 para establecer interacciones con otras superficies celulares diferentes de las bacterianas (Bates *et al.*, 1998). Que el sistema de RP4, y no el de R388, sea capaz de mediar la conjugación sugiere que estas diferencias no tendrían que ver con la naturaleza del pilus conjugativo, puesto que ambos sistemas presentan el *pilus* perteneciente a la familia *P-like pilus*, corto, rígido y menos flexible que el *F-like pilus* (Lawley *et al.*, 2003, Rees & Wilkins, 1990).

#### 4.4.1.2. Construcción de BACs conjugativos

Una vez que confirmamos que éramos capaces de conjugar ADN plasmídico a levaduras decidimos ensayar la transferencia de moléculas de ADN de gran tamaño. Para ello realicé una estancia en el grupo del Dr. Javier Díaz Nido (CBMSO, Madrid) para aprender a manipular BACs y estudiar su estabilidad utilizando electroforesis de campo pulsado. Estas moléculas, a pesar de compartir las características de un plásmido, no deben ser manipulados como tales. El gran tamaño y los numerosos sitios de restricción hacen dificultosa la posibilidad de clonar directamente en el BAC. Para ello se han diseñado BACs que poseen sitios concretos en donde es factible introducir los elementos deseados por recombinación. Con la ayuda de la Dra. Sara Perez-Luz, se han construido tres BACs conjugativos a levaduras descritos a continuación. Para la construcción de los mismos utilizamos un plásmido suicida (pHZ) y un BAC previamente construido que codifica para el gen de la frataxina (*FXN*) humana, una proteína mitocondrial.

**Paso 1.** El vector suicida pHZ solo puede replicar en una cepa que aporte la proteína Pir. Este plásmido contiene un sitio *loxP*, diana de la recombinasa Cre. En ese vector se ha introducido el *oriT* de RP4 amplificado con oligos *oriP1* BamHI-XhoI y *oriP280* XbaI-EcoRI (metodología, Tabla 5), generando el plásmido pDEL026 mostrado en la **Figura 76**.



**Figura 76.** Plásmido suicida con *oriT* flanqueado por los sitios de restricción, BamHI/XhoI y EcoRI/XbaI.

Se probó la eficiencia de conjugación del plásmido pDEL026 entre cepas que aporten la proteína Pir, comprobándose que esta construcción podía ser movilizada con alta eficiencia (**Tabla 15**).

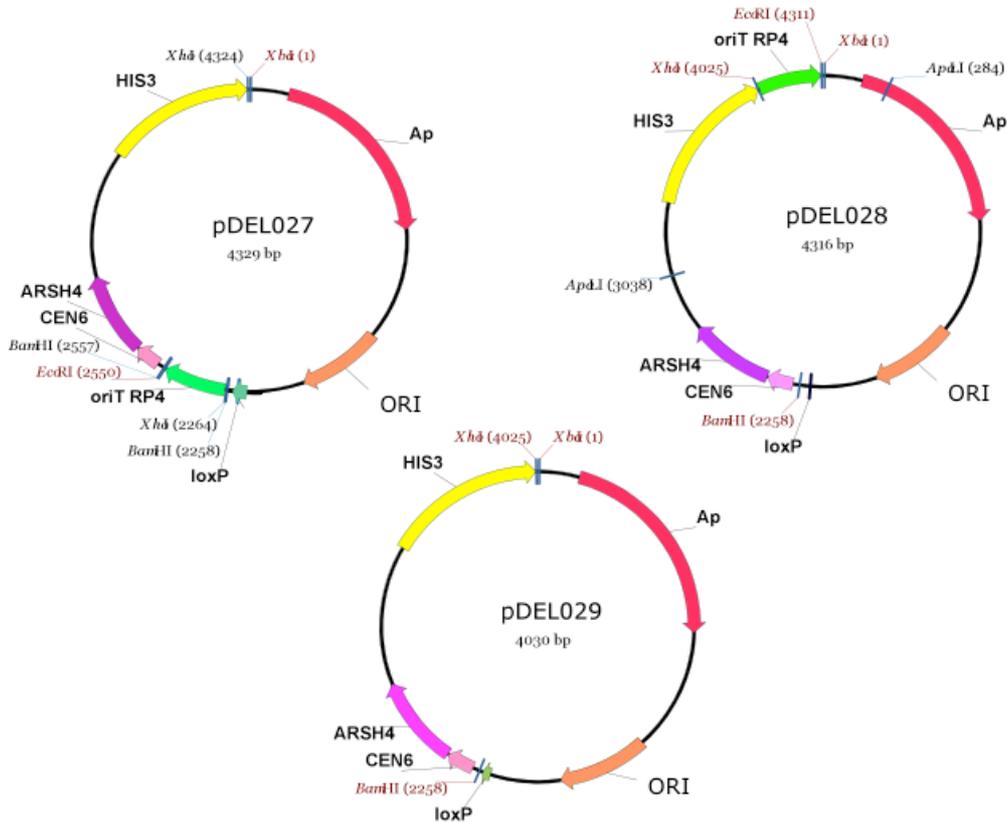
**Tabla. 15** Movilización del plásmido suicida pDEL026

<i>oriT</i> RP4	Plásmidos	Frecuencia de conjugación
-	pHZ	$1,6 \times 10^{-04}$
+	RP4	$4,9 \times 10^{-01}$
+	pDEL026	$4,7 \times 10^{-01}$

**Tabla 15.** Frecuencias de conjugación (transconjugantes/donador) del plásmido movilizable pDEL026. Las cepas donadora y receptora fueron S17.1 $\lambda$ pir y DH5 $\alpha$ pir, respectivamente.

A continuación, en dicho plásmido se insertó el cassette *CEN6-ARSH4-HIS3* amplificado por PCR a partir del plásmido pRS413IVb (Kitazono, 2011). Este cassette contiene los elementos necesarios para la estabilidad del BAC en levaduras: *ARSH4* (secuencia de replicación autónoma en levadura), *CEN6* (confiere estabilidad mitótica y meiótica en levaduras) e *HIS* (marcador de selección en levadura). La **Figura 77** muestra los plásmidos resultantes. Como el *oriT* ha sido clonado con el sitio *nic* en la hebra directa, durante la conjugación las secuencias hacia el extremo 3' son transferidas en primer lugar a la cepa receptora. Para comprobar que toda la molécula era transferida por conjugación construimos dos

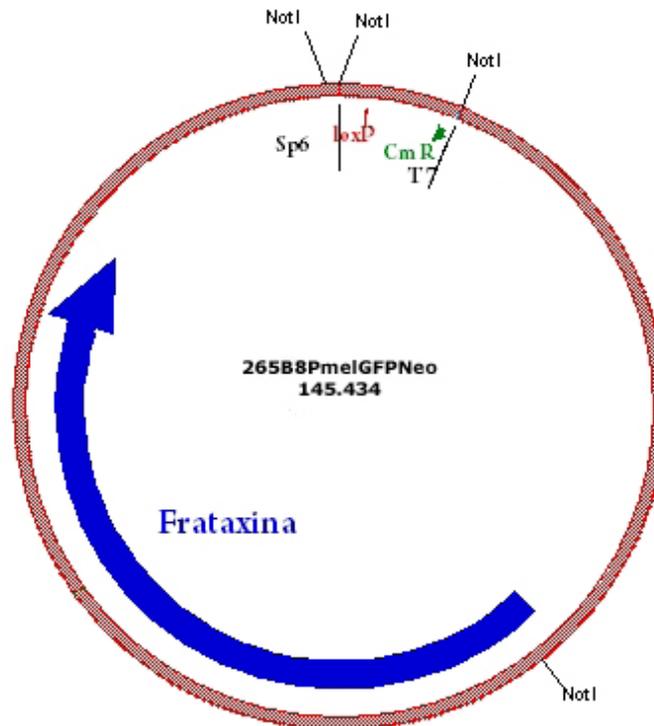
plásmidos movilizables, pDEL027 y pDEL028. En el primero el cassette *CEN6-ARSH4-HIS3* se encuentra en el extremo 3' de la secuencia del *oriT* de RP4 y en el segundo en el extremo 5' del *oriT*. Como control negativo, el cassette también se insertó en el vector sin *oriT* pHZ (pDEL029).



**Figura 77.** Plásmidos suicidas utilizados para la construcción de los BACs conjugativos.

**Paso 2.** Los plásmidos pDEL027, pDEL028 y pDEL029 fueron introducidos en el BAC que codifica para la proteína *frataxina* humana (**Figura 78**) por recombinación mediada por la proteína Cre entre los sitios *loxP* del plásmido suicida y el existente en el BAC, como se describe en metodología (sección 3.4.3.). Los BACs resultantes se denominan en esta sección BAC-pDEL027, BAC-pDEL028 y BAC-pDEL029, haciendo referencia al plásmido introducido (en la Tabla 5 de metodología estos clones han sido nombrados como pDEL032, pDEL033 y pDEL034).

Los BACs conjugativos fueron mantenidos en bacterias DH10B, estirpe habitual para la manipulación de BACs para preservar la integridad de estas moléculas. Para observar su estabilidad se realizaron digestiones con la enzima XhoI. El patrón de digestión fue observado por electroforesis de campo pulsado (PFGE) en geles de agarosa al 1%.



**Figura 78.** Mapa genético del BAC de la frataxina humana. En rojo se señala el sitio *loxP* utilizado para introducir los plásmidos suicidas pDEL027, pDEL028 y pDEL029. En verde el gen de resistencia a Cm para la selección en bacterias. En azul el gen de frataxina (*FXN*).

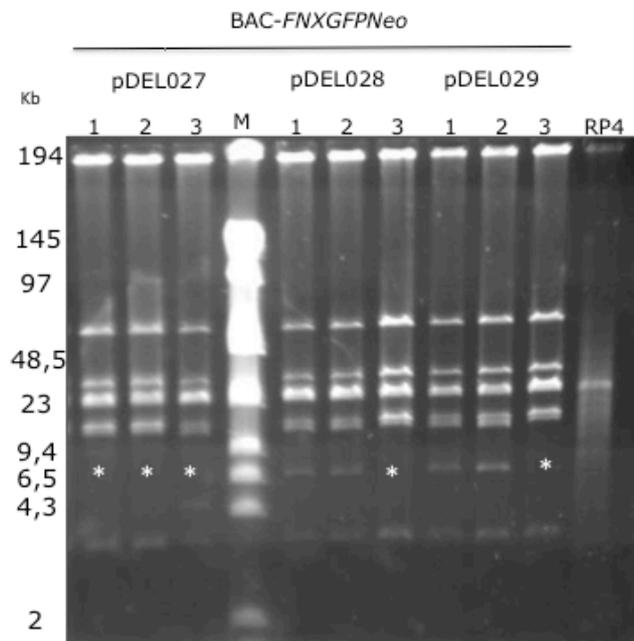
#### 4.4.1.3 Conjugación de BACs a levaduras

Para comprobar la movilización de estos BACs, llevamos a cabo, en primer lugar, ensayos de conjugación entre bacterias. Los BACs fueron transformados a bacterias donadoras (DH10B) que contenían el plásmido RP4, para proveer la maquinaria conjugativa. Previo al ensayo de conjugación, se analizó la integridad de los BACs conjugativos en estas células. En la **Figura 79** se muestra el patrón de restricción para la enzima XhoI, el cual nos permite diferenciar los fragmentos esperados para cada BAC conjugativo y el BAC original.

<i>BAC-FXNGFPNeo</i>				
<i>BAC-FXNGFPNeo</i>	pDEL027	pDEL028	pDEL029	RP4
145.434 Kb	149.763 Kb	145.750 Kb	149.464 Kb	59 Kb
61161	61161	61161	61161	30
35024	35024	35024	35024	29
16693	14758	14758	14758	
14758	14086	14086	14086	
14080	12037	13798	13798	
3513	6925	7211	6925	
199	3513	3513	3513	
	2060	199	199	
	199			

**Figura 79.** Patrón de restricción de los BACs con XhoI. En recuadros se indica el tamaño en Kb que permite verificar la estructura de los BACs.

En la **Figura 80**, se muestra el análisis de 3 colonias de células donadoras de cada BAC. Tanto el BAC-pDEL028 como el BAC-pDEL029 mostraron las bandas esperadas. Sin embargo en la donadora número 3 de ambos y en el BAC-pDEL027 la banda de ~7 Kb estaba ausente.



**Figura 80.** Análisis de restricción con XhoI de células donadoras. La estrella indica la banda ausente de unas 7 kb. PFGE: agarosa 1%, tiempo: 11 horas, Pi: 1, Pf:6, V:9 V, ángulo: 120°C.

Por lo tanto para el BAC-pDEL027 se volvieron a transformar y analizar células donadoras. Para los demás se utilizaron las células donadoras 1 o 2 que mostraban el patrón correcto de restricción (Fig.79). Al parecer, la electroporación del BAC podría afectar a su estructura, por lo que estas moléculas tenderían a perder estabilidad.

Una vez obtenidas las células donadoras con los BACs completos, se realizaron ensayos de conjugación entre bacterias. En la **Tabla 16** se muestran las frecuencias de conjugación representativas de estos ensayos.

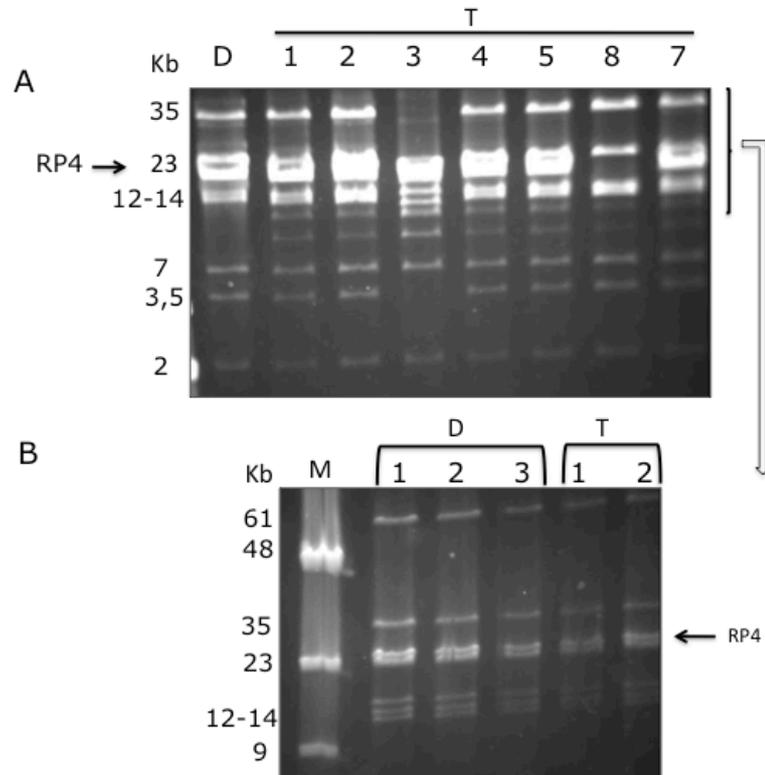
**Tabla 16.** Movilización de BACs entre bacterias

BAC	oriT	Frecuencia
BAC-pDEL029	-	$<2 \times 10^{-6}$
BAC-pDEL027	+	$1,8 \times 10^{-6}$
BAC-pDEL028	+	$4,8 \times 10^{-6}$

**Tabla 16.** Frecuencias de conjugación (transconjugantes/donador) de los BACs entre las cepas DH10B Sm<sup>R</sup> y DH10B Rif<sup>R</sup>.

Las frecuencias de conjugación mostradas en la Tabla 16 fueron sorprendentemente bajas. Aún desconocemos las causas, puesto que ni el cassette de estabilidad en levaduras (Kitazono *et al.*, 2001 ) ni el contenido genético del BAC son tóxicos para las células de *E coli* DH10B (datos de Pérez-Luz no mostrados).

En la **Figura 81 A** se muestra el análisis de restricción para los transconjugantes del BAC-pDEL027. Los transconjugantes analizados por PFGE presentaban las bandas esperadas y el plásmido RP4. Sin embargo, mostraban dos bandas adicionales con un tamaño de alrededor de 9-10 Kb. En particular la colonia 3 mostró un patrón de digestión muy diferente al de la donadora. En la Fig. 81 B se muestra el patrón de digestión de las bandas de mayor peso molecular para 3 colonias de donadoras y dos transconjugantes, y en todos los casos se obtuvo el patrón esperado. Se analizaron también transconjugantes del BAC-pDEL028, y se observaron resultados similares (no mostrado).



**Figura 81.** Análisis de restricción con XhoI de los transconjugantes. PFGE: agarosa 1%, Pi: 1, Pf:6, V:9 V, ángulo: 120°C. A) Tiempo:5 horas y en B) 11 horas.

Los ensayos de conjugación nos indican que, si bien es posible la transferencia entre bacterias, la estabilidad de estos BACs es dudosa. Se han observado especies aberrantes tanto después de ser electroporadas en células donadoras como en los transconjugantes analizados.

Para solucionar estos inconvenientes, en primer lugar debemos detectar las secuencias que generan inestabilidad. Esto se podría lograr después de sucesivas conjugaciones en donde se perderían estos fragmentos.

El siguiente paso de nuestro plan era intentar transferir estos BACs por conjugación a levaduras. Para ellos contábamos con la cepa L40, de uso rutinario en nuestro laboratorio, y una colección de cepas deficientes en las vías de recombinación *RAD* (Le & Dobson, 1997, Smirnova *et al.*, 2004), adecuadas para mantener estables estos BACs una vez ocurrida la conjugación y a su vez funcionales como receptoras de la conjugación del plásmido pDEL025 (datos no

mostrados). Hemos intentado transferir estos BACs a levaduras en primer lugar usando la cepa L40, sin embargo encontramos que en los controles negativos de conjugación crecen numerosos mutantes espontáneos de levadura.

En cualquier caso, teniendo en cuenta que las frecuencias de conjugación entre bacterias fueron muy bajas, y que la conjugación de cualquier molécula es mucho menos eficiente a levaduras, es posible que no alcanzáramos a detectar el evento conjugativo en las condiciones ensayadas. Por ello, decidimos no proseguir con este objetivo, mientras no conozcamos las causas de la baja frecuencia de conjugación de los BACs entre bacterias.

#### 4.4.2. Conjugación a Mitocondrias

Como se comentó en la Introducción (sección 1.5.), la conjugación entre bacterias y mitocondrias aisladas había sido previamente descrita por Yoon & Koob, (2005). En aquellos experimentos la polimerasa T7 fue dirigida a las mitocondrias específicamente. Estas mitocondrias fueron aisladas y utilizadas como receptoras de la conjugación de un plásmido que codificaba el gen de la *gfp* bajo el control del promotor T7. Los autores detectaron transcripción del gen solo cuando se utilizaba como donadora la bacteria que contenía el plásmido con *oriT*.

Sin embargo, posteriormente a que se llevaran a cabo estos experimentos, fue publicado por Koulintchenko y cols, (2006) que las mitocondrias al igual que muchas bacterias son capaces de captar ADN del medio extracelular y utilizarlo como molde para generar transcritos de ARN. En este trabajo demostraron la captación de ADN, transcripción, procesamiento y maduración de la molécula de tRNA<sup>Arg</sup>. Estos eventos solo podrían tener lugar dentro de las mitocondrias, donde se encuentran las enzimas responsables de llevar a cabo esas funciones.

Por lo tanto, los experimentos de Yoon & Koob deben ser comprobados, ya que el ADN liberado después de la lisis bacteriana podría haber ingresado a la mitocondria tal y como lo describieron Koulintchenko y cols (2006).

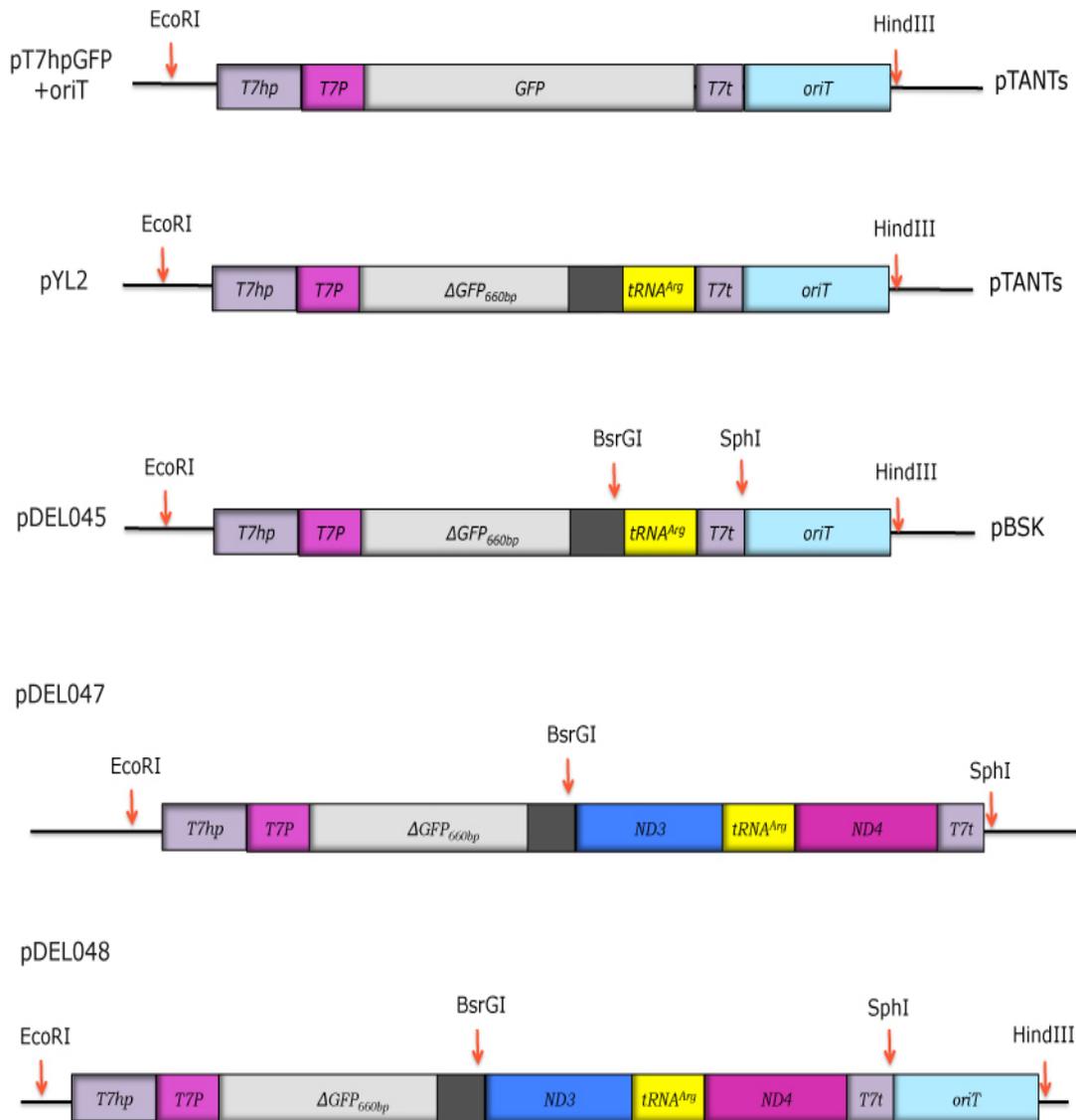
En nuestro grupo hace tiempo que habíamos intentado abordar el diseño de un ensayo de conjugación a mitocondrias. Establecimos una colaboración con el Dr. Eric Schon (Universidad de Columbia, USA) y el Dr. Robert Lightowlers (Universidad de Newcastle, UK) para diseñar un ensayo en el cual la detección de la conjugación

involucre un marcador específico de mitocondrias, como es el procesamiento y maduración de un tRNA.

Brevemente, el proyecto estaba basado en los ensayos previos de Yoon & Koob, (2005). Sin embargo, la diferencia principal era la forma de detección del evento conjugativo. Los plásmidos movilizables codificarían el gen del tRNA de arginina mitocondrial humana (h-mt-tRNA). El transconjugante sería detectado después del procesamiento y maduración de este tRNA con la técnica de circularización (como se explica más adelante). Realicé una estancia en el laboratorio del Dr. Schon con el fin de construir los plásmidos adecuados y realizar ensayos de conjugación.

#### 4.4.2.1. Construcción de plásmidos

Los plásmidos construidos para este trabajo están basados en los publicados por Yoon & Koob, (2005). En la **Figura 82**, se muestran los esquemas de cada uno de ellos. El plásmido original llamado pT7hp-GFP+oriT contenía la secuencias del T7 (T7hp) y T7P seguido del gen *GFP* en el vector pTANTs (Yoon & Koob, 2005). En el grupo del Dr. Schon, este plásmido fue modificado añadiéndole la secuencia del h-mt- tARN<sup>Arg</sup> flanqueada por 7 nucleótidos hacia el 5' y 3' respectivamente, y el terminador de la transcripción hacia el 3' generando el plásmido pYL2 como se muestra en la Fig. 82. Durante la construcción de este clon el gen de *GFP* fue deletado hacia el 3'. Por lo que en el caso de ser transcrita transcrita, generaría una proteína no funcional de aproximadamente 660pb. Entre ésta secuencia parcial de *GFP* y la secuencia del h-mt-tARN, hay 50 nt como resultado de la inserción de h-mt-tARN (indicados en una caja gris). Puesto que el mapa completo del vector pTANTs (en dónde está hecho el plásmido pYL2) no ha sido publicado, decidimos pasar la construcción contenida entre los sitios de restricción EcoRI/HindIII a un vector conocido como el pBSK. Generamos de esa forma el plásmido pDEL045. Sobre este vector han sido construidos los plásmidos pDEL047 (-oriT) y pDEL048 (+oriT), en los cuales se les ha añadido la secuencia del h-mt-tARN<sup>Arg</sup> flanqueada por las secuencias parciales de los genes mitocondriales *ND3* y *ND4* amplificados directamente desde ADN mitocondrial de células humanas HeLa. Los cebadores utilizados contienen los sitios de restricción necesarios y la secuencia del terminador de la transcripción, como se indica en la Tabla 5 de metodología.

**Plásmidos****Vector**

**Figura 82.** Esquema de la construcción de los plásmidos movilizables. En la Tabla 5 de metodología se indican los cebadores utilizados así como las enzimas de restricción usadas.

Para comprobar en primer lugar su movilización entre bacterias, los plásmidos fueron co-transformados en bacterias donadoras Ecsf2a\_3 (Lim *et al.*, 2008) que contenían el plásmido pUZ2008, el cual aportaba la maquinaria conjugativa de pUZ8 (idéntico a RK2 o RP4), y movilizados a una cepa receptora DH5α. En la **Tabla 17** se muestran las frecuencias conjugativas obtenidas.

**Tabla 17.** Movilización de los plásmidos pDEL047 y pDEL048 entre bacterias

Plásmido	<i>oriT</i>	Frecuencia
pUZ2008*	-	$< 1 \times 10^{-6}$
pUZ2008+pDEL047	-	$1,8 \times 10^{-6}$
pUZ2008+pDEL048	+	$5,3 \times 10^{-2}$

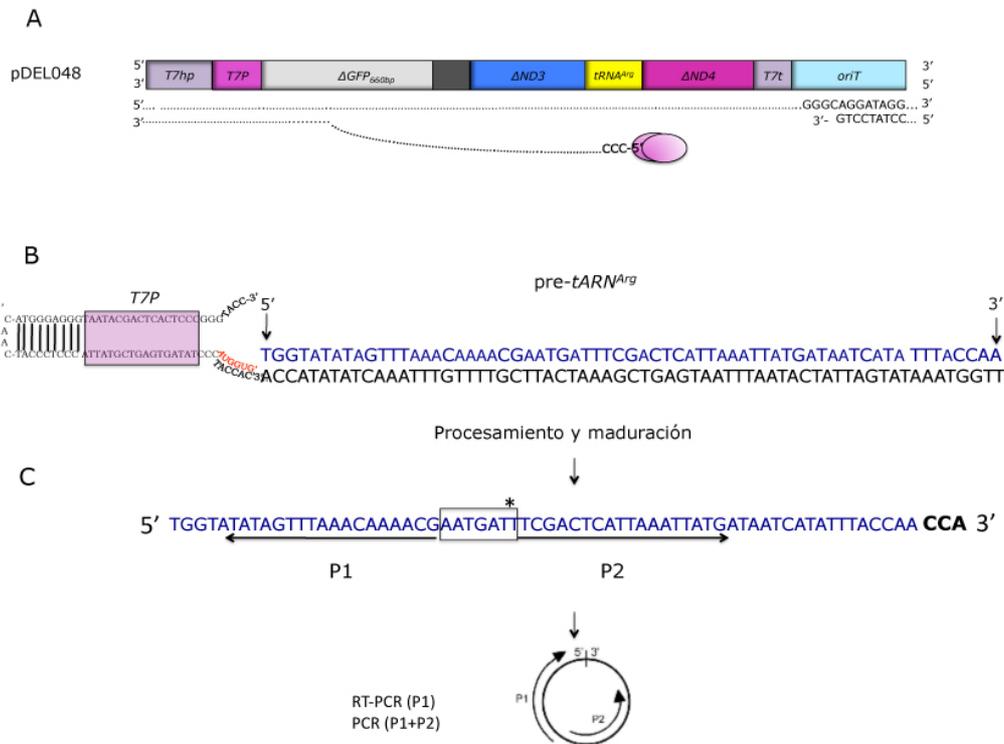
**Tabla 17.** Frecuencias de conjugación entre bacterias donadoras Ecsf2a\_3 y receptoras DH5 $\alpha$ . \* El plásmido pUZ2008 (es un derivado del plásmido pUZ8 -idéntico a RK2 o RP4-) que contiene la mutación *oriT*<sub>1</sub>. Esta produce una caída de 1000 veces las frecuencias conjugativas respecto al plásmido salvaje pUZ8.

Hemos seleccionado la cepa Ecsf2a\_3 como donadora. Esta bacteria es captada rápidamente por las células eucariotas que expresan la integrina-1; una vez en el citosol es liberada del fagosoma, y permanece dentro de la célula (no se mueven de una célula a otra). Estas características aumentarían la posibilidad de contacto entre bacterias-mitocondrias y con ello la transferencia de ADN por conjugación. Por tanto sería muy prometedor utilizarla en los futuros ensayos de conjugación a mitocondrias *in vivo* (conjugación desde dentro de la célula).

Para realizar los ensayos de conjugación entre bacterias y mitocondrias aisladas, era necesario que éstas expresasen la RNA polimerasa de T7. Para ello, las mitocondrias fueron aisladas a partir de células de ratón 3T3 previamente transformadas establemente con T7RNAP dirigida a mitocondria, como se describe en el capítulo de metodología. Hay que hacer notar que se han realizado ensayos de Western blot e inmunohistoquímica y en ningún caso fuimos capaces de detectar la presencia de la T7RNAP, como se indicaba también en el trabajo original de Yoon & Koob, (2005).

En la **Figura 83**, se muestra un esquema de la conjugación entre bacterias y mitocondrias aisladas usando el plásmido movilizable pDEL048 (+*oriT*). La relaxasa corta en el sitio *nic* del *oriT* y se une covalentemente al extremo 5'. El complejo proteína-ADN ingresaría en la matriz mitocondrial, mostrado con líneas punteadas (Fig. 83 A), en donde se produciría la transcripción generando un transcrito policistrónico que incluye el gen de tARN<sup>Arg</sup> flanqueado por secuencias parciales de los dos genes *ND3* y *ND4* tal y como está codificado en el genoma mitocondrial humano (Fig. 83 B). Estas secuencias parciales serían importantes

para que el pre-tARN<sup>Arg</sup> se pliegue correctamente y genere la estructura específica reconocida por las enzimas mitocondriales.



**Figura 83.** Esquema del ensayo conjugativo. A) Plásmido movilizable a mitocondrias (pDEL048). El sitio *nic* en el *oriT* se encuentra en la hebra inferior, siendo ésta la que entraría a la matriz mitocondrial. B) El promotor T7 forma la estructura de hairpin para que la T7RNAP comience la transcripción. Se indica en negro la secuencia de la hebra de ADN del tARN<sup>Arg</sup> que sería transferida. En azul, se indica el ARN polisistrónico. C) Transcrito de ARN procesado y madurado. La adición de CCA, que se realiza específicamente en la mitocondria, se indica en negrita.

P1: cebador específico para RT-PCR. P1+P2, cebadores utilizados en la reacción de PCR.

P1: **CCCGGATCCCGTTTTGTTTAAACTATA**

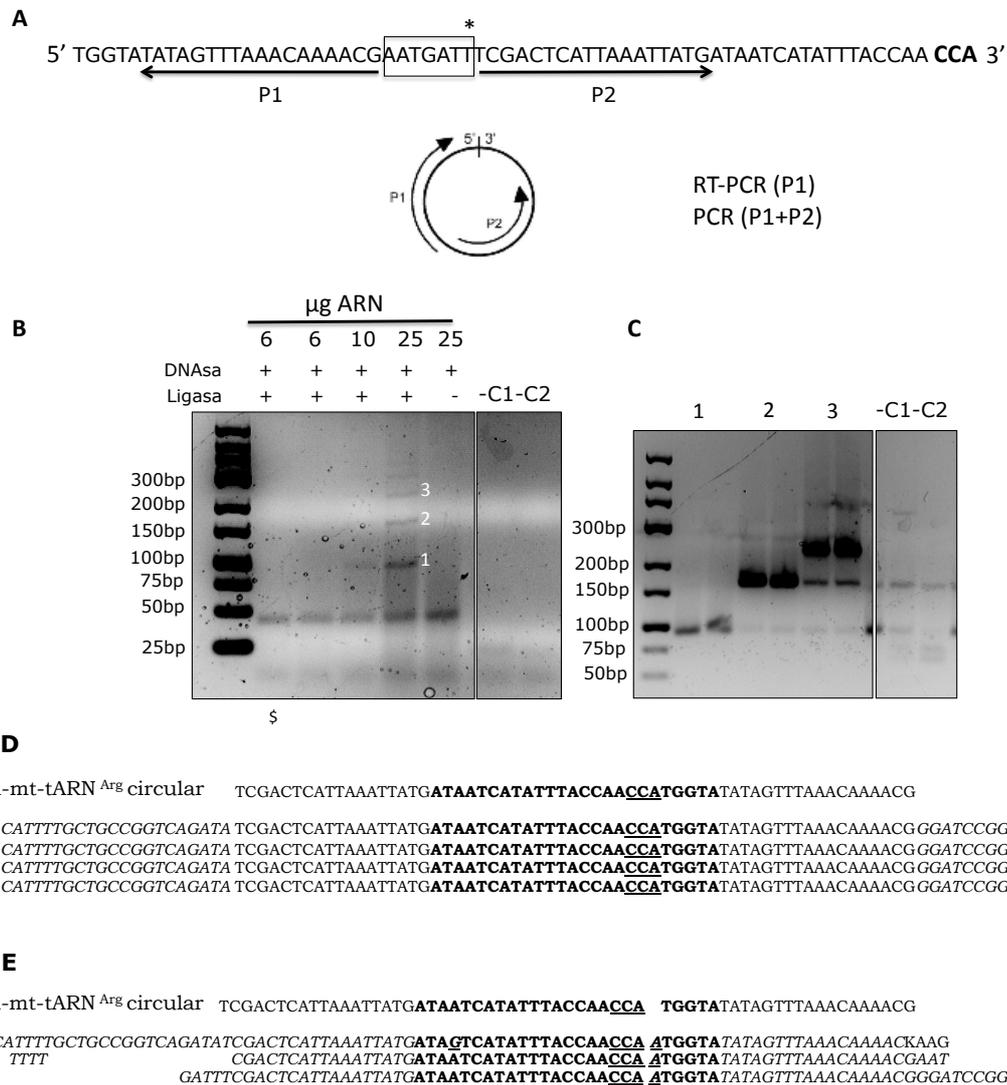
P2: **CATTTTGTGCCGGTCAGATATCGACTCATTAAATTATG**

Ambos cebadores adicionan una secuencia a sus 5' para facilitar la amplificación y el clonaje, indicada en color verde y en cursiva.

\*El recuadro indica la secuencia de tARN<sup>Arg</sup> que quedaría ausente en la secuencia circular amplificada puesto que no es amplificada en la reacción de PCR.

Si las bacterias son capaces de conjugar a mitocondrias, el plásmido movilizado que codifica para el promotor T7 será transcrito dentro del organelo y la molécula de ARN policistrónica será procesada y madurada (Fig. 83 B y C). Estos dos procesos pueden ser detectados circularizando el tARN<sup>Arg</sup> y amplificando esta





**Figura 85.** Amplificación del ARN de transferencia de arginina mitocondrial humana (h-mt-tARN<sup>Arg</sup>). A) Se muestra la zona de hibridación de los cebadores P1 y P2 sobre la secuencia del ARN de transferencia de arginina mitocondrial humana. El recuadro\* indica las bases eliminadas de la secuencia circular durante la amplificación por PCR. B) Determinación de la mínima cantidad de ARN necesaria para la reacción de ligación. § Presencia de DMSO en la mezcla de ligación. C) Re-amplificación de los productos de PCR en B (1, 2 y 3). -C1: control negativo de RT-PCR: mezcla de reactivos de RT sin ARN. En su lugar se adicionó agua DEPC. -C2= control negativo de PCR: mezcla de reactivos de PCR sin ADN copia, en su lugar se adicionó agua DEPC. D), E) Secuencias de los productos de PCR de 100 pb y 240 pb, respectivamente. Como referencia se muestra la secuencia circular del h-mt-tARN<sup>Arg</sup>. En cursiva se muestra la secuencia correspondiente a los cebadores. En negrita se indica la parte de la secuencia que no hibrida con los cebadores específicos. La maduración del tARN se produce por la adición de CCA.

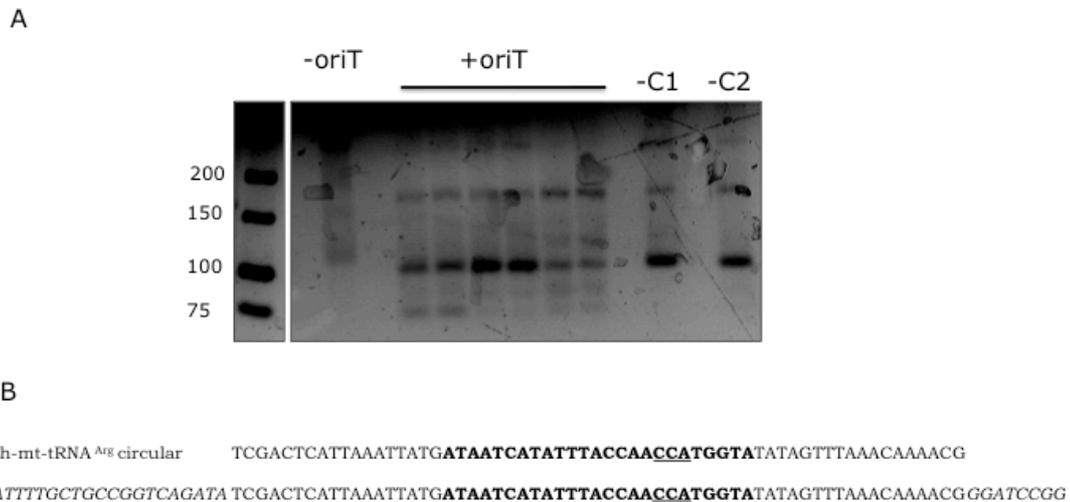
El ARN total fue tratado con DNAsa y circularizado con T4 RNA ligasa, como se indica en la metodología (sección 3.3.4). Probando diferentes cantidades de ARN detectamos el producto esperado de  $\sim 100$  bp (h-mt-tRNA<sup>Arg</sup>) a partir de 10  $\mu$ g totales de ARN en la mezcla de ligación. Incrementos en las cantidades de ARN generaron especies de mayor peso molecular (concatémeros) de alrededor de 160 bp y 240 bp. Estos productos solo son generados en presencia de T4 RNA ligasa (Fig. 85 B). Las bandas fueron extraídas, reamplificadas (Fig. 85 C) y clonadas en el vector pGEM-T. En la Fig. 84 D se muestra la secuencia de 4 clones de  $\sim 100$  pb. La secuencia circular de 100 pb contenía la secuencia del tRNA<sup>Arg</sup> procesada y madurada correctamente.

En la Fig. 85 E, se observa la secuencia de un concatémoro de  $\sim 240$  pb que posee 3 moléculas circulares de tRNA<sup>Arg</sup>. Para este producto se detecta una base adicional después de la adición de CCA. Esta podría haber sido causada por un error de procesamiento del extremo 3' del gen de *ND3*, porque las últimas tres bases antes de la secuencia del tARN<sup>Arg</sup> son AAT.

En suma, los resultados de este ensayo preliminar nos indicaron que podíamos detectar específicamente la maduración del tARN<sup>Arg</sup> humano.

#### 4.4.2.3. Ensayos de conjugación a mitocondrias aisladas

El siguiente paso fue realizar los ensayos de conjugación entre bacterias y mitocondrias aisladas (ver metodología sección 3.4.4. Fig. 31). Brevemente, las bacterias que contenían los plásmidos movilizables con el tARN<sup>Arg</sup> humano (pDEL047 *-oriT* y pDEL048 *+oriT*) se mezclaron con mitocondrias aisladas de las células de ratón que contenían la T7RNAP en su matriz. La mezcla de conjugación fue colocada en bloques de agarosa de bajo punto. Una vez solidificado, el bloque fue sumergido en LB e incubado durante 5 horas y en agitación suave a 37°C. El ARN total procedente de la mezcla de mitocondrias y bacterias fue aislado, tratado con DNAsa y ligado con T4 ARN ligasa. El ARN circular se utilizó como molde para realizar la transcripción reversa específica utilizando el cebador P1, como se ha explicado más arriba. En la **Figura 86** se muestra los primeros resultados obtenidos.



**Figura 86.** Análisis del experimento de conjugación entre bacterias y mitocondrias aisladas. A) Amplificación específica del tARN<sup>Arg</sup>. B) Se muestra la secuencia circular del tARN<sup>Arg</sup> como referencia y debajo las secuencias obtenidas de las bandas de 100 pb. En cursiva se indica las secuencias adicionadas por los cebadores P1 y P2. En negrita se muestra la secuencia que no hibrida con el cebador CCA indica la maduración.

En este primer ensayo se detectaron las bandas de 100 pb y de 160 pb cuando la bacteria donadora contenía el plásmido pDEL048 (+*oriT*) y estaban ausentes en el plásmido pDEL047 (-*oriT*) (Fig. 85 A). Después de secuenciar nueve clones, las bandas correspondientes a 100 pb mostraron la secuencia del tARN<sup>Arg</sup> procesada correctamente y madurada. Sin embargo, los controles de RT-PCR -(C1) y PCR (-C2) mostraron también ambas bandas. Por lo tanto, aunque la amplificación específica solo en presencia del *oriT* es prometedora, no podemos concluir nada de estos ensayos. Es posible que las muestras hayan sido contaminadas con ARN proveniente de los anteriores ensayos, en donde se utilizaba ARN mitocondrial aislado de células humanas HeLa.

En dos experimentos posteriores, observamos solo para el plásmido con *oriT* (pDEL048) la banda de 100 pb y las bandas adicionales de concatémeros de mayor peso molecular, 160 y 240 pb. Sin embargo, la banda de 100 pares de bases fue observada también en el plásmido sin *oriT* (pDEL047) y en los controles negativos de RT-PCR y PCR. Después de secuenciarlas detectamos que todas contenían la secuencia del tARN<sup>Arg</sup> procesada incorrectamente y sin la adición de CCA. En la **Figura 87** se muestran 6 secuencias representativas de los clones que han sido analizados. Concluimos que teníamos una contaminación en la muestra.



existan niveles de transcripción basales pero suficientes para ser detectados por RT-PCR, aún en ausencia de T7RNAP. Por lo tanto, aún queda por determinar el sitio de producción de ARN (bacteria o mitocondria). Sin embargo, si la transcripción ocurriera dentro de la bacteria, deberíamos observar también las bandas de mayor peso molecular para el plásmido sin *oriT* (pDEL047). Por lo que, debemos extraer ARN desde bacterias donadoras y llevar a cabo los mismos ensayos de circularización para determinar el lugar de producción de ARN.

Hasta el momento creemos que el producto de 100 pb es generado por una contaminación de ARN. Tenemos la certeza de que el ARN es producido por los plásmidos movilizables y no por una fuente de contaminación externa, puesto que en la secuencia parcial de *ND3* hay un polimorfismo G en vez de A (se indica en cursiva en las secuencias de la Fig. 87 C, que nos sirve como marcador.

Estos ensayos de conjugación a mitocondrias serán continuados en el laboratorio del Dr. Schon en colaboración con nuestro grupo. Para los posteriores ensayos han sido construidos dos plásmidos iguales a pDEL047 (*-oriT*) y pDEL048 (*+oriT*) en los que se ha diseñado una mutación puntual para poder diferenciar el tARN<sup>Arg</sup> de cualquier otra fuente de contaminación.

Demostrar fehacientemente la existencia de transferencia de ADN entre bacterias y mitocondrias abriría múltiples líneas de investigación, tanto básicas como aplicadas. Sobre todo supondría una herramienta para el estudio de la expresión genética mitocondrial. La introducción de material genético a mitocondrias en forma estable y heredable permitiría el desarrollo de líneas celulares nuevas para el estudio de múltiples enfermedades en general neurodegenerativas que involucran mutaciones puntuales en diferentes genes mitocondriales, como por ejemplo en tARNs.

## **5. Recapitulación y perspectivas**



Los T4SS están ampliamente distribuidos entre bacterias y juegan roles biológicos muy diferentes a pesar de la gran homología que hay entre ellos (Álvarez-Martínez & Christie, 2009). Un ejemplo lo constituyen el sistema Trw de R388, implicado en la transferencia horizontal del plásmido, y el sistema Trw de *Bartonella*, necesario para la infección de eritrocitos, que comparten la misma organización genética en su región *trw* y una identidad de hasta el 80% a nivel de proteína. La diferencia principal entre ambos es la existencia de la T4CP en el T4SS conjugativo de R388. La T4CP TrwB representa la interfase molecular entre el sustrato y el T4SS.

Los estudios de estructura del *core complex* del T4SS (Fronzes *et al.*, 2009) (Chandran *et al.*, 2009) y de complejos VirB4-*core complex* (Wallden *et al.*, 2012) han demostrando que T4SS pertenecientes a diferentes sistemas mantienen una arquitectura común. No obstante, no todos presentan exactamente los mismos componentes por lo que las interacciones entre éstos pueden diferir de un sistema a otro así como el orden de ensamblaje.

Una cuestión que sigue sin resolver es hasta qué punto la T4CP es parte integral de los T4SS o funciona como un elemento independiente. Por ello, en este trabajo llevamos a cabo un estudio para determinar la integridad estructural del T4SS de R388 cuando alguna de las proteínas que lo forman está ausente. El razonamiento es que, en complejos multiproteicos, la ausencia de uno de los componentes impide el ensamblaje del resto y esto puede afectar a la estabilidad de las proteínas no ensambladas. El estudio se realizó detectando, por ensayos de Western blot, algunas de las proteínas Trw representativas de los distintos componentes del T4SS (sección 4.1, Fig. 33) y aquellas de la región *Dtr* de R388.

Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 18**. De la tabla se desprenden las siguientes conclusiones:

1. La proteína TrwC, la relaxasa conjugativa, presenta niveles similares en todos los mutantes *trw*, un resultado esperado al tratarse del sustrato del T4SS, que no juega ningún papel estructural.

2. En ausencia de TrwB se detectan todos los componentes del T4SS, sugiriendo un rol independiente en la estructura del T4SS. Esto sería lo esperado de tratarse de un tercer módulo funcional de la maquinaria conjugativa, como se ha propuesto (Llosa & de la Cruz, 2005).

**Tabla 18.** Resumen de los resultados de Western blots

Trw R388 T4SS	Trw <i>Bt</i> T4SS	Transferencia de ADN	Anti-C	Anti-B	Anti-D	Anti-K	Anti-J
Todos		+++	+++	+++	+++	+++	+++
- TrwB (VirD4)	-		+++	-	+	+++	+++
- TrwD (VirB11)	-	-	+++	+++	-	+++	-
- TrwD (VirB11)	+	+++	+++		-		+++
- TrwK (VirB4)	-	-	+++	+++	-	-	-
-TrwK (VirB4)	+	-	+++		+		-
- TrwE (VirB10)	-	-	+++	+++	+++	++++	-
- TrwE (VirB10)	+	+	+++		+++		+++
- TrwG (VirB8)	-		+++	+++	-	+	-
- TrwG (VirB8)	+	+	+++		-		+++
- TrwI (VirB6)	-	-	+++	+++	+	++	-
- TrwI (VirB6)	+	-	+++		+		-
- TrwF (VirB9)	-	-	+++	+++	-	+	-
- TrwF (VirB9)	+	+	+++		-		+++
- TrwH (VirB7)	-	+	+++	+++	++++	+++	-
- TrwH (VirB7)	+	++	+++		+++		+++
- TrwJ (VirB5)	-	-	+++	+++	+++	+++	-
- TrwJ (VirB5)	+	-	+++		+++		-

**Tabla 18.** Resumen de los ensayos de Western blot. En la primera columna se indican los mutantes *trw* de R388 y en la segunda columna se indica cuándo se ha complementado con el sistema *Trw* de *Bt* presente en el cósmido pAB2. En la tercer columna se muestra la transferencia de ADN de los mutantes de R388 solos o en presencia del cósmido pAB2 en células D1210 (de Paz *et al.*, 2005). El resto de las columnas muestran los resultados obtenidos con anticuerpos específicos para las diferentes proteínas representados como: niveles salvajes (+++); reducción leve (++); reducción fuerte (+); no detectado (-); niveles mayores al salvaje (++++).

3. TrwK, el componente más conservado de los T4SS, se vio afectado por la ausencia de los componentes del *core complex*. A su vez, la ausencia de TrwK afectaba a los niveles de otras proteínas *Trw*, lo que podría indicar que TrwK es uno de los primeros elementos ensamblados en el T4SS.

4. Los niveles de la ATPasa citoplasmática TrwD se vieron afectados por todos los mutantes *trw*, salvo el componente del *pilus*.

5. La proteína minoritaria del *pilus*, TrwJ no pudo detectarse en ausencia de cualquier otro componente del T4SS. Esto sugiere que TrwJ se ensambla una vez

que se haya formado el resto del T4SS. Hay que destacar que la ausencia de TrwB no alteró los niveles de TrwJ.

Estos resultados apuntan a un orden de ensamblaje del T4SS de R388 similar al propuesto para otros sistemas, [K-core]-TrwB/TrwD>pilus. Es posible que exista un dinamismo entre las ATPasas citoplasmáticas y el *core complex* que permita ensamblajes alternativos dependiendo o no de la presencia del sustrato (Resultados y discusión, sección 4.1, Fig.39).

En los casos en que se observó un efecto en los niveles de la proteína, estudiamos también la capacidad de la proteína homóloga del sistema Trw de *Bt* de contrarrestar ese efecto por complementación estructural. Los resultados obtenidos (también representados en la Tabla 18) se correlacionaban bien con los datos de complementación funcional determinados previamente (de Paz *et al.*, 2005).

Este trabajo sugiere que TrwB representa un módulo funcional independiente estructuralmente del T4SS. Sin embargo, sabemos que su actividad como proteína acopladora requiere de una serie de interacciones proteína-proteína con componentes del T4SS y con el relaxosoma (Llosa *et al.*, 2003). Las interacciones que establece TrwB con el T4SS son flexibles y menos específicas que las que tienen lugar en el lado citoplasmático, permitiendo que una misma T4CP utilice distintos T4SS conjugativos (Llosa *et al.*, 2003). Nuestro segundo objetivo en el estudio de TrwB fue determinar los residuos que juegan un papel relevante en el reconocimiento y translocación del sustrato conjugativo desde el citoplasma. Pensamos que, si conocemos en detalle estas interacciones, podremos en un futuro manipular la especificidad de las proteínas acopladoras para enviar sustratos a través de diferentes sistemas conjugativos, lo cual sería una excelente herramienta biotecnológica.

Hemos determinado que TrwB es producida en grandes cantidades dentro de la célula, lo cual probablemente hacía difícil observar fenotipos de mutantes de TrwB que tuvieran efectos leves en su actividad. Hemos optimizado unas condiciones de conjugación que denominamos "Sistema limitante de TrwB" (de Paz *et al.*, 2010), en las cuales la frecuencia de conjugación es proporcional a la cantidad de TrwB en la célula.

Este sistema se utilizó para ensayar una colección de mutantes de TrwB del dominio citoplasmático diseñada en base a la estructura tridimensional de

TrwB $\Delta$ N70 (Gomis-Rüth *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos determinaron que residuos ubicados en el ICH del hexámero de TrwB afectaban tanto a la transferencia de ADN como a la translocación de la proteína TrwC sin ADN (de Paz *et al.*, 2010).

Por ello, decidimos estudiar en profundidad los mutantes del ICH. La **Figura 88** resume los resultados obtenidos, tanto *in vivo* por ensayos de conjugación y translocación de TrwC, como *in vitro* utilizando los derivados solubles purificados.

Los resultados de los ensayos *in vivo* resaltaron el papel de las lisinas K275, K398 y K421 en la transferencia del sustrato TrwC-ADN. Mientras que el mutante en K275, localizada en la entrada citoplasmática al ICH, presentaba frecuencias más bajas, los mutantes en las lisinas situadas en el interior del propio ICH mostraron frecuencias conjugativas superiores en 1 log respecto de la proteína salvaje.

La aparición de mutaciones espontáneas durante la construcción de los mutantes en estas lisinas fue muy llamativa, puesto que aparecían con una frecuencia mayor a la esperada. Esto podría reflejar un efecto tóxico de dichas mutaciones. De hecho, en los ensayos *in vivo* los dobles mutantes K398A R417S y K421A D425A mostraron fenotipos intermedios respecto de los mutantes simples, indicando que podrían haberse seleccionado las mutaciones espontáneas que tuviesen un efecto compensatorio. También fue interesante el triple mutante aislado durante la construcción de TrwB K275A, que incluía la mutación S441G en la parte del ICH que se interna en el TMD, y que también afecta a la transferencia de ADN.

Utilizando una cepa D1210 (*lacI<sup>q</sup>*) y expresando TrwB desde el promotor lactosa se logró optimizar el sistema triparental para ensayar la translocación de TrwC en ausencia de ADN (Resultados y discusión sección 4.2.). Bajo estas nuevas condiciones, observamos una correlación entre la transferencia de ADN y la translocación de TrwC. De esta forma, los mutantes K398A y K421A, que mostraban mayores frecuencias conjugativas, fueron los que mostraban las mayores frecuencias de translocación de TrwC sin transferencia de ADN. Cabe destacar que la mutación espontánea S441G -encontrada durante la construcción del mutante K275A, localizada próxima a la membrana, abolía por completo la transferencia de TrwC en las condiciones ensayadas.

Mutantes de TrwB <sup>1</sup>	Ensayos de conjugación <sup>2</sup>			Actividad ATPasa <sup>3</sup> (nmol ATP hidrolizados/min.mg P)						
	Sustrato	ADN	ADN	TrwC	Basal	Basal	dsDNA	ssDNA	dsDNA	ssDNA
TrwA	+	-	+		-	+	-	-	+	+
Salvaje	+++	-	+++		-	+++	+++	+++	+++	+++
N271D	++	-	+		nd	nd	nd	nd	nd	nd
K275A	++	-	++		-	+	+	+	++	++
K398A	++++	+++	++++		+++	+++	>>	>>	++++	+++
K421A	++++	+	++++		+	+++	++++	++++	++++	+++
P237L K275A S441G	+	nd	-		nd	nd	nd	nd	nd	nd
S441G	++	-	-		nd	nd	nd	nd	nd	nd
K275A K398A	+++	++	+++		+	+++	++++	++++	+++	+++
K421A D425A	++	-	+		+	+	++	++	++	++
K398A R417S	+++	-	+++		nd	nd	nd	nd	nd	nd

**Figura 88.** Izquierda, representación en cintas de la estructura de TrwB, en base a la estructura de TrwB $\Delta$ N70 y el modelado del TMD (Gomis R  th *et al.*, 2001). Se muestran dos monómeros enfrentados del hexámero de TrwB. Los residuos mutados son señalados en código de color: las mutaciones puntuales se indican en rojo. Las mutaciones espontáneas se indican en verde. La tabla de la derecha resume los ensayos realizados en el capítulo 4, sección 4.2. <sup>1</sup> Mutantes en el ICH. <sup>2</sup> Frecuencias de los ensayos *in vivo*. Las frecuencias de transferencia de ADN en presencia de TrwA (+TrwA) se indican como:  $< 1 \times 10^{-06}$  (-);  $1 \times 10^{-04}$  (+);  $1 \times 10^{-03} - 1 \times 10^{-02}$  (++) ;  $1 \times 10^{-01}$  (+++) ; 1 (++++). Frecuencias de transferencia de ADN en ausencia de TrwA (-TrwA):  $< 1 \times 10^{-06}$  (-);  $1 \times 10^{-06}$  (+);  $1 \times 10^{-05}$  (++) ;  $1 \times 10^{-04}$  (+++). Frecuencias de translocación de TrwC:  $< 1 \times 10^{-06}$  (-);  $1 \times 10^{-06}$  (+);  $1 \times 10^{-05}$  (++) ;  $1 \times 10^{-04}$  (+++). <sup>3</sup> Ensayos de actividad ATPasa para TrwB $\Delta$ N70 y derivados mutantes: -;+;++; +++; ++++ incrementos significativos; >> representa valores superiores a 10 veces la proteína salvaje.

Sabemos por estudios previos que la translocación de la relaxasa TrwC requiere TrwB, incluso en ausencia de transferencia de ADN (Draper *et al.*, 2005). Del análisis de la colección de mutantes de TrwB esperábamos haber aislado alguno que tuviese un papel específico en la transferencia de ADN, lo que habría servido de confirmación del modelo del "shoot and pump" (Llosa *et al.*, 2002), que propone que, tras la translocación de TrwC, la actividad ATPasa de la T4CP bombearía el resto de la molécula de ADN. Sin embargo, los datos obtenidos a través del estudio *in vivo* nos han indicado que los mismos residuos que est  n involucrados en la transferencia del complejo TrwC-ADN, también parecen estarlo en la translocación de TrwC sin ADN. La capacidad ATPasa de TrwB afecta al transporte de TrwC de la

misma manera que a la transferencia de ADN. Por todo esto, creemos que las mismas regiones de TrwB involucradas en la translocación de ADN también están implicadas en la translocación de la relaxasa TrwC. En este sentido, conviene resaltar que la translocación de la relaxasa TraI de F requiere de la T4CP TraD y es necesaria la oligomerización, actividad ATPasa, y el C-terminal que media la interacción con el relaxosoma, al igual que para la transferencia de ADN (Lang & Zechner, 2012).

La T4CP TrwB, por su localización en la interfase entre el citoplasma y el T4SS, y su papel en el reconocimiento y translocación del sustrato, debe llevar a cabo una serie de actividades como interactuar con el T4SS y con el relaxosoma, e hidrolizar ATP. Para estudiar el efecto de las mutaciones de TrwB en esas actividades separadamente, se llevaron a cabo una serie de ensayos *in vitro* usando proteínas purificadas derivadas del dominio soluble de TrwB (TrwB $\Delta$ N70).

Estos ensayos mostraron que los mutantes del ICH no tienen afectada la interacción con la proteína accesoria TrwA y tampoco modifican la capacidad de unión inespecífica a ADN de cadena doble. Estos resultados podrían tener sentido considerando que ni TrwA (Draper et al, 2005), ni presumiblemente el ADN bicatenario, serían translocados a través del T4SS. Hay que hacer notar, de todos modos, que un ensayo de retardo de ADN inespecífico puede no tener la sensibilidad suficiente para detectar efectos sutiles de una mutación puntual. Quizás el análisis de estos mutantes en condiciones experimentales más específicas, como los recientemente descritos para la unión de TrwB a ADN con estructura G-cuádruplex (Matilla *et al.*, 2011), mostraran algún efecto.

Sin embargo, los ensayos de actividad ATPasa sí que mostraron efectos significativos de los mutantes. Estos ensayos nos han permitido establecer una correlación directa entre las frecuencias de transferencia de ADN y/o de translocación de TrwC con la capacidad de las proteínas de hidrolizar ATP. Así, los mutantes que presentaban mayores eficiencias en los ensayos *in vivo*, mostraron mayores valores absolutos de actividad ATPasa y viceversa.

La posibilidad de ensayar la actividad ATPasa en presencia de distintos inductores (TrwA y/o ADN, de cadena doble o sencilla), nos ha permitido delimitar el efecto de las distintas mutaciones en la actividad ATPasa de TrwB. Una observación interesante es que la mayoría de los mutantes tienen un efecto más atenuado en presencia de TrwA y ADN, es decir, en las condiciones más similares a

las de conjugación. Esto explicaría que estas mutaciones no se comportaran como deficientes en conjugación en un primer ensayo, a pesar de tener actividades ATPasa muy distintas de la de la proteína TrwB en ausencia de TrwA y/o DNA (ver, por ejemplo, la mutación K275A). También es destacable de estos ensayos que la mutación K398A, que parece tener desregulada su actividad ATPasa, no responde a la presencia de TrwA como la proteína salvaje, dato que también se refleja *in vivo* en las conjugaciones en ausencia de TrwA (Fig. 88). Estos datos sugieren que TrwA tiene un rol regulador de la actividad ATPasa de TrwB por interacción con los residuos del ICH.

A pesar de que los datos obtenidos en este trabajo no apoyan el modelo “*shoot and pump*” de conjugación bacteriana, tampoco lo descartan. Otros motores moleculares relacionados estructuralmente con TrwB utilizan residuos cargados positivamente en su canal interno para la translocación de ácidos nucleicos (Mancini *et al.*, 2004). El hecho de que no hayamos observado un efecto exclusivo en la transferencia de ADN implica que estos residuos deben tener también un papel en la translocación del sustrato proteico, pero no descartan que también participen en el bombeo de ADN.

En suma, los resultados de esta parte del trabajo sugieren que la superficie del ICH de TrwB esté involucrada en la transferencia del complejo TrwC-ADN y TrwC sin ADN. De confirmarse las interacciones específicas con el sustrato, se establecerían las bases para la manipulación de las T4CP en cuanto al reconocimiento del sustrato y/o su translocación. Nuestro objetivo es continuar por esa vía.

El estudio de los determinantes moleculares de reconocimiento por el T4SS también abarcó aquellos localizados en la relaxasa TrwC, la proteína que pilota el ADN durante la conjugación, sustrato proteico del T4SS. Estudiamos la señal de translocación (TS) de TrwC utilizando el ensayo de CRAFT de forma análoga a los ensayos realizados con TraI de los plásmidos R1 y F (TraI<sub>R1/F</sub>) (Lang *et al.*, 2010). Se fusionaron a la recombinasa Cre diversos derivados de TrwC (fragmentos o mutantes), y su translocación a la célula receptora se infirió por la actividad de Cre en la misma (Resultados y discusión, sección 4.3). Los resultados (**Tabla 19**) demuestran la existencia de una TS en TrwC, localizada entre los aa 705-895, dentro del módulo conservado RecD/TS definido por Lang y cols, (2010). Dentro de esta región, la secuencia que hemos denominado TS1 (GDTIRIT, aa 796-802),

seleccionada por su alineamiento con TraI, parece ser de especial relevancia para la translocación de la proteína.

**Tabla. 19** Resumen de los datos obtenidos en ensayos de CRAFT para la delimitación y determinación de la TS de TrwC.

Fusiones Cre-TrwC	Frecuencias de Translocación <sup>1</sup>
Cre	-
TrwC <sub>2-966</sub>	+++
Cre-TrwC <sub>2-600</sub>	++
Cre-TrwC <sub>600-966</sub>	+++
Cre-TrwC <sub>705-895</sub>	++
Cre-TrwC <sub>897-966</sub>	+
Cre-TrwC <sub>920-966</sub>	-
Cre-TrwC_TS1	++
Cre-TrwC_TS2	+++
Cre-TrwC_TS1*-TS2	++
Cre-TrwC_TS1 <sup>^</sup> -TS2	++

**Tabla 19.** Resultados de los ensayos de CRAFT realizados utilizando el derivado de R388 (pSU2007) para proveer la maquinaria conjugativa. <sup>1</sup> Las frecuencias de translocación se representan como recombinantes/donador. Los valores  $< 1 \times 10^{-07}$  se indican como (-);  $1 \times 10^{-06}$  (+);  $1 \times 10^{-05}$  (++);  $1 \times 10^{-04}$  (+++). TS1 (AGGAIRIT) y TS2 (GDQMQV): mutantes en las TS definidas en este trabajo. Los símbolos \* y ^ indican las dos versiones del doble mutante TS1+TS2 en la TS1, AGGAIRIT o VGGAIRIT, respectivamente.

La TS de TrwC no se localiza en la región C-terminal como ocurre en las TS de los efectores de diferentes T4SS (Álvarez-Martínez & Christie, 2009), sino que está localizada en el interior de la proteína, como en el caso de las relaxasas conjugativas MobA de R1162 y TraI<sub>R1/F</sub> (Introducción, sección 1.2.4).

La continuación de este trabajo por parte de otros miembros del grupo ha mostrado que la TS definida para TrwC que media la transferencia de ADN por su propio T4SS durante la conjugación, no tiene implicación en la transferencia de un derivado de R388 dentro de células humanas a través del T4SS VirB/D4 de *Bh*. Esta característica sería compartida por la relaxasa conjugativa MobA de R1162 y de RSF1010 (plásmidos idénticos en secuencia). MobA de RSF1010 es reconocida por

el T4SS de *At* a través de su extremo C-terminal (Vergunst *et al.*, 2005), mientras que MobA de R1162 presenta dos TS internas, responsables de su translocación por el T4SS del plásmido conjugativo R751 (Parker & Meyer, 2007). Aún está por determinar cuál es la TS de TrwC responsable de su reconocimiento por el T4SS de *Bh*. A diferencia de MobA, que contiene en su extremo C-terminal características similares a las de los efectores naturales de dicho T4SS, TrwC no contiene ningún dominio BID, que es la señal necesaria para el reclutamiento por el T4SS VirB/D4 de *Bh* (Schulein *et al.*, 2005). Resulta sorprendente que proteínas como las relaxasas, cuyo fin biológico sea la transferencia de ADN entre bacterias, posean secuencias que actúen como TS para su reclutamiento eficiente por T4SS implicados en virulencia. Quizás no se trate de una casualidad, y refleje la existencia de un trasiego de ADN entre bacterias y células eucariotas en la naturaleza.

El reclutamiento de la relaxasa para su translocación por el T4SS podría ocurrir por interacciones proteína-proteína con la T4CP, o por otro componente del T4SS. En R388 la translocación de TrwC depende de la presencia de TrwB (Draper *et al.*, 2005). Los resultados de la sección 4.2 de esta tesis nos demuestran que la translocación de TrwC es dependiente también de la cantidad, de la actividad ATPasa y del ICH de TrwB. Todos estos datos apoyan que el reconocimiento específico citoplasmático sea llevado a cabo mediante la interacción TrwB-TrwC. En este momento estamos diseñando ensayos genéticos que nos permitan abordar el estudio directo de esta posible interacción. En primer lugar pensamos utilizar el ensayo CRAFT para ensayar la translocación de TrwC y sus fragmentos con la colección de mutantes de TrwB.

La actividad ATPasa de TrwB es necesaria para la translocación de TrwC. Estudios previos habían determinado que dicha actividad no era estimulada *in vitro* por el fragmento de TrwC N293, que contiene la actividad relaxasa (Tato *et al.*, 2007). En este trabajo determinamos que la TS está incluida en el segmento TrwC<sub>796-802</sub> y, por tanto, ausente en el mutante ensayado por Tato y cols, (2007). La propia TrwC tiene actividad ATPasa (Grandoso *et al.*, 1994), lo que impide ensayarla conjuntamente con TrwB. Sin embargo, sería interesante realizar ensayos de actividad ATPasa de TrwB en presencia del fragmento 796-802 de TrwC. Un resultado positivo sería indicativo de una interacción TrwB-TrwC que al señalar el reclutamiento del sustrato estimularía la actividad ATPasa de TrwB para iniciar la translocación del mismo.

El conocimiento de las interacciones específicas entre TrwB y TrwC nos abriría un abanico de posibilidades para el estudio del reclutamiento del sustrato a ser transferido. Se podrían intercambiar TS de relaxasas y efectores de T4SS para desarrollar nuevas herramientas que permitieran la introducción de proteínas a diferentes tipos celulares. En este sentido pensamos continuar con el estudio de las TS de la relaxasa TraI de pKM101, mediante la construcción de proteínas híbridas. Es, decir cambiaremos la TS de TrwC por la de TraI de pKM101, y ensayaremos la eficacia del reclutamiento por las T4CP y los T4SS de ambos sistemas.

Finalmente creemos que sería de gran valor obtener la estructura cristalina del módulo conservado RecD/TS de TrwC<sub>705-895</sub> en el que definimos la TS de TrwC. Esta estructura nos permitiría diseñar una colección de mutantes puntuales para definir residuos involucrados en la interacción con TrwB. En breve, el grupo de la Dra. Zechner tiene previsto dar a conocer la estructura 3D de la TS de TraI<sub>F</sub> lo que esclarecerá aspectos de la posible interacción del sustrato-con la T4CP.

Todo el trabajo anterior se centró en la interfase entre el sustrato y el T4SS. Como se comentó en un principio, la versatilidad de los T4SS también está basada en la flexibilidad de la interfase T4SS-célula receptora. No se conoce nada o casi nada de los determinantes moleculares de esta interfase. Como último objetivo de esta tesis, nos planteamos estudiar el potencial de esta versatilidad en el destino del sustrato translocado, llevando a cabo ensayos de conjugación entre diferentes reinos.

Por una parte, utilizando la capacidad de las bacterias de transferir ADN por conjugación a levaduras, intentamos determinar si este proceso podría utilizarse para transferir moléculas de gran longitud conteniendo genes eucariotas completos. Introducir por conjugación esas moléculas de gran tamaño demostraría que el proceso conjugativo es también procesivo, aún cuando la célula receptora es otra que una bacteria. Por ello hemos construido BACs conjugativos que codificaban secuencias humanas. Estas moléculas podían ser transferidas por conjugación entre bacterias, pero a una frecuencia sumamente baja. Consecuentemente, no hemos detectado conjugación a células de levadura. Para continuar con este objetivo, sería necesario en primer lugar determinar las causas de la baja frecuencia de transferencia de los BACs entre bacterias.

La introducción de ADN por conjugación a mitocondrias, fue el objetivo más ambicioso de este trabajo. Decidimos abordar este objetivo conscientes de su

dificultad, pero animados por el gran potencial de poner a punto una nueva herramienta que sería útil para el estudio genético de las mitocondrias, e incluso como terapia de enfermedades de origen mitocondrial. En colaboración con el grupo del Dr. Eric Schon, hemos adaptado el ensayo de transferencia de ADN a mitocondrias aisladas publicado por Yoon & Koob (2005), con idea de reproducirlo más adelante *in vivo*. Aunque de momento no contamos con resultados certeros, este trabajo se continuará en el laboratorio del Dr Eric Schon. Se volverá a intentar la conjugación con nuevos plásmidos que llevan mutaciones puntuales, lo que nos permitirá distinguir posibles fuentes de contaminación detectadas en estos primeros experimentos. También estamos planeando detectar la conjugación con otros métodos como por ejemplo sondas radioactivas que hibriden específicamente en el plásmido movilizado y por citometría de flujo, entre otras posibilidades.

Si somos capaces de introducir ADN dentro de mitocondrias por conjugación, las posibilidades son enormes. Podremos, posteriormente, modificar las secuencias codificadas bajo el control del promotor T7. De esta forma podremos determinar si hay alguna restricción de tamaño en el ADN transferido por conjugación entre bacterias y mitocondrias. Además, sería posible determinar si las proteínas mitocondriales son capaces de replicar la hebra complementaria de ADN transferida y si el plásmido puede ser mantenido y transmitido de una generación a la otra. En este sentido sería también interesante añadir un origen de replicación mitocondrial al plásmido movilizable para que, en el caso de que el ADN sea circularizado y replicado, posteriormente sea duplicado y mantenido autónomamente.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo han contribuido al entendimiento de aspectos claves de las proteínas acopladoras; su relación con el T4SS y con los componentes del relaxosoma. Resaltamos la independencia estructural de TrwB sobre el T4SS y destacamos la participación de las lisinas que protruyen el canal interno de TrwB durante la translocación de TrwC-ADN. Además hemos determinado la TS de TrwC requerida para la translocación a través de su propio T4SS.

Todos los conocimientos adquiridos a lo largo de este trabajo abrirán las puertas a otros estudios que nos permitan una mayor comprensión de las interacciones T4CP-relaxasas. Estos datos además constituyen la base para la manipulación de la especificidad de las proteínas acopladoras e intercambio de sustratos a través de diferentes T4SS. De hecho, nuestro grupo ya ha conseguido

transferir ADN a células humanas específicas utilizando un sistema híbrido compuesto de elementos de la maquinaria de R388 y el T4SS de *Bh* (Fernández-González *et al.*, 2011). Trabajo en curso en nuestro grupo intenta ahora determinar si es posible utilizar T4SS de otras bacterias patógenas para enviar DNA o proteínas a sus células target. El objetivo a largo plazo sería poder elegir el T4SS adecuado para dirigirse a un tipo celular concreto, y el sustrato a transferir adicionando la TS adecuada en cada caso.

La utilización del sistema conjugativo de R388 tiene una ventaja adicional: la proteína piloto TrwC tiene actividad integrasa sitio-específica en la célula receptora (Draper *et al.*, 2005), siendo capaz de integrar el ADN que lleva unido covalentemente en secuencias específicas de la célula receptora. Varias secuencias encontradas en el genoma humano que presentan una gran homología a la secuencia *nic* donde actúa TrwC, pueden servir como dianas de integración (Agúndez *et al.*, 2012). A largo plazo, podría pensarse en desarrollar una herramienta de transferencia e integración sitio-específica en el genoma humano de ADN de cualquier origen y longitud. Esta sería una herramienta de gran valor en el campo de la terapia génica. Finalmente, la utilización de TrwC como herramienta para la modificación de genomas eucariotas podría hacerse extensible a la manipulación de genomas mitocondriales. Si somos capaces de introducir por conjugación ADN a mitocondrias, sería interesante estudiar la actividad integrasa de TrwC en este organelo.

## **6. Conclusiones**



1. La cantidad de TrwB presente en la célula es independiente de la presencia del T4SS de R388, sugiriendo una independencia estructural que apoya su rol como un tercer módulo funcional de la maquinaria conjugativa.

2. La ausencia de TrwK afecta a los niveles de otras proteínas Trw, y su estabilidad está afectada a su vez por la ausencia de los componentes del *core complex* de R388.

3. Los niveles de TrwD se ven afectados por la ausencia de los componentes del T4SS de R388, a excepción del componente del *pilus* TrwJ. La ausencia de TrwH produce una acumulación de la proteína.

4. TrwJ, componente del *pilus*, es indetectable en ausencia de cualquier otro componente del T4SS, pero en ausencia de TrwB los niveles de TrwJ no varían.

5. Cuando se detectó una disminución de proteína, la complementación de la proteína Trw ausente con el sistema Trw de *Bartonella tribocorum* (*Bt*) restableció los niveles de TrwJ en todos los casos, mientras que los niveles de TrwD solo se restablecieron para el mutante en *trwK* (*virB4*).

6. Se estima que hay 3.350 monómeros de TrwB por célula conteniendo R388, una cantidad muy superior a la determinada para la T4CP del sistema conjugativo de RP4.

7. La translocación de TrwC requiere la actividad ATPasa de TrwB incluso en ausencia de transferencia de ADN.

8. Se ha analizado una colección de mutantes puntuales de TrwB, y todos los que afectaban a la transferencia de ADN afectaban igualmente a la translocación de TrwC sola.

9. El fenotipo de los mutantes K275A, K398A y K421A, localizados en el canal interno del hexámero de TrwB, resalta la importancia de esta región de TrwB. Mientras que K275A tiene un efecto negativo en las frecuencias de conjugación/translocación de TrwC, las mutaciones K398A y K421A muestran frecuencias superiores a la de la proteína salvaje.

10. Derivados de TrwB $\Delta$ N70 con las citadas mutaciones no modificaron la capacidad de unión inespecífica a ADN superenrollado, ni la interacción con la proteína TrwA-h.

11. Existe una correlación entre las frecuencias conjugativas y/o de translocación de TrwC con los valores de actividad ATPasa en presencia de TrwA y ADN, tanto para TrwBΔN70 como para los mutantes en el ICH.

12. En ausencia de TrwA, solo se detecta transferencia de ADN con los mutantes K421A y especialmente K398A, lo que se correlaciona con altísima actividad ATPasa en esas condiciones.

13. El segmento de TrwC entre los aa 705-895 tiene la capacidad de translocarse a la célula receptora a través del T4SS, por lo que presumiblemente contiene la señal de translocación. .

14. El extremo C-terminal de TrwC no contiene ninguna señal de translocación.

15. La mutación de la secuencia conservada GDTIRIT (796-802 de TrwC) afectó significativamente a la frecuencia de translocación.

16. El sistema conjugativo de R388 no es capaz de transferir ADN a células de levaduras en las mismas condiciones de ensayo en que el sistema de RP4 sí lo hace.

## **7. Bibliografía**



- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter & J. E. Walker, (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.
- Aguilar, J., J. Zupan, T. A. Cameron & P. C. Zambryski, (2010) Agrobacterium type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 3758-3763.
- Agúndez, L., (2011) TrwC, una relaxasa conjugativa con actividad de integrasa sitio-específica: Caracterización de la reacción y potencial biotecnológico. In: Departamento de Biología Molecular. Santander: Universidad de Cantabria, pp.
- Agúndez, L., C. Machón, C. E. César, M. Rosa-Garrido, M. D. Delgado & M. Llosa, (2011) Nuclear targeting of a bacterial integrase that mediates site-specific recombination between bacterial and human target sequences. *Appl Environ Microbiol* **77**: 201-210.
- Agúndez, L., C. González-Prieto, C. Machón & M. Llosa, (2012) Site-specific integration of foreign DNA into minimal bacterial and human target sequences mediated by a conjugative relaxase. *PLoS One* **7**: e31047.
- Ahnert, P., K. M. Picha & S. S. Patel, (2000) A ring-opening mechanism for DNA binding in the central channel of the T7 helicase-primase protein. *EMBO J* **19**: 3418-3427.
- Allen, H. K., J. Donato, H. H. Wang, K. A. Cloud-Hansen, J. Davies & J. Handelsman, (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* **8**: 251-259.
- Álvarez-Martínez, C. E. & P. J. Christie, (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808.
- Aly, K. A. & C. Baron, (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**: 3766-3775.
- Ammelburg, M., T. Frickey & A. N. Lupas, (2006) Classification of AAA+ proteins. *J Struct Biol* **156**: 2-11.
- Arechaga, I., A. Pena, S. Zunzunegui, M. del Carmen Fernandez-Alonso, G. Rivas & F. de la Cruz, (2008) ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system. *J Bacteriol* **190**: 5472-5479.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp & T. Schwede, (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201.
- Atmakuri, K., E. Cascales & P. J. Christie, (2004) Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* **54**: 1199-1211.
- Atmakuri, K., Z. Ding & P. J. Christie, (2003) VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **49**: 1699-1713.
- Aussel, L., F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak & D. Sherratt, (2002) FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195-205.
- Backert, S. & T. F. Meyer, (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**: 207-217.
- Balzer, D., W. Pansegrau & E. Lanka, (1994) Essential motifs of relaxase (TraI) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4. *J Bacteriol* **176**: 4285-4295.

- Banta, L. M., J. E. Kerr, E. Cascales, M. E. Giuliano, M. E. Bailey, C. McKay, V. Chandran, G. Waksman & P. J. Christie, (2011) An *Agrobacterium* VirB10 mutation conferring a type IV secretion system gating defect. *J Bacteriol* **193**: 2566-2574.
- Bates, S., A. M. Cashmore & B. M. Wilkins, (1998) IncP plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the tra2 mating system. *J Bacteriol* **180**: 6538-6543.
- Bath, J., L. J. Wu, J. Errington & J. C. Wang, (2000) Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum. *Science* **290**: 995-997.
- Begg, K. J., S. J. Dewar & W. D. Donachie, (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* **177**: 6211-6222.
- Beranek, A., M. Zettl, K. Lorenzoni, A. Schauer, M. Manhart & G. Koraimann, (2004) Thirty-eight C-terminal amino acids of the coupling protein TraD of the F-like conjugative resistance plasmid R1 are required and sufficient to confer binding to the substrate selector protein TraM. *J Bacteriol* **186**: 6999-7006.
- Berger, B. R. & P. J. Christie, (1993) The *Agrobacterium tumefaciens* *virB4* gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J Bacteriol* **175**: 1723-1734.
- Bevan, M., (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**: 8711-8721.
- Bolland, S., M. Llosa, P. Avila & F. de la Cruz, (1990) General organization of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids. *J Bacteriol* **172**: 5795-5802.
- Bolland, S., (1991) Genes implicados en la producción del pilus conjugativo de R388. In: Ph.D. Thesis. Santander: Universidad de Cantabria, pp. 187.
- Boyer, P. D., (1993) The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* **1140**: 215-250.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Buchanan-Wollaston, V., J. E. Passiatore & F. Cannon, (1987) The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. *Nature* **328**: 172-175.
- Bundock, P., A. den Dulk-Ras, A. Beijersbergen & P. J. Hooykaas, (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **14**: 3206-3214.
- Burns, D. L., (2003) Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**: 29-34.
- Cabezón, E., J. I. Sastre & F. de la Cruz, (1997) Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet* **254**: 400-406.
- Cabezón, E. & F. de la Cruz, (2006) TrwB: an F(1)-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Res Microbiol* **157**: 299-305.
- Cabezón, E., V. F. Lanza & I. Arechaga, (2012) Membrane-associated nanomotors for macromolecular transport. *Curr Opin Biotechnol* **23**: 537-544
- Cambronne, E. D. & C. R. Roy, (2007) The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog* **3**: e188.

- Campbell, J. L., C. C. Richardson & F. W. Studier, (1978) Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 2276-2280.
- Cascales, E. & P. J. Christie, (2004a) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**: 1170-1173.
- Cascales, E. & P. J. Christie, (2004b) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17228-17233.
- César, C. E., C. Machón, F. de la Cruz & M. Llosa, (2006) A new domain of conjugative relaxase TrwC responsible for efficient oriT-specific recombination on minimal target sequences. *Mol Microbiol* **62**: 984-996.
- Chandran, V., R. Fronzes, S. Duquerroy, N. Cronin, J. Navaza & G. Waksman, (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* **462**: 1011-1015.
- Chen, Y., X. Zhang, D. Manias, H. J. Yeo, G. M. Dunny & P. J. Christie, (2008) *Enterococcus faecalis* PcfC, a Spatially-Localized Substrate Receptor for Type IV Secretion of the pCF10 Transfer Intermediate. *J Bacteriol* **190**:3632-45
- Christie, P. J. & J. P. Vogel, (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**: 354-360.
- Christie, P. J., (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* **40**: 294-305.
- Chung, C. T. & R. H. Miller, (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 3580.
- Couturier, M., F. Bex, P. L. Bergquist & W. K. Maas, (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* **52**: 375-395.
- de Groot, M. J., P. Bundock, P. J. Hooykaas & A. G. Beijersbergen, (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **16**: 839-842.
- de Jong, M. F., Y. H. Sun, A. B. den Hartigh, J. M. van Dijl & R. M. Tsolis, (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **70**: 1378-1396.
- de la Cruz, F. & J. Davies, (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* **8**: 128-133.
- de la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer & E. L. Zechner, (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 18-40.
- de la Cruz, F. & E. Lanka, (1998) Function of the Ti plasmid Vir proteins: T complex formation and transfer to the plant cell, p. 282-301. Hingman, MA: Kluwer Academic Publishers.
- de la Cruz, F. & J. Grinsted, (1982) Genetic and molecular characterization of Tn21, a multiple resistance transposon from R100.1. *J Bacteriol* **151**: 222-228.
- de Lorenzo, V. & K. N. Timmis, (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
- de Paz, H. D., F. J. Sangari, S. Bolland, J. M. Garcia-Lobo, C. Dehio, F. de la Cruz & M. Llosa, (2005) Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151**: 3505-3516.
- de Paz, H. D., (2010) Estudio comparativo de sistemas de secreción tipo IV implicados en transferencia conjugativa de DNA y virulencia bacteriana. In: Departamento de Biología Molecular. Santander: Universidad de Cantabria, pp.

- de Paz, H. D., D. Larrea, S. Zunzunegui, C. Dehio, F. de la Cruz & M. Llosa, (2010) Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. *J Bacteriol* **192**: 2655-2669.
- Dehio, C., (2004) Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **58**: 365-390.
- Ding, H. & M. F. Hynes, (2009) Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can J Microbiol* **55**: 917-927.
- Ding, Z., K. Atmakuri & P. J. Christie, (2003) The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol* **11**: 527-535.
- Disque-Kochem, C. & B. Dreiseikelmann, (1997) The cytoplasmic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD in vitro. *J Bacteriol* **179**: 6133-6137.
- Dower, W. J., J. F. Miller & C. W. Ragsdale, (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Draper, O., C. E. César, C. Machón, F. de la Cruz & M. Llosa, (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16385-16390.
- Egelman, E. H., (2001) Bacterial conjugation: running rings around DNA. *Curr Biol* **11**: R103-105.
- Egelman, E. H., X. Yu, R. Wild, M. M. Hingorani & S. S. Patel, (1995) Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3869-3873.
- Enemark, E. J. & L. Joshua-Tor, (2006) Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* **442**: 270-275.
- Erzberger, J. P. & J. M. Berger, (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 93-114.
- Ferguson, G. C., J. A. Heinemann & M. A. Kennedy, (2002) Gene transfer between *Salmonella enterica* serovar Typhimurium inside epithelial cells. *J Bacteriol* **184**: 2235-2242.
- Fernández-González, E., H. D. de Paz, A. Alperi, L. Agúndez, M. Faustmann, F. J. Sangari, C. Dehio & M. Llosa, (2011) Transfer of R388 Derivatives by a Pathogenesis-Associated Type IV Secretion System into both Bacteria and Human Cells. *J Bacteriol* **193**: 6257-6265.
- Fernandez-Lopez, R., M. P. Garcillan-Barcia, C. Revilla, M. Lazaro, L. Vielva & F. de la Cruz, (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942-966.
- Fernández, D., T. A. Dang, G. M. Spudich, X. R. Zhou, B. R. Berger & P. J. Christie, (1996b) The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J Bacteriol* **178**: 3156-3167.
- Fernández, D., G. M. Spudich, X. R. Zhou & P. J. Christie, (1996a) The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J Bacteriol* **178**: 3168-3176.
- Francia, M. V., A. Varsaki, M. P. Garcillan-Barcia, A. Latorre, C. Drainas & F. de la Cruz, (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 79-100.
- Fronzes, R., P. J. Christie & G. Waksman, (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**: 703-714.
- Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers & A. Toussaint, (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.

- Fullner, K. J., J. C. Lara & E. W. Nester, (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* **273**: 1107-1109.
- Garcillan-Barcia, M. P., P. Jurado, B. Gonzalez-Perez, G. Moncalian, L. A. Fernandez & F. de la Cruz, (2007) Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. *Mol Microbiol* **63**: 404-416.
- Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia & F. de la Cruz, (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 657-687.
- Gelvin, S. B., (2005) Agricultural biotechnology: gene exchange by design. *Nature* **433**: 583-584.
- Ghigo, J. M., (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**: 442-445.
- Gilmour, M. W., J. E. Gunton, T. D. Lawley & D. E. Taylor, (2003) Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol Microbiol* **49**: 105-116.
- Gomis-Rüth, F. X., G. Moncalián, F. de la Cruz & M. Coll, (2002b) Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol Chem* **277**: 7556-7566.
- Gomis-Rüth, F. X., G. Moncalián, R. Pérez-Luque, A. González, E. Cabezón, F. de la Cruz & M. Coll, (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**: 637-641.
- Grahn, A. M., J. Haase, D. H. Bamford & E. Lanka, (2000) Components of the RP conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. *J Bacteriol* **182**: 1564-1574.
- Grandoso, G., M. Llosa, J. C. Zabala & F. de la Cruz, (1994) Purification and biochemical characterization of TrwC, the helicase involved in plasmid R388 conjugal DNA transfer. *Eur J Biochem* **226**: 403-412.
- Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom & D. Hanahan, (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649.
- Grohmann, E., G. Muth & M. Espinosa, (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 277-301.
- Guglielmini, J., F. de la Cruz & E. P. Rocha, (2012) Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Mol Biol Evol.***30**:315-331
- Guglielmini, J., L. Quintais, M. P. Garcillan-Barcia, F. de la Cruz & E. P. Rocha, (2011) The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet* **7**: e1002222.
- Gunton, J. E., M. W. Gilmour, G. Alonso & D. E. Taylor, (2005) Subcellular localization and functional domains of the coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology* **151**: 3549-3561.
- Haft, R. J., E. G. Gachelet, T. Nguyen, L. Toussaint, D. Chivian & B. Traxler, (2007) In vivo oligomerization of the F conjugative coupling protein TraD. *J Bacteriol.* **189**:6626-34.
- Halary, S., J. W. Leigh, B. Cheaib, P. Lopez & E. Bapteste, (2010) Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 127-132.
- Heinemann, J. A. & G. F. Sprague, Jr., (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**: 205-209.

- Hernando, M. A., (2001) Bioquímica de las reacciones de transferencia de cadenas de DNA catalizadas por la proteína TrwC. In: Departamento de Biología Molecular. Santander: Universidad de Cantabria, pp.
- Hohlfeld, S., I. Pattis, J. Puls, G. V. Plano, R. Haas & W. Fischer, (2006) A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol* **59**: 1624-1637.
- Hollenberg, S. M., R. Sternglanz, P. F. Cheng & H. Weintraub, (1995) Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol* **15**: 3813-3822.
- Hormaeche, I., I. Alkorta, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goñi & F. de la Cruz, (2002) Purification and Properties of TrwB, a Hexameric, ATP-binding Integral Membrane Protein Essential for R388 Plasmid Conjugation. *J Biol Chem* **277**: 46456-46462.
- Hormaeche, I., I. Iloro, J. L. Arrondo, F. M. Goni, F. de la Cruz & I. Alkorta, (2004) Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *J Biol Chem* **279**: 10955-10961.
- Hormaeche, I., R. L. Segura, A. J. Vecino, F. M. Goni, F. de la Cruz & I. Alkorta, (2006) The transmembrane domain provides nucleotide binding specificity to the bacterial conjugation protein TrwB. *FEBS Lett* **580**: 3075-3082.
- Hwang, H. H. & S. B. Gelvin, (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell* **16**: 3148-3167.
- Inomata, K., M. Nishikawa & K. Yoshida, (1994) The yeast *Saccharomyces kluyveri* as a recipient eukaryote in transkingdom conjugation: behavior of transmitted plasmids in transconjugants. *J Bacteriol* **176**: 4770-4773.
- Iyer, L. M., D. D. Leipe, E. V. Koonin & L. Aravind, (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**: 11-31.
- Jakubowski, S. J., E. Cascales, V. Krishnamoorthy & P. J. Christie, (2005) *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an Outer-Membrane-Associated Component of a Type IV Secretion System, Regulates Substrate Selection and T-Pilus Biogenesis. *J Bacteriol* **187**: 3486-3495.
- Jakubowski, S. J., V. Krishnamoorthy, E. Cascales & P. J. Christie, (2004) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J Mol Biol* **341**: 961-977.
- Jimenez-Soto, L. F., S. Kutter, X. Sewald, C. Ertl, E. Weiss, U. Kapp, M. Rohde, T. Pirch, K. Jung, S. F. Retta, L. Terradot, W. Fischer & R. Haas, (2009) *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog* **5**: e1000684.
- Jones, D. T., (1999) GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J Mol Biol* **287**: 797-815.
- Juuti, J. T., D. H. Bamford, R. Tuma & G. J. Thomas, Jr., (1998) Structure and NTPase activity of the RNA-translocating protein (P4) of bacteriophage phi 6. *J Mol Biol* **279**: 347-359.
- Kainov, D. E., J. Lisal, D. H. Bamford & R. Tuma, (2004) Packaging motor from double-stranded RNA bacteriophage phi12 acts as an obligatory passive conduit during transcription. *Nucleic Acids Res* **32**: 3515-3521.
- Kainov, D. E., R. Tuma & E. J. Mancini, (2006) Hexameric molecular motors: P4 packaging ATPase unravels the mechanism. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1095-1105.
- Kainov, D. E., M. Pirttimaa, R. Tuma, S. J. Butcher, G. J. Thomas, Jr., D. H. Bamford & E. V. Makeyev, (2003) RNA packaging device of double-stranded

- RNA bacteriophages, possibly as simple as hexamer of P4 protein. *J Biol Chem* **278**: 48084-48091.
- Kelley, L. A. & M. J. Sternberg, (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**: 363-371.
- Kienesberger, S., C. Schober Trummler, A. Fauster, S. Lang, H. Sprenger, G. Gorkiewicz & E. L. Zechner, (2011) Interbacterial macromolecular transfer by the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* type IV secretion system. *J Bacteriol* **193**: 744-758.
- Kitazono, A. A., (2011) Optimized protocols and plasmids for in vivo cloning in yeast. *Gene* **484**: 86-89.
- Koulintchenko, M., R. J. Temperley, P. A. Mason, A. Dietrich & R. N. Lightowers, (2006) Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. *Hum Mol Genet* **15**: 143-154.
- Krall, L., U. Wiedemann, G. Unsin, S. Weiss, N. Domke & C. Baron, (2002) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11405-11410.
- Krause, S., M. Barcena, W. Pansegrau, R. Lurz, J. M. Carazo & E. Lanka, (2000a) Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3067-3072.
- Krause, S., W. Pansegrau, R. Lurz, F. de la Cruz & E. Lanka, (2000b) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol* **182**: 2761-2770.
- Kumar, R. B. & A. Das, (2002) Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol Microbiol* **43**: 1523-1532.
- Kunik, T., T. Tzfira, Y. Kapulnik, Y. Gafni, C. Dingwall & V. Citovsky, (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1871-1876.
- Lai, E. M. & C. I. Kado, (1998) Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**: 2711-2717.
- Lai, E. M. & C. I. Kado, (2000) The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol* **8**: 361-369.
- Lang, S., K. Gruber, S. Mihajlovic, R. Arnold, C. J. Gruber, S. Steinlechner, M. A. Jehl, T. Rattei, K. U. Frohlich & E. L. Zechner, (2010) Molecular recognition determinants for type IV secretion of diverse families of conjugative relaxases. *Mol Microbiol* **78**: 1539-1555.
- Lang, S., P. C. Kirchberger, C. J. Gruber, A. Redzej, S. Raffl, G. Zellnig, K. Zangger & E. L. Zechner, (2011) An activation domain of plasmid R1 TraI protein delineates stages of gene transfer initiation. *Mol Microbiol* **82**: 1071-1085.
- Lang, S. & E. L. Zechner, (2012) General requirements for protein secretion by the F-like conjugation system R1. *Plasmid* **67**: 128-138.
- Langer, P. J. & G. C. Walker, (1981) Restriction endonuclease cleavage map of pKM101: relationship to parental plasmid R46. *Mol Gen Genet* **182**: 268-272.

- Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins & L. S. Frost, (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 1-15.
- Li, D., R. Zhao, W. Lilyestrom, D. Gai, R. Zhang, J. A. DeCaprio, E. Fanning, A. Jochimiak, G. Szakonyi & X. S. Chen, (2003) Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* **423**: 512-518.
- Li, F., C. Alvarez-Martinez, Y. Chen, K. J. Choi, H. J. Yeo & P. J. Christie, (2012) Enterococcus faecalis PrgJ, a VirB4-like ATPase, mediates pCF10 conjugative transfer through substrate binding. *J Bacteriol* **194**: 4041-4051.
- Le, Y. & M. J. Dobson, (1997) Stabilization of yeast artificial chromosome clones in a rad54-3 recombination-deficient host strain. *Nucleic Acids Res* **25**: 1248-1253.
- Lee, E. C., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tessarollo, D. A. Swing, D. L. Court, N. A. Jenkins & N. G. Copeland, (2001) A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**: 56-65.
- Lim, Y. M., A. J. de Groof, M. K. Bhattacharjee, D. H. Figurski & E. A. Schon, (2008) Bacterial conjugation in the cytoplasm of mouse cells. *Infect Immun* **76**: 5110-5119.
- Llosa, M., S. Bolland & F. de la Cruz, (1991) Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Mol Gen Genet* **226**: 473-483.
- Llosa, M., S. Bolland & F. de la Cruz, (1994) Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* **235**: 448-464.
- Llosa, M., S. Bolland, G. Grandoso & F. de la Cruz, (1994b) Conjugation-independent, site-specific recombination at the *oriT* of the IncW plasmid R388 mediated by TrwC [published erratum appears in J Bacteriol 1994 Oct;176(20):6414]. *J Bacteriol* **176**: 3210-3217.
- Llosa, M., G. Grandoso & F. de la Cruz, (1995) Nicking activity of TrwC directed against the origin of transfer of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* **246**: 54-62.
- Llosa, M., G. Grandoso, M. A. Hernando & F. de la Cruz, (1996) Functional domains in protein TrwC of plasmid R388: dissected DNA strand transferase and DNA helicase activities reconstitute protein function. *J Mol Biol* **264**: 56-67.
- Llosa, M., F.-X. Gomis-Rüth, M. Coll & F. de la Cruz, (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**: 1-8.
- Llosa, M., S. Zunzunegui & F. de la Cruz, (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10465-10470.
- Llosa, M. & F. de la Cruz, (2005) Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res Microbiol* **156**: 1-6.
- Llosa, M., C. Roy & C. Dehio, (2009) Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol* **73**: 141-151.
- Llosa, M., G. Schroder & C. Dehio, (2012) New perspectives into bacterial DNA transfer to human cells. *Trends Microbiol* **20**: 355-359.
- Lowe, J., A. Ellonen, M. D. Allen, C. Atkinson, D. J. Sherratt & I. Grainge, (2008) Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell* **31**: 498-509.

- Lu, J., J. J. Wong, R. A. Edwards, J. Manchak, L. S. Frost & J. N. Glover, (2008) Structural basis of specific TraD-TraM recognition during F plasmid-mediated bacterial conjugation. *Mol Microbiol* **70**: 89-99.
- Luo, Z. Q. & R. R. Isberg, (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 841-846.
- Machón, C., S. Rivas, A. Albert, F. M. Goñi & F. de la Cruz, (2002) TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by plasmid R388, induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles. *J Bacteriol* **184**: 1661-1668.
- Mancini, E. J., D. E. Kainov, J. M. Grimes, R. Tuma, D. H. Bamford & D. I. Stuart, (2004) Atomic snapshots of an RNA packaging motor reveal conformational changes linking ATP hydrolysis to RNA translocation. *Cell* **118**: 743-755.
- Marchesini, M. I., C. K. Herrmann, S. P. Salcedo, J. P. Gorvel & D. J. Comerci, (2011) In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol* **13**: 1261-1274.
- Martínez, E. & F. de la Cruz, (1988) Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol Gen Genet* **211**: 320-325.
- Marquis, K. A., B. M. Burton, M. Nollmann, J. L. Ptacin, C. Bustamante, S. Ben-Yehuda & D. Z. Rudner, (2008) SpoIIIE strips proteins off the DNA during chromosome translocation. *Genes Dev* **22**: 1786-1795.
- Massey, T. H., C. P. Mercogliano, J. Yates, D. J. Sherratt & J. Lowe, (2006) Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* **23**: 457-469.
- Matilla, M., (2011) TrwB: Una motor molecular de unión específica a estructuras G-cuádruplex en el ADN. In: Departamento de Biología Molecular Santander: Universidad de Cantabria, pp.
- Matilla, I., C. Alfonso, G. Rivas, E. L. Bolt, F. de la Cruz & E. Cabezón, (2011) The conjugative DNA translocase TrwB is a structure-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem* **285**: 17537-17544.
- Matson, S. W., J. K. Sampson & D. R. Byrd, (2001) F plasmid conjugative DNA transfer: the TraI helicase activity is essential for DNA strand transfer. *J Biol Chem* **276**: 2372-2379.
- McGuffin, L. J. & D. T. Jones, (2003) Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. *Bioinformatics* **19**: 874-881.
- Miroux, B. & J. E. Walker, (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298.
- Mizuta, M., E. Satoh, C. Katoh, K. Tanaka, K. Moriguchi & K. Suzuki, (2012) Screening for yeast mutants defective in recipient ability for transkingdom conjugation with *Escherichia coli* revealed importance of vacuolar ATPase activity in the horizontal DNA transfer phenomenon. *Microbiol Res* **167**: 311-316.
- Moncalián, G., E. Cabezón, I. Alkorta, M. Valle, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goni & F. de La Cruz, (1999a) Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J Biol Chem* **274**: 36117-36124.
- Moncalián, G., M. Valle, J. M. Valpuesta & F. de la Cruz, (1999b) IHF protein inhibits cleavage but not assembly of plasmid R388 relaxosomes. *Mol Microbiol* **31**: 1643-1652.
- Moncalián, G., G. Grandoso, M. Llosa & F. de la Cruz, (1997) *oriT*-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **270**: 188-200.

- Moncalián, G. & F. de la Cruz, (2004) DNA binding properties of protein TrwA, a possible structural variant of the Arc repressor superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1701**: 15-23.
- Nagai, H., E. D. Cambronne, J. C. Kagan, J. C. Amor, R. A. Kahn & C. R. Roy, (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 826-831.
- Nagai, H. & C. R. Roy, (2003) Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell Microbiol* **5**: 373-383.
- Nishikawa, M., K. Suzuki & K. Yoshida, (1992) DNA integration into recipient yeast chromosomes by trans-kingdom conjugation between *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **21**: 101-108.
- Nogueira, T., D. J. Rankin, M. Touchon, F. Taddei, S. P. Brown & E. P. Rocha, (2009) Horizontal gene transfer of the secretome drives the evolution of bacterial cooperation and virulence. *Curr Biol* **19**: 1683-1691.
- Núñez, B., P. Avila & F. de la Cruz, (1997) Genes involved in conjugative DNA processing of plasmid R6K. *Mol Microbiol* **24**: 1157-1168.
- Parker, C. & R. J. Meyer, (2007) The R1162 relaxase/primase contains two, type IV transport signals that require the small plasmid protein MobB. *Mol Microbiol* **66**: 252-261.
- Pansegrau, W., E. Lanka, P. T. Barth, D. H. Figurski, D. G. Guiney, D. Haas, D. R. Helinski, H. Schwab, V. A. Stanisich & C. M. Thomas, (1994) Complete nucleotide sequence of Birmingham IncPa plasmids. Compilation and comparative analysis. *J Mol Biol* **239**: 623-663.
- Pattis, I., E. Weiss, R. Laugks, R. Haas & W. Fischer, (2007) The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology* **153**: 2896-2909.
- Peña, A., J. Ripoll-Rozada, S. Zunzunegui, E. Cabezon, F. de la Cruz & I. Arechaga, (2011) Autoinhibitory regulation of TrwK, an essential VirB4 ATPase in type IV secretion systems. *J Biol Chem* **286**: 17376-17382.
- Peña, A., I. Matilla, J. Martin-Benito, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, F. De la Cruz, E. Cabezon & I. Arechaga, (2012) The hexameric structure of a conjugative VirB4 ATPase provides new insights for a functional and phylogenetic relationship with DNA translocases. *J Biol Chem*. **287**:39925-39932
- Planet, P. J., S. C. Kachlany, R. DeSalle & D. H. Figurski, (2001) Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2503-2508.
- Rashkova, S., G. M. Spudich & P. J. Christie, (1997) Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase. *J Bacteriol* **179**: 583-591.
- Rabhi, M., V. Gocheva, F. Jacquinet, A. Lee, E. Margeat & M. Boudvillain, (2011) Mutagenesis-based evidence for an asymmetric configuration of the ring-shaped transcription termination factor Rho. *J Mol Biol* **405**: 497-518.
- Rhee, Y., F. Gurel, Y. Gafni, C. Dingwall & V. Citovsky, (2000) A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Nat Biotechnol* **18**: 433-437.
- Richardson, J. P., (2002) Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta* **1577**: 251-260.
- Ripoll-Rozada, J., A. Pena, S. Rivas, F. Moro, F. de la Cruz, E. Cabezon & I. Arechaga, (2012) Regulation of the type IV secretion ATPase TrwD by

- magnesium: implications for catalytic mechanism of the secretion ATPase superfamily. *J Biol Chem* **287**: 17408-17414.
- Rivas, S., S. Bolland, E. Cabezón, F. M. Goñi & F. de la Cruz, (1997) TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. *J Biol Chem* **272**: 25583-25590.
- Sadler, J. R., M. Tecklenburg & J. L. Betz, (1980) Plasmids containing many tandem copies of a synthetic lactose operator. *Gene* **8**: 279-300.
- Sagulenko, E., V. Sagulenko, J. Chen & P. J. Christie, (2001a) Role of Agrobacterium VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol* **183**: 5813-5825.
- Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens & L. Y. Li, (1995) Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* **59**: 579-590.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) Molecular cloning : a laboratory manual, p. 3 v. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandler, S. J. & A. J. Clark, (1990) Factors affecting expression of the recF gene of Escherichia coli K-12. *Gene* **86**: 35-43.
- Sarkar, G. & S. S. Sommer, (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8**: 404-407.
- Sastre, J. I., (1996) El extremo carboxilo de la proteína TraD del plásmido F confiere especificidad y eficiencia en el proceso de la conjugación. Ph. D. Thesis.: Universidad de Cantabria.
- Sastre, J. I., E. Cabezón & F. de la Cruz, (1998) The carboxyl terminus of protein TraD adds specificity and efficiency to F-plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol* **180**: 6039-6042.
- Scheiffele, P., W. Pansegrau & E. Lanka, (1995) Initiation of Agrobacterium tumefaciens T-DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA in vitro. *J Biol Chem* **270**: 1269-1276.
- Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke, C. Angerer, G. Wanner, P. C. Zambryski & C. Baron, (1999a) Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* **181**: 7485-7492.
- Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke & C. Baron, (1999b) TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in Escherichia coli. *J Bacteriol* **181**: 5563-5571.
- Schröder, G., S. Krause, E. L. Zechner, B. Traxler, H. J. Yeo, R. Lurz, G. Waksman & E. Lanka, (2002) TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the Helicobacter pylori type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J Bacteriol* **184**: 2767-2779.
- Schröder, G. & E. Lanka, (2003) TraG-like proteins of type IV secretion systems: functional dissection of the multiple activities of TraG (RP4) and TrwB (R388). *J Bacteriol* **185**: 4371-4381.
- Schröder, G., R. Schüle, M. Quebatte & C. Dehio, (2011) Conjugative DNA transfer into human cells by the VirB/VirD4 type IV secretion system of the bacterial pathogen Bartonella henselae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 14643-14648
- Schulein, R., P. Guye, T. A. Rhomberg, M. C. Schmid, G. Schroder, A. C. Vergunst, I. Carena & C. Dehio, (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of Bartonella henselae into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 856-861.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex & M. C. Peitsch, (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3381-3385.

- Seubert, A., C. Falch, R. J. Birtles, R. Schulein & C. Dehio, (2003a) Characterization of the cryptic plasmid pBGR1 from *Bartonella grahamii* and construction of a versatile *Escherichia coli*-*Bartonella* spp. shuttle cloning vector. *Plasmid* **49**: 44-52.
- Seubert, A., R. Hiestand, F. de la Cruz & C. Dehio, (2003b) A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**: 1253-1266.
- Sikorski, R. S., W. Michaud, H. L. Levin, J. D. Boeke & P. Hieter, (1990) Transkingdom promiscuity. *Nature* **345**: 581-582.
- Simpson, A. A., Y. Tao, P. G. Leiman, M. O. Badasso, Y. He, P. J. Jardine, N. H. Olson, M. C. Morais, S. Grimes, D. L. Anderson, T. S. Baker & M. G. Rossmann, (2000) Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature* **408**: 745-750.
- Singleton, M. R., M. R. Sawaya, T. Ellenberger & D. B. Wigley, (2000) Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell* **101**: 589-600.
- Skordalakes, E. & J. M. Berger, (2003) Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell* **114**: 135-146.
- Smirnova, M., S. Van Komen, P. Sung & H. L. Klein, (2004) Effects of tumor-associated mutations on Rad54 functions. *J Biol Chem* **279**: 24081-24088.
- Szipirer, C. Y., M. Faelen & M. Couturier, (2000) Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob [In Process Citation]. *Mol Microbiol* **37**: 1283-1292.
- Tato, I., S. Zunzunegui, F. de la Cruz & E. Cabezón, (2005) TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8156-8161.
- Tato, I., I. Matilla, I. Arechaga, S. Zunzunegui, F. de la Cruz & E. Cabezón, (2007) The ATPase activity of the DNA transporter TrwB is modulated by protein TrwA: implications for a common assembly mechanism of DNA translocating motors. *J Biol Chem* **282**: 25569-25576.
- Taylor, N. J. & C. M. Fauquet, (2002) Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol* **21**: 963-977.
- Terradot, L., R. Bayliss, C. Oomen, G. A. Leonard, C. Baron & G. Waksman, (2005) Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4596-4601.
- Thomas, B. J & R., Rothstein, (1987) The genetic control of direct-repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of rad52 and rad1 on mitotic recombination at GAL10, a transcriptionally regulated gene. *Genetics* **123**: 725-738
- Thomas, J. & D. W. Hecht, (2007) Interaction of *Bacteroides fragilis* pLV22a relaxase and transfer DNA with *Escherichia coli* RP4-TraG coupling protein. *Mol Microbiol* **66**: 948-960.
- Tinland, B., F. Schoumacher, V. Gloeckler, A. M. Bravo-Angel & B. Hohn, (1995) The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *Embo J* **14**: 3585-3595.
- Tzfira, T. & V. Citovsky, (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 147-154.
- Valentine, R. C. & M. Strand, (1965) Complexes of F-Pili and Rna Bacteriophage. *Science* **148**: 511-513.
- van der Meer, J. R. & V. Sentchilo, (2003) Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 248-254.

- Vasil, I. K., (2008) A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep* **27**: 1423-1440.
- Vayssier-Taussat, M., D. Le Rhun, H. K. Deng, F. Biville, S. Cescau, A. Danchin, G. Marignac, E. Lenaour, H. J. Boulouis, M. Mavris, L. Arnaud, H. Yang, J. Wang, M. Quebatte, P. Engel, H. Saenz & C. Dehio, (2010) The Trw type IV secretion system of *Bartonella* mediates host-specific adhesion to erythrocytes. *PLoS Pathog* **6**: e1000946.
- Vecino, A. J., I. de la Arada, R. L. Segura, F. M. Goni, F. de la Cruz, J. L. Arrondo & I. Alkorta, (2011) Membrane insertion stabilizes the structure of TrwB, the R388 conjugative plasmid coupling protein. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 1032-1039.
- Vecino, A. J., R. L. Segura, B. Ugarte-Urbe, S. Aguila, I. Hormaeche, F. de la Cruz, F. M. Goni & I. Alkorta, (2010) Reconstitution in liposome bilayers enhances nucleotide binding affinity and ATP-specificity of TrwB conjugative coupling protein. *Biochim Biophys Acta* **1798**: 2160-2169.
- Vergunst, A. C., M. C. van Lier, A. den Dulk-Ras, T. A. Grosse Stuve, A. Ouwehand & P. J. Hooykaas, (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 832-837.
- Vergunst, A. C., B. Schrammeijer, A. den Dulk-Ras, C. M. de Vlaam, T. J. Regensburg-Tuink & P. J. Hooykaas, (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**: 979-982.
- Vogelmann, J., M. Ammelburg, C. Finger, J. Guezguez, D. Linke, M. Flotenmeyer, Y. D. Stierhof, W. Wohlleben & G. Muth, (2011) Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *EMBO J* **30**: 2246-2254.
- Voth, D. E., D. Howe, P. A. Beare, J. P. Vogel, N. Unsworth, J. E. Samuel & R. A. Heinzen, (2009) The *Coxiella burnetii* ankyrin repeat domain-containing protein family is heterogeneous, with C-terminal truncations that influence Dot/Icm-mediated secretion. *J Bacteriol* **191**: 4232-4242.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick & N. J. Gay, (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.
- Waksman, G., E. Lanka & J. M. Carazo, (2000) Helicases as nucleic acid unwinding machines. *Nat Struct Biol* **7**: 20-22.
- Waksman, G. & R. Fronzes, (2010) Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends Biochem Sci* **35**: 691-698.
- Wallden, K., R. Williams, J. Yan, P. W. Lian, L. Wang, K. Thalassinou, E. V. Orlova & G. Waksman, (2012) Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 11348-11353.
- Ward, J. M. & J. Grinstead, (1982) Physical and genetic analysis of the Inc-W group plasmids R388, Sa, and R7K. *Plasmid* **7**: 239-250.
- Waters, V. L., (2001) Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat Genet* **29**: 375-376.
- Waters, V. L. & D. G. Guiney, (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol Microbiol* **9**: 1123-1130.
- Wendler, P., S. Ciniawsky, M. Kock & S. Kube, (2012) Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 2-14.
- Wu, L. J. & J. Errington, (1994) *Bacillus subtilis* spoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* **264**: 572-575.

- Yamada, K., T. Miyata, D. Tsuchiya, T. Oyama, Y. Fujiwara, T. Ohnishi, H. Iwasaki, H. Shinagawa, M. Ariyoshi, K. Mayanagi & K. Morikawa, (2002) Crystal structure of the RuvA-RuvB complex: a structural basis for the Holliday junction migrating motor machinery. *Mol Cell* **10**: 671-681.
- Yeo, H. J., Q. Yuan, M. R. Beck, C. Baron & G. Waksman, (2003) Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15947-15952.
- Yeo, H. J., S. N. Savvides, A. B. Herr, E. Lanka & G. Waksman, (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell* **6**: 1461-1472.
- Yoon, Y. G. & M. D. Koob, (2005) Transformation of isolated mammalian mitochondria by bacterial conjugation. *Nucleic Acids Res* **33**: e139.
- Yuan, Q., A. Carle, C. Gao, D. Sivanesan, K. A. Aly, C. Hoppner, L. Krall, N. Domke & C. Baron, (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* **280**: 26349-26359.
- Zechner, E. L., F. de la Cruz, R. Eisenbrant, A. M. Grahn, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. M. Thomas, B. M. Wilkins & M. Zatyka, (2000) *The horizontal gene pool: Bacterial plasmids and gene spread*, p. 87-174. Harwood Academic Publishers, London.
- Zhang, X. & D. B. Wigley, (2008) The 'glutamate switch' provides a link between ATPase activity and ligand binding in AAA+ proteins. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1223-1227.
- Zupan, J., T. R. Muth, O. Draper & P. Zambryski, (2000) The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* **23**: 11-28.

## **8. English Version**



## Background and Aims

Bacterial conjugation is a highly efficient process for DNA transfer from a donor to a recipient bacterium, which contributes to genomic plasticity (Zechner *et al.*, 2000). Conjugation has been shown to occur under laboratory conditions from bacteria to plant (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987), yeast (Heineman & Sparague 1989), or mammalian cells (Waters *et al.*, 2001), and to isolated mammalian mitochondria (Yoon & Koob, 2005).

The conjugative apparatus involves three functional modules (Llosa & de la Cruz, 2005):

i) A Type IV secretion system (T4SS) forms a transmembrane channel for protein-DNA transport.

ii) DNA processing is conducted by a protein-DNA complex called relaxosome. The main components of the relaxosome are the *oriT*, a DNA segment from the plasmid required in cis for conjugal mobilization, and the relaxase, which selectively binds and cleaves one strand of the *oriT*, remaining covalently bound to this strand to lead it into the recipient cell.

iii) The Type IV coupling protein (T4CP) is needed to couple the relaxosome to the T4SS (Llosa *et al.*, 2003). The T4CP is required for substrate translocation but dispensable for biogenesis of the conjugative *pilus* (Schröder & Lanka, 2005).

According to the "shoot and pump model" for bacterial conjugation (Llosa *et al.*, 2002), the relaxase would be recruited and translocated by the T4SS, and in a second step, the T4CP would pump the linked DNA strand out of the cell using the energy released from ATP hydrolysis.

Our model of conjugation is plasmid R388, which codes for a transfer region (TraW), separated in two regions (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006):

i) the *Dtr* region, involved in DNA transfer and replication, which contains the *oriT* and encodes for three proteins: TrwA (accessory nicking protein), TrwB (the T4CP) and TrwC (relaxase).

ii) the *Mpf* region codes for the T4SS apparatus, which is composed by a set of eleven proteins (TrwD to TrwN).

TrwB is required for transferring the conjugative substrate and also for relaxase translocation in the absence of DNA transfer (Draper *et al.*, 2005). This protein has become the prototype of conjugative T4CP. The soluble domain, TrwB $\Delta$ N70, is a DNA-dependent ATPase (Tato *et al.*, 2007). Its 3D structure has been solved (Gomith R  th *et al.*, 2001), and it shares structural similarities with other known molecular motors, i.e. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase or FtsK/SpoIIIE, belonging to the RecA/AAA+ protein family, leading to propose a common mode in accordance with the "shoot and pump" model (Cabezón & de la Cruz, 2006).

Its coupling role involves a number of protein-protein interactions with both the relaxosome and the T4SS. TrwB can interact functionally with several conjugative and pathogenic T4SS (Llosa *et al.*, 2003, de Paz *et al.*, 2005, Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2011). In contrast, TrwB interacts specifically with the relaxosome components.

The relaxase TrwC is the protein in charge of piloting the DNA during bacterial conjugation of plasmid R388. To carry out its function it must be translocated through the T4SS. The molecular determinants involved in this recruitment are not known. The knowledge of relaxase translocation signals (TS) is restricted to that of TraI of F-like plasmid (Lang *et al.*, 2010) and MobA of plasmid R1162 (Mayer & Parker 2007). The relaxase TS in conjugative T4SS are found at various internal positions (Lang *et al.*, 2010), in contrast to the effector proteins, which are recognized through their C-termini.

This thesis work intends to explore the role of TrwB at the T4SS-substrate interface, its relation with other conjugation proteins at both the membrane and the cytoplasmic side. We are interested in determining TrwB residues involved in recruitment and translocation of the transferred substrate (TrwC-DNA). Moreover, we have studied the translocation signal of the relaxase TrwC involved in the specific recognition and translocation by the R388 T4SS.

In order to explore the versatility of the T4SS machineries also at the recipient interface, we have extended our study by assaying different recipients of the conjugative process. Instead of using bacteria as recipients, we have chosen yeasts and isolated mammalian mitochondria. This approach has added difficulty, since little

is known about the molecular determinants of recipient recognition, but offers the attractive possibility of developing tools for customized DNA delivery to eukaryotes.

## Results and discussion

### Section 4.1. Structural relationship between the T4CP and the T4SS

T4SS may vary in subunit number and composition, however they seem to have retained a core VirB-like core-complex (Christie *et al.*, 2005) and probably assemble and function in a similar manner.

Coupling proteins (T4CP) are present in all T4SS involved in DNA transfer and also in many T4SS that secrete effector proteins to eukaryotic cells. They have been shown to interact with the T4SS machinery and with the transferred substrate. The relationship between the T4CP and its T4SS has not been well established yet. While other T4SS components have a clear functional unity and common evolutionary history, T4CP have been proposed to be an independent functional module (Llosa & de la Cruz, 2005).

One way to test this interdependence is to assess the effect of the absence of one T4SS component in the steady-state levels of the others. Multiprotein complexes often show structural dependence among their components, so in the absence of a functional complex, the observed levels of the unassembled components are lower than in the presence of the complex. In this work we have analyzed a collection of R388 T4SS mutants in order to assess their effect on the stability of other T4SS components, based on the steady-state level of the Trw proteins. We have also tested structural complementation by the Trw proteins of *Bartonella tribocorum* (*Bt*).

The main results of this section are described below and summarized in **Table I**.

- TrwC protein displays comparable levels in all *trw* mutants as expected, and is used as an independent control of the amount of proteins in the Western blots.

- The T4CP, TrwB, was not affected by the absence of other Trw proteins, suggesting an independent role on the R388 T4SS structure.

- The minor *pilus* component, TrwJ, was undetectable in the absence of any other T4SS component, except for the T4CP. Complementation with *Bt*-Trw system restored its levels.

- The cytoplasmic ATPase TrwD was affected in all mutants of the *Mpf* region except for *trwJ*. The absence of TrwH caused protein accumulation. Complementation with *Bt* Trw system restored its wild type levels.

Trw R388 T4SS	Trw <i>Bt</i> T4SS	DNA transfer	Anti C	Anti B	Anti D	Anti K	Anti J
All		+++	+++	+++	+++	+++	+++
- TrwB (VirD4)	-	-	+++	-	+	+++	+++
- TrwD (VirB11)	-	-	+++	+++	-	+++	-
- TrwD (VirB11)	✓	+++	+++	-	-	-	+++
- TrwK (VirB4)	-	-	+++	+++	-	-	-
-TrwK (VirB4)	✓	-	+++	-	+	-	-
- TrwE (VirB10)	-	-	+++	+++	+++	++++	-
- TrwE (VirB10)	✓	+	+++	-	+++	-	+++
- TrwG (VirB8)	-	-	+++	+++	-	+	-
- TrwG (VirB8)	✓	+	+++	-	-	-	+++
- TrwI (VirB6)	-	-	+++	+++	+	++	-
- TrwI (VirB6)	✓	-	+++	-	+	-	-
- TrwF (VirB9)	-	-	+++	+++	-	+	-
- TrwF (VirB9)	✓	+	+++	-	-	-	+++
- TrwH (VirB7)	-	+	+++	+++	++++	+++	-
- TrwH (VirB7)	✓	++	+++	-	+++	-	+++
- TrwJ (VirB5)	-	-	+++	+++	+++	+++	-
- TrwJ (VirB5)	✓	-	+++	-	+++	-	-

**Table I.** Summary of the results from Section 4.1. Steady-state levels of several Trw proteins in the absence of other T4SS components. First column: the letter indicates the missing R388 Trw protein. Second column: the presence (✓) or absence (-) of *Bt* Trw-T4SS is indicated. Third column: DNA transfers frequencies (from de Paz et al., 2005). The rest of the columns show the steady-state levels of the proteins indicated at the top of each column, according to the results obtained with each anti-Trw serum: Anti-TrwC; Anti-TrwD: Anti-TrwK or Anti-TrwJ. +++: wild type levels; ++ slight decrease; + severe decrease; - not detected; ++++ increased levels compared to wild type.

- TrwK, the most conserved component of the T4SS that contacts the core complex according to the recently solved 3D structure (Wallden *et al.*, 2012), was affected by the absence of the T4SS *core components*.

The results delineates a possible assembly pathway for the T4SS of R388 , similar to other T4SS: [K-core]-TrwB/TrwD-*pilus* (Walksman & Fronzes, 2010). It is also possible the existence of alternative complexes depending on the presence of the substrate (see Figure 39 in Section 4.1, page 124).

## Section 4.2. Structure/function analysis of TrwB

Conjugative coupling proteins mediate contact between the nucleoprotein substrate in the cytoplasm and the T4SS during conjugative DNA transfer, playing a key role in substrate recruitment.

We have set up conjugation conditions that have allowed us to obtain a correlation between conjugation frequencies and the amount of produced TrwB, called the TrwB limiting system. Based on the 3D structure of TrwB $\Delta$ N70, a collection of point mutants was created targeting residues most likely to be involved in the interactions with the T4SS, relaxosomal component and the transferred substrate (TrwC-DNA). By using the "TrwB limiting system" we found phenotypes of TrwB mutants, which did not show any on standard conjugation assays. We have mapped the functional domains of TrwB and we found that lysine residues protruding into the internal channel (ICH) of the TrwB hexamer seemed to be involved in the transfer of the conjugative substrate (TrwC-DNA), but also in TrwC translocation without DNA. This work is presented in detail in the attached manuscript (de Paz *et al.*, 2010).

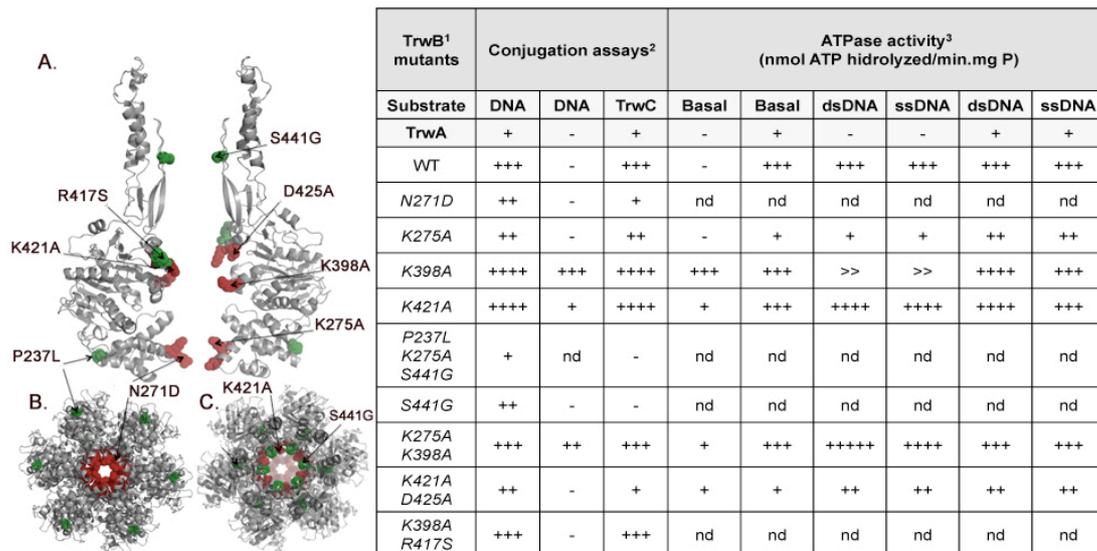
In order to clarify the role of these residues, we have constructed mutants protruding into the ICH of TrwB hexamer (**Figure I**). All TrwB mutants showed steady-state levels comparable to TrwB wild type, meaning that the observed phenotypes were not a result of increase/ decrease on protein amounts.

We have addressed an extended *in vivo* analysis. We have improved the TrwB limiting system for DNA transfer, where the conjugation frequencies were increased in 1 log. Also, a second version of this system was constructed in order to assay conjugation in the absence of TrwA.

In de Paz *et al* (2010) we assayed these mutants for TrwC translocation using a triparental system where TrwB was produced from its own promoter (*P<sub>trwA</sub>*). We

found that in that system the constitutive expression of *trwC* affects donor cell viability. Thus, we improved the system using the *E. coli* strain D1210 strain where we could induce *trwB* expression under *Plac* promoter control.

Conjugation assays using these new conditions showed a strict correlation between the DNA transfer rates in the presence and in the absence of TrwA and TrwC translocation rates (Fig. I).



**Figure I.** Summary of the results obtained in section 4.2.

Left, ribbon representations of the 3D structure of TrwB protein in which the transmembrane domain (TMD) is modelled. **A.** Side view of two opposing monomers where the mutated residues are highlighted in color code. Red spots indicate designed point mutations of lysines residues protruding into the ICH (K275A; K398A; K421A), N271D mutation in the entrance of the ICH or D425A in the upper half of the TrwB hexamer. Spontaneous mutations are highlighted as green spots. P237L faces the cytoplasm; R417S is located at the interface of two monomers, and S441P is protruding into the ICH very close to the TMD. **B.** Cytoplasmic view of the TrwB hexamer. **C.** Outer view of the TrwB hexamer.

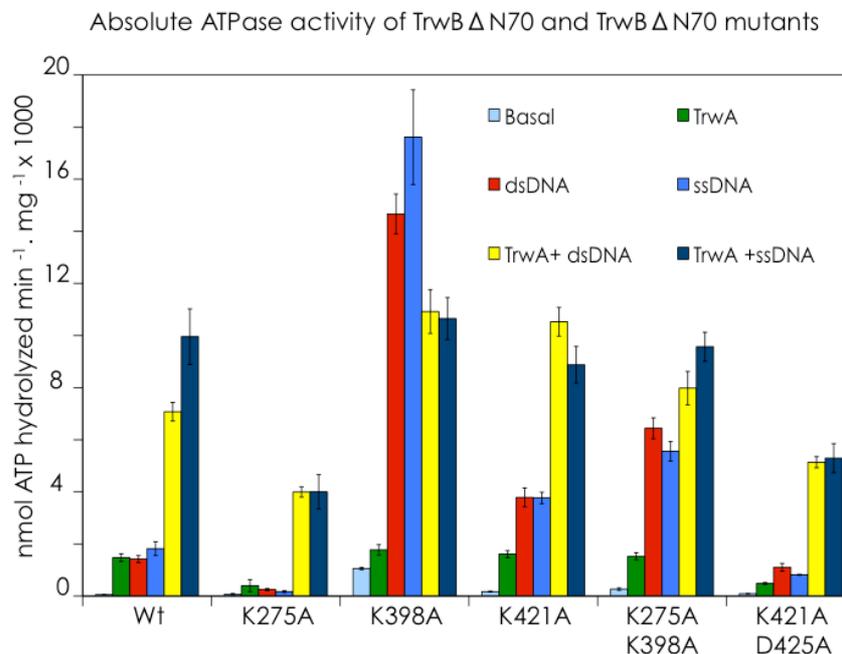
The Table on the right summarizes the results from the *in vivo* and *in vitro* assays. <sup>1</sup>Mutants protruding into the ICH. <sup>2</sup> Conjugative frequencies from *in vivo* assays. DNA transfer in the presence of TrwA:  $< 1 \times 10^{-06}$  (-);  $1 \times 10^{-04}$  (+);  $1 \times 10^{-03} - 1 \times 10^{-02}$  (++);  $1 \times 10^{-01}$  (+++);  $\geq 1$  (++++). DNA transfer in the absence of TrwA:  $< 1 \times 10^{-06}$  (-);  $1 \times 10^{-06}$  (+);  $1 \times 10^{-05}$  (++);  $1 \times 10^{-04}$  (+++). TrwC translocation:  $< 1 \times 10^{-06}$  (-);  $1 \times 10^{-06}$  (+);  $1 \times 10^{-05}$  (++);  $1 \times 10^{-04}$  (+++). <sup>3</sup> ATPase activity is indicated as -; +; ++; +++; ++++ significant increase with respect to TrwB $\Delta$ N70; >> indicates ATPase values 10 times higher than TrwB $\Delta$ N70

Briefly, mutants located in the entrance of the ICH (N271D and K275A) showed a modest decrease in conjugation frequency. Mutants K398A and K421A showed almost 1-log higher conjugation frequency and the double mutant K275A K398A behaved as wild type.

An interesting observation is that, during the construction of the ICH mutants, spontaneous additional mutations were isolated with unexpected frequency. Some of these mutations had compensatory effects suggesting that the designed ICH mutants could be toxic to the cell. One of these mutants, the triple mutant P237L K275A S441G, showed a strong reduction in DNA transfer rates. We separated the mutations P237L K275A and S441G to determine their effect separately, and we observed that mutation S441G was responsible for the observed phenotype. S441 is located inside the ICH very close to the transmembrane region (Fig. I), so it is also a candidate for substrate interaction.

We purified the soluble derivatives of selected ICH mutants for *in vitro* analysis. None of the assayed mutations affected interaction with scDNA or with TrwA under the tested conditions.

We have tested the ATPase activity of these mutants in the presence of DNA substrates and/or protein TrwA (accessory nicking protein), which are known to stimulate TrwB $\Delta$ N70 ATPase activity. The results are shown in **Figure II**.



**Figure II.** Effect of inducers of the ATPase activity on TrwB $\Delta$ N70 and TrwB $\Delta$ N70 mutants. All reactions contained TrwB $\Delta$ N70/ TrwB $\Delta$ N70 mutants (0.3  $\mu$ M as monomer), 5 mM ATP, 5  $\mu$ M base ssDNA, or 10  $\mu$ M bp dsDNA, TrwA at  $\mu$ M 0.2 as tetramer, or a combination of both substrates. Experiments were carried out with the coupled spectrophotometric assay, initiating

the reaction by the addition of 0,3  $\mu\text{M}$  TrwB $\Delta$ N70 and TrwB $\Delta$ N70 mutants. The effects of TrwA, dsDNA, ssDNA or TrwA+ DNA are shown in color code. For comparison, basal ATPase activity has also been represented for each mutant. Data are derived by averaging at least five experiments.

All substrates stimulated the ATP hydrolysis of TrwB $\Delta$ N70, and the combination of TrwA plus ss or ds DNA has a synergistic effect on ATPase values. With respect to the ICH mutants, basal ATP hydrolysis rates were 1.2 (K275A); 18 (K398A); 3 (K421A); 4,7 (K275AK398A) and 1,6 (K421AD425A) times higher than wild type TrwB $\Delta$ N70 (Fig. II, light- blue bars), suggesting that mutation of the lysine residues protruding into the ICH, especially K398A, could activate TrwB ATPase activity.

When TrwA was added to the reaction mix, a similar value of ATP turn over was observed for K398A, K421A and K275A K398A mutants compared to TrwB $\Delta$ N70 wt, while mutants K275A and K421A D425A exhibited lower values (Fig. II, green bars). However, the increase of ATPase activity compared to basal ATPase values for each mutant was in all cases lower than in the case of wild-type TrwB; notably, mutant K398A did not show any increase in its ATPase rate caused by the presence of TrwA.

Addition of ssDNA or dsDNA increased the ATPase activity for all mutants compared to their respective basal levels. The effect of dsDNA or ssDNA was similar in all cases. Increased levels of ATP turn over were detected for K421A and especially K398A mutants: 2,3 and 10 times higher compared to wild type protein, respectively, while mutant K275A showed lower levels of ATP hydrolysis than wild type protein. Curiously, additional mutations in K398A and K421A mutants (K398A K275A and K421A D425A) caused a reduction in the ATPase turn over of 3 to 4 times compared to the single mutants. The same effects have been observed for the *in vivo* analysis (Fig. I). Independently of absolute ATPase values, when comparing the increase with respect to the basal ATPase activity for each mutant, a similar effect is observed by the addition of DNA in all cases except for mutant K275A, which shows a very modest increase, if any (Fig. II).

Interestingly, when both TrwA and DNA are added to the reaction (which presumably mimics the situation *in vivo*), most mutants behave similar to wild-type TrwB, with the exception of K275 and double mutant K421A D425A that display lower ATPase activity. For most mutants, ATP hydrolysis values were stimulated to a much higher extent than in the presence of either TrwA or DNA alone (Fig.II), with the notable exception of K398A mutant, for which addition of TrwA reduces the abnormally high ATPase activity observed in the presence of DNA to wild type levels.

We have found that coexpression of *trwA* and *trwB* gave rise to higher frequencies of conjugation that without *trwA* coexpression. These data indicate that TrwA plays an important role on TrwB function. Interestingly, in the absence of TrwA, no DNA transfer was detected except for mutant K398A, underscoring again the independence of TrwA also observed for this mutant in the ATPase assays.

The results indicated that mutants protruding the ICH of TrwB affect protein activity *in vivo* as well as *in vitro*, which suggests that positive residues into the ICH play a relevant role on TrwB function.

We found that other DNA/RNA molecular motors also use basic or charged residues, which are involved in the interaction with the transferred substrate (Mancini *et al.*, 2004). Several lysines have been suggested to play a mechanochemical role by transducing the signal – interaction with the DNA/RNA- to the active site, resulting in DNA/RNA translocation (Rabhi *et al.*, 2011).

Our results support a conjugation model in which the substrate (both DNA and protein) is in direct contact with the internal channel of the coupling protein. We think that our findings could help to understand the route for substrate secretion.

### **Section 4.3. TrwC translocation signal (TS)**

In order to be recruited by their respective T4SS, protein substrates must carry a specific signal for recognition (translocation signal, TS). The conjugative relaxase TrwC of plasmid R388 is translocated through its own T4SS during conjugation where the presence of TrwB is required (Draper *et al.*, 2005), and it is efficiently recognized by the VirB/D4 T4SS of the human facultative intracellular pathogen *Bartonella henselae* (*Bh*) (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2011).

This section aims to find the translocation signal (TS) of TrwC, which is required for protein translocation. To this aim, we have selected the Cre-assay for protein translocation that was previously adapted to identify the TS of the relaxase TraI of F-like plasmids (Lang *et al.*, 2010). We have delimited the TS containing region by constructing a collection of Cre-TrwC fragments, which in overall represent the whole

TrwC sequence. The results obtained using the CRAFT assay are shown in **Table II**. The TS is included into the fragment 705-895 of TrwC, that matches with the conserved RecD/TS previously described by Lang *et al*, (2010). The alignment of the previously defined TSA and TSB from TraI against the whole TrwC sequence allowed us to identify two putative TS in TrwC sequence, named TS1 and TS2 that were similar to the consensus sequences proposed by Lang and cols, (2010) TraI<sub>R1/F</sub> (G[E/D]R[L/M]R[V/F]T). We have constructed single mutants for TS1 by disrupting the signal (GDTIRIT→AGGAIRIT). In the case of TS2 we performed the same amino acid substitution that was previously done for TraI<sub>R1/F</sub>. For these proteins an exchange of R1344Q was demonstrated to be a molecular determinant for substrate recognition and translocation. As TS2 of TrwC presents also that arginine residue, we decided to mutate R to Q in (GDRMKV→GDQMKV). We have also constructed a double mutant in both TS1 and TS2. These mutants were assayed for TrwC translocation in Cre assay. The results suggest that TS1 (GDTIRIT, TrwC796-802), is relevant for TrwC translocation by its own T4SS.

Protein	Translocation
Cre	-
TrwC <sub>2-966</sub>	+++
Cre-TrwC <sub>2-600</sub>	++
Cre-TrwC <sub>600-966</sub>	+++
Cre-TrwC <sub>705-895</sub>	++
Cre-TrwC <sub>897-966</sub>	+
Cre-TrwC <sub>920-966</sub>	-
Cre-TrwC_TS1	++
Cre-TrwC_TS2	+++
Cre-TrwC_TS1*-TS2	++
Cre-TrwC_TS1 <sup>Δ</sup> -TS2	++

**Table II.** Summary of the results obtained in chapter 3. The first column shows the Cre-TrwC fusions. TrwC fragment were cloned in frame at the 3' end of *cre* gene. CRAFT assay were carried out in the presence of R388 derivative plasmid (pSU2007) to provide the conjugative machinery. Protein translocation rates were estimated as recombinants /donor. According to the values, translocation frequencies are indicated as  $< 1 \times 10^{-07}$  (-);  $1 \times 10^{-06}$  (+);  $1 \times 10^{-05}$

(++);  $1 \times 10^{-04}$  (+++). TS1 (AGGAIRIT) and TS2 (GDRMQV): indicate the mutants obtained in the TS defined in this work.

\* and ^ indicate two versions of the double mutant (TS1+TS2) in TS1, \*AGGAIRIT or ^VGGAIRIT, respectively.

Dr. Anabel Alperi has transferred these mutants to a R388 derivative plasmid and assayed for conjugative transfer and plasmid mobilization to human cells through *Bartonella* VirB/D4 T4SS of *Bh*. Mutations in the putative TS1 of TrwC drastically affected protein translocation during conjugation but did not affect significantly DNA transfer through *Bh* T4SS. In conclusion, TrwC encodes one internal TS, which is recognized by its cognate T4SS, but is recruited by different TS (to be determined) by the effector translocator VirB/D4 of *Bh*.

#### **Section 4.4 The interface between the T4SS and the recipient cell: conjugation to yeast and mitochondria**

The versatility of the T4SS machinery includes the selection of the target cell. We decided to try conjugation into two different recipients: yeast, and isolated mammalian mitochondria.

**a.** *Transfer of BACs from bacteria to yeast: testing the processivity of bacterial conjugation in eukaryotes.*

In our effort to explore the possibilities of using bacterial conjugation as a way to introduce DNA into higher organisms, we decided to test if the processivity of the conjugation mechanism between bacteria could be extended to eukaryotic cells. This point would be relevant in order to transfer long DNA molecules (i.e. including complete genes). Based on the previous knowledge that plasmid DNA can be introduced into yeast by conjugation (Heinemann & Sprague 1989, Bates *et al.*, 1998), we wondered if a molecule of any size, for example a bacterial artificial chromosome (BAC), could also be transferred into yeast in this way. To answer this question we have firstly tested DNA transfer from bacteria to yeast as reported in (Heinemann & Sprague 1989) and we were able to reproduce that experiment. Curiously DNA transfer was not detected when the R388 transfer system was used instead of the RP4 conjugative machinery. Then we constructed conjugative BACs, containing the RP4 *oriT* and the human *frataxin* gene. These BACs were introduced

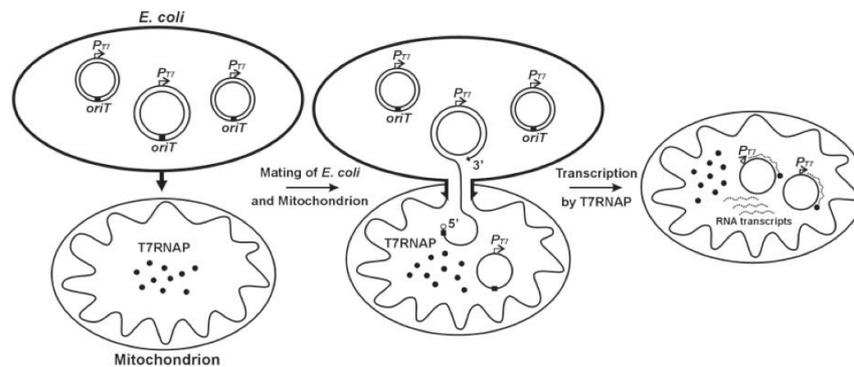
into a donor cell by electroporation and transferred by conjugation between bacteria. Both donor cells and transconjugants containing BACs were checked by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). We found some aberrant species after PFGE analysis; apparently, rearrangements are frequent when working with BACs. However, some transconjugants showed the expected pattern in the PFGE, which means that the conjugative process did not induce changes on BACs structure, other than those obtained by electroporation.

Our efforts to test conjugation from bacteria carrying BAC to yeast did not succeed. A plausible explanation is that the conjugation frequencies observed between bacteria were already unexpectedly low. These difficulties will have to be overcome before we can continue with this approach.

The results indicated that in our laboratory conditions we could reproduce conjugation to yeast using the RP4 system. However, we observed no transfer of DNA using R388 system. These findings emphasize once more the flexibility of the RP4 system to establish conjugative interactions with other surfaces different from the bacterial cell (Bates *et al.*, 1998). These differences can not be related with the nature of the conjugative pilus, since both systems code for P- like *pilus*, which is short, rigid and less flexible than the F -like *pilus* (Lawley *et al.*, 2003, Rees & Wilkins, 1990).

#### ***b. Bacterial conjugation to mitochondria***

We are interested in designing a genomic modification system in organelles such as mitochondria. In collaboration with Professor Eric Schon at Columbia University (NYC, USA), we designed a project of conjugation to mitochondria based on previous work reported by Yoon and Koob, (2005). In their assay they showed DNA transfer from bacteria to isolated mitochondria. The T7 RNA polymerase (T7RNAP) was firstly targeted to mitochondria. These T7RNAP-containing mitochondria were then isolated and mixed with bacteria carrying a mobilizable plasmid with a *GFP* gene under the control of the T7 promoter (**Figure III**). Transcription of the exogenous DNA was detected by RT-PCR following conjugation only when *oriT* was present.



**Figure III.** Conjugation between *E. coli* and mitochondria containing T7 RNA polymerase (T7RNAP). Donor cell contacts a mitochondrion and transfers the conjugative substrate through the T4SS trailed by the relaxase TraI. This protein remains covalently attached to the 5' of cut strand at the *oriT* sequence (black box). T7RNAP then starts transcription from the T7 promoter in the transferred DNA and the newly synthesized RNA transcripts (dotted lines) are assayed by RT-PCR.

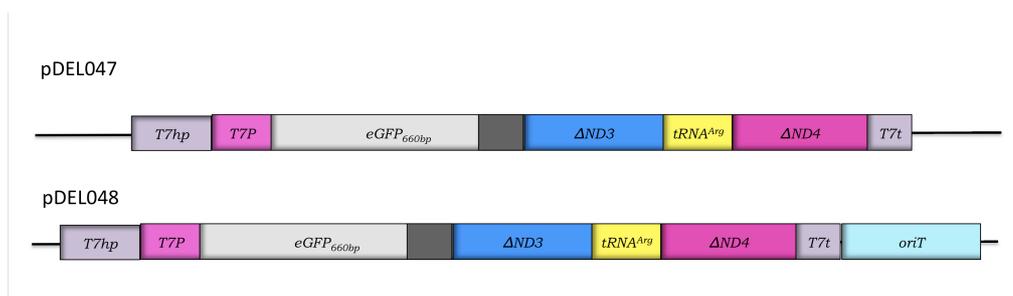
The aim of our collaboration was to join efforts to demonstrate DNA transfer from bacteria to mitochondria *in vivo*, i. e. from the cytoplasm of eukaryotic cells to residing mitochondria. As a first step we decided to optimize the *in vitro* protocol of conjugation, based on that previously report by Yoon and Koob, (2005).

Mitochondria have been showed to be competent for DNA uptake from the extracellular medium and use the imported molecules as a template for RNA transcription (Koulintchenko *et al.*, 2006). Therefore, we designed a more specific assay than that described by Yoon and Koob to confirm that the DNA transfer from bacteria to isolated mitochondria is due to conjugation and not to DNA uptake.

To be certain that the transcripts are synthesized within mitochondria, one possibility is to look for post-transcriptional processing events that can only occur within mitochondria, such as 5' and 3'- endonucleolytic cleavage of tRNA molecules from a polycistronic RNA, followed by maturation of these processed tRNA molecules which involves the addition of CCA at the 3'- terminus. To this end a collaboration with Professor Robert Lightowlers (Newcastle University, upon Thyne, UK) was previously established to obtain a T7 promoter construct that contains the human mitochondrial tRNA of arginine (h-mt-tRNA<sup>Arg</sup>). Conjugation assays using these first constructs showed that the tRNA<sup>Arg</sup> was incompletely processed and matured. For that reason, it was decided to add partial natural flanking sequences of *ND3* and *ND4* genes at the

5' and 3' of the tRNA<sup>Arg</sup>, respectively. We suspect that these sequences would allow a proper clover-leaf formation of the tRNA<sup>Arg</sup>. This structure is presumably required for the processing and maturation of the tRNA molecules by mitochondrial enzymes that work on specific clover leaf structures.

These new constructed plasmids (**Figure IV**) were assayed for conjugation to isolated mitochondria.



**Figure IV.** Mobilizable plasmids constructed to test conjugation between bacteria and mitochondria. pDEL047 (-*oriT*), pDEL048 (+ *oriT*). *T7hp* and *T7P* form the double strand of DNA once the plasmid is mobilized into mitochondria. *eGFP* are partial sequence of *eGFP* gene, thus this protein is not functional. *ΔND3* and *ΔND4*, partial sequence of human mitochondrial genome. tRNA<sup>Arg</sup>, human mitochondria sequence of the arginine tRNA.

We have assayed for mitochondrial processing and maturation of the human tRNA<sup>Arg</sup> using an RNA-circularization assay as in (Koulintchenko *et al.*, 2006). Briefly, if bacteria are able to conjugate to mitochondria, the transferred DNA carrying the T7 promoter will be transcribed within the organelles and the human tRNA<sup>Arg</sup> will be processed and matured. Total RNA was isolated from the mixture of bacteria and isolated mitochondria and circularized using T4 RNA ligase I. The circularized RNA was used as a template for reverse transcription using species-specific primers to tRNA<sup>Arg</sup>. The amplified fragments were subsequently cloned and sequenced to determine if any processing and maturation events were carried out on the transferred exogenous sequences.

The results obtained from this project, although promising, cannot confirm that we have succeeded in getting conjugation between bacteria and mitochondria, so far; i) we have obtained some evidence of conjugation, since processing of RNA has been detected, ii) we can assure that the circularized RNA came from our construct because the partial sequence of *ND3* gene has a polymorphism allowing us to differentiate our construct from other contamination source, iii) but we have also observed a band of about 100 bp in the negative controls (of RT-PCR, PCR and when mitochondria was

mixed with bacteria containing pDEL047 (-*oriT*). Therefore we cannot conclude that we have detected conjugation in an *oriT*-dependent way.

It is worth to mention that concatemer species were only seen on agarose gels for conjugation mixture containing pDEL048 (+*oriT*), and not for the mixture containing pDEL047 (-*oriT*). These findings lead us to think that in spite of having contamination of a 100 pb, it is still possible that conjugation has occurred.

When we looked at the sequence, we have seen that the RNA was incorrectly processed at both 5' and 3'. Considering that nucleotidyl transferase, which is the enzyme in charge of adding CCA at 3' end of the processed tRNA, is a structure specific enzyme, an incorrect tRNA processing would avoid CCA addition. This could be the reason why we could not detect CCA at the incorrect processed tRNA.

In short, at this moment we think that this 100 bp PCR product could have come from HeLa RNA that has been used to set up the circularization assay. Alternatively the bacteria could have produced RNA from our construct without T7 RNA polymerase. Thus, to overcome these problems the next step is to perform a number of negative controls:

- 1) RNA circularization assays using RNA isolated directly from bacteria containing pDEL047 (-*oriT*) and pDEL048 (+*oriT*).

- 2) In order to allow the identification of RNA produced from the exogenous DNA sequences, the same mobilizable plasmids with a point mutation have been constructed.

- 3) We are also thinking to detect the mobilizable plasmid with a specific radioactive marker or by FACS.

Another important step of these assays is the presence of the T7RNAP into the isolated mitochondria. Since Yoon and Koob never demonstrated this presence, Dr. Lim from Schon lab and myself tried to localize this protein in isolated mitochondria. We did western blots and immunofluorescence assays by using commercial and homemade anti- T7RNAP antibody, without any successful results. Since we are still not sure that the mitochondrial targeted T7RNAP is exclusively localized into mitochondria and nowhere else within the cell, future *in vivo* experiments will require isolation of mitochondria prior to RNA extraction and RT-PCR.

If we succeed at conjugating from bacteria to mitochondria within cells in this manner, we could then proceed to modify the mobilizable plasmid with respect to the sequences under the control of the T7 promoter to determine if there is a size restriction to conjugative DNA transfer between bacteria and mitochondria. We could also determine if resident mitochondrial proteins are able to synthesize the complementary strand to the transferred sequences and whether the plasmid can be maintained and transmitted from one generation to the next.

In addition of being a possible way to introduce DNA into organelles, this mechanism will allow us the study different processes such as mitochondrial transcription or translation *in vivo*.

## Outlook

In short, the results obtained in this work underscore the role of the T4CP as a structural independent module of the R388 T4SS machinery. We found a concerted action of lysine residues protruding into the internal channel of TrwB hexamer for substrate translocation. These findings provide the first experimental evidences for the role of this channel in substrate translocation. The current work has also contributed to understand key aspects of coupling proteins and the interactions with both, the relaxosome and the T4SS.

We have also determined the translocation signal of the relaxase TrwC by its own T4SS. The molecular knowledge of these interactions will be the basis for the manipulation of coupling proteins specificity and substrate exchange through different T4SS. In fact, by using an heterologous T4SS, our group has successfully achieved DNA transfer into human cells piloted by the relaxase, TrwC (Fernandez Gonzalez *et al.*, 2011). Using that system, we have also demonstrated that the TrwC-TS is differently recognized by both T4SS, the R388 T4SS and the effector translocator VirB/D4-T4SS of *Bh*.

We have also explored the potential of bacterial conjugation as a universal DNA delivery tool by testing DNA transfer to yeast and mitochondria. No improvements were obtained regarding previous reports on conjugation to yeast. With respect to mitochondria, a project is under way to improve the existing method for DNA transfer to isolated mitochondria, and to assay DNA transfer *in vivo*. Such a tool could ever be used to replace defective mitochondrial genes for therapeutic purposes.

Since TrwC performs site-specific integration of the incoming DNA in bacteria and was shown to have natural targets in the human genome (Agúndez *et al.*, 2012), the long term goal is to join together our findings to develop a tool for genomic modification of the human genome based on the conjugative system of plasmid R388. This tool could be also extensible for manipulating organelles such as mitochondria.

## Conclusions

1. The amount of TrwB in the cell is independent of the presence of the R388 T4SS, suggesting structural independence, and supporting its role as a third functional module of the conjugative machinery.

2. The absence of TrwK affects other Trw proteins levels, and its steady state levels are affected in turn by the absence of the R388 core complex components.

3. The amount of TrwD is affected by the absence of most R388 T4SS components except for the *pilus* component TrwJ. The absence of TrwH generates TrwD accumulation.

4. The *pilus* component TrwJ is undetectable in the absence of any other T4SS component, but its level does not change in the absence of TrwB.

5. When decreased amounts of R388 Trw proteins were detected, complementation with the *Bt* Trw proteins led to recovery of TrwJ levels in all R388 *trw* mutants, whereas TrwD levels were only recovered in the *trwK* mutant.

6. The estimation of TrwB molecules per cell is 3,350 monomers. This amount is much higher than that observed in the RP4 conjugative system.

7. The ATPase activity of TrwB is required for TrwC translocation even in the absence of DNA transfer.

8. A collection of TrwB point mutants has been analyzed. All of them affected in DNA transfer were equally affected in TrwC translocation.

9. The phenotypes of TrwB mutants protruding into the ICH (K275A, K398A and K421A) highlight the importance of this region. While K275A has a negative effect in conjugation/translocation frequencies, mutants K398A and K421A show higher values than the wild type protein.

10. TrwB $\Delta$ N70 derivatives containing these mutations do not change the ability to bind unspecifically supercoiled DNA, neither interaction with TrwA-h.

11. There is a correlation between the conjugative/translocation frequencies and the ATPase values in the presence of TrwA and DNA for TrwB $\Delta$ N70 as well as for its derivative ICH mutants.

12. In the absence of TrwA, DNA transfer is only detected for K421A and especially for K398A, which correlates with the notable increase in ATPase activity.

13. TrwC fragment 705-895 is able to be translocated to the recipient cell, thus it contains a translocation signal.

14. No translocation signal was found in the C-terminus of TrwC.

15. Mutations in the conserved sequence GDTIRIT (796-802 of TrwC) significantly affected translocations frequencies.

16. The R388 conjugative system cannot transfer DNA to yeast under the same experimental conditions in which RP4 derivatives can be transferred to yeast.



## **9. Anexo: publicaciones**



Los resultados obtenidos durante esta tesis se han publicado o esperamos publicarlos en breve en los siguientes manuscritos en preparación.

1) Los resultados de la Sección 4.1 han sido enviados para su publicación a la revista *Plasmid* en diciembre de 2012 con el título "*Structural independence of conjugative coupling protein TrwB from its Type IV secretion machinery*". **Delfina Larrea**, Héctor D. de Paz, Iñaki Aréchaga, Fernando de la Cruz, y Matxalen Llosa.

2) Los resultados de la Sección 4.2.1 han sido publicados en el artículo que se adjunta en este anexo, "*Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB*". Héctor de Paz, **Delfina Larrea**, Sandra Zunzunegui, Christoph Dehio, Fernando de la Cruz, y Matxalen Llosa. *J Bacteriol* (2010) 192(11), 2655-2669.

3) Los resultados de la Sección 4.2.3 prevemos publicarlos en breve en el manuscrito en preparación con el título "*Role of the internal channel of the TrwB hexamer in bacterial conjugation*". **Delfina Larrea**, Héctor D. de Paz, Inmaculada Matilla, Fernando de la Cruz, Elena Cabezón, y Matxalen Llosa.

4) Los resultados de la Sección 4.3 prevemos publicarlos en breve en el manuscrito en preparación con el título "*Type IV translocation signals in conjugative relaxase TrwC*". Anabel Alperi\*, **Delfina Larrea\***, Esther Fernández-González, Silvia Lang, Christoph Dehio, Ellen Zechner, y Matxalen Llosa. (\*ambas autoras contribuyeron igualmente a este trabajo).

