



GRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor/a:

Director/a:

Co-director/a:

Santander,

Índice

Resumen	2
Abstract	2
Palabras clave	2
Keywords	2
Resumen Gráfico	3
Introducción	4
Resultados	5
Secuenciación del plásmido pGEX-3X:: <i>trwB</i> Δ N75	5
Purificación de la proteína GST-TrwB	6
Ensayo de interacción GST-TrwB/TrwC	7
Estudio estructural del complejo GST-TrwB/TrwC	7
Discusión	8
Metodología	9
Cepas bacterianas	9
Extracción y secuenciación del ADN plasmídico	9
Purificación de GST-TrwB	10
Análisis de interacciones proteína-proteína	11
Análisis estructural por Microscopía Electrónica (ME)	11
Análisis estructural por Cristalografía	11
Agradecimientos	12
Bibliografía	13
Pies de Figuras	15
Pies de Figuras de la Información Suplementaria	17

Análisis Bioquímico y Estructural del proceso de transferencia de genes de resistencia a antibióticos y búsqueda de inhibidores

Adrián Fernández Lavín¹, Ignacio Arechaga Iturregui^{1*} & Elena Cabezón Navarro^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular e Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria - CSIC, Santander, España

*Autor para la correspondencia

Correo electrónico: arechagai@unican.es & cabezone@unican.es

Resumen

La aparición y propagación de mecanismos de resistencia a los antibióticos es un problema cada vez mayor para la salud pública, ya que limita las opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones bacterianas, reduciendo la eficacia clínica y elevando los costos de tratamiento y la mortalidad. La resistencia a los antibióticos puede surgir por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia a través de mecanismos de transferencia genética horizontal, especialmente por conjugación. En bacterias Gram-negativas, la conjugación es mediada por un sistema de secreción tipo IV. Con el fin de estudiar este proceso, durante estos meses se han llevado a cabo una serie de experimentos centrados en la purificación y estudio de la interacción de dos proteínas clave en el proceso: TrwC y TrwB, usando como modelo el plásmido conjugativo R388. Con ambas proteínas purificadas mediante técnicas de cromatografía, se han realizado varios ensayos de interacción, con el propósito de caracterizar este complejo proteico a nivel estructural, por microscopía electrónica y cristalografía. Comprender el mecanismo a nivel molecular es crucial para poder desarrollar estrategias que combatan la propagación de genes de resistencia en poblaciones bacterianas.

Abstract

The emergence and spread of antibiotic resistance is a growing public health problem, as it limits therapeutic options for infections caused by these microorganisms, reduces clinical efficacy, and increases treatment costs and mortality. Antibiotic resistance can arise from mutations or the acquisition of resistance genes through mechanisms of horizontal gene transfer, especially conjugation. In Gram-negative bacteria, this is mediated by a type IV secretion system. In this work, a series of experiments focused on the purification of two key proteins in this process, TrwC and TrwB, has been conducted using the R388 plasmid as a model. With both proteins purified by means of chromatography techniques, several interaction assays were performed to characterize the protein complex at a structural level, using electron microscopy and crystallography. Understanding these interactions at a structural level is crucial for developing new strategies to combat the spread of antibiotic resistance genes.

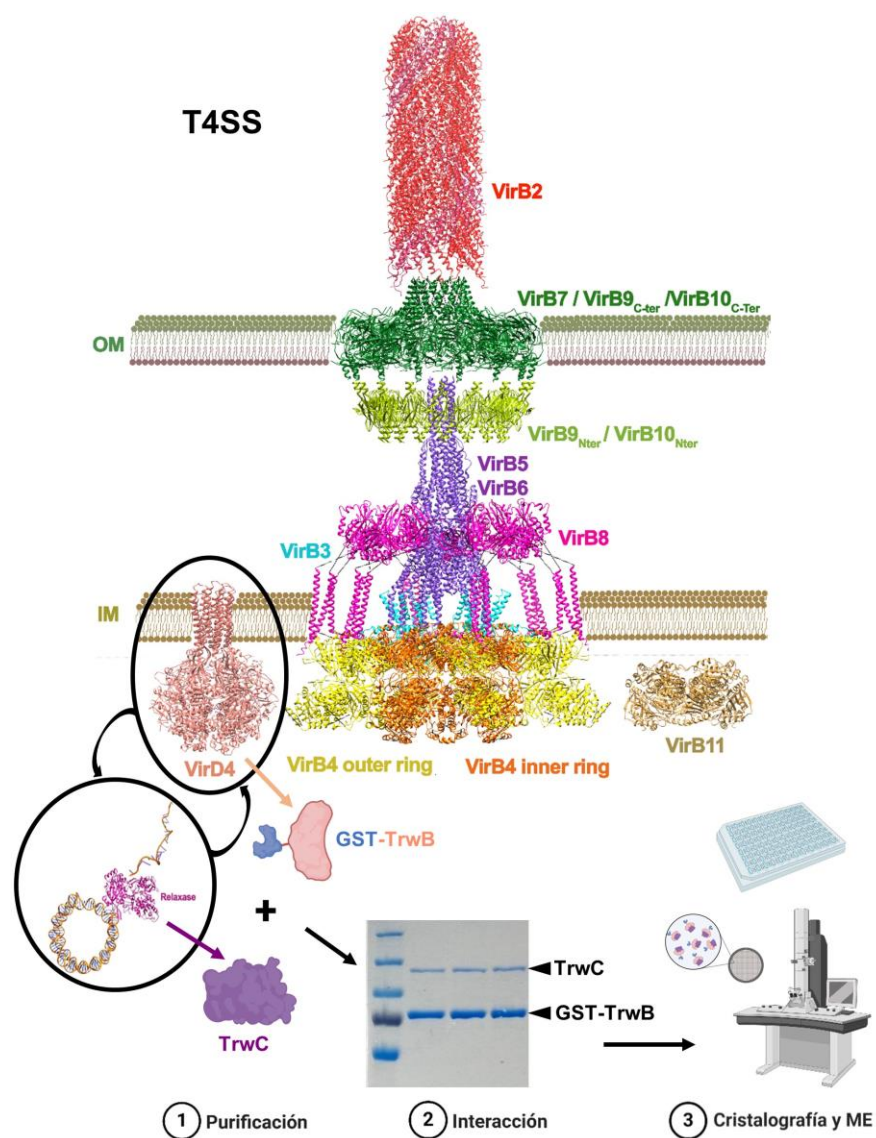
Palabras clave

Resistencia a antibióticos, sistemas de secreción, conjugación bacteriana, purificación de proteínas, biología estructural

Keywords

Antibiotic resistance, secretion systems, bacterial conjugation, protein purification, structural biology

60 Resumen Gráfico



Introducción

Si bien el descubrimiento de los antibióticos revolucionó el campo de la medicina, su producción y uso a gran escala ha tenido efectos generalizados en la biosfera microbiana. El uso abusivo de antibióticos ha generado una gran presión de selección sobre las poblaciones bacterianas en todos los entornos expuestos, dando lugar a la aparición de microorganismos multirresistentes. El desarrollo de nuevos antibióticos no puede seguir el ritmo a la emergencia de dichos microorganismos, lo que hace necesario buscar otros enfoques para abordar esta compleja situación.

Las principales vías por las cuales pueden surgir nuevas bacterias resistentes a los antibióticos son las mutaciones espontáneas y los mecanismos de transferencia genética horizontal¹⁻⁷. Concretamente, la transferencia genética horizontal puede provocar la propagación de la resistencia a los antibióticos desde especies comensales y ambientales hacia patógenos, como se ha demostrado en algunos genes de resistencia a los antibióticos (ARG) clínicamente importantes. De los tres mecanismos canónicos de transferencia genética horizontal, se considera que la conjugación tiene la mayor influencia en la diseminación de los ARG⁴.

En las bacterias Gram-negativas, la conjugación es mediada por un gran complejo macromolecular, el sistema de secreción tipo IV conjugativo (T4SS), producido por la bacteria donadora e insertado tanto en su membrana externa como en la interna. Los sistemas de secreción tipo IV están involucrados no solo en la conjugación bacteriana, sino también en el transporte de factores de virulencia por bacterias patógenas. Estos sistemas operan a través de un mecanismo de un solo paso. Los sustratos secretados (proteínas o complejos de nucleoproteínas en el caso de los sistemas conjugativos tipo IV) son guiados hacia la base del canal de secreción y se translocan directamente al interior de la célula huésped en un estado desplegado dependiente de ATP⁸.

Los sistemas de secreción de tipo IV (T4SS) suelen estar codificados en plásmidos conjugativos y los más sencillos están compuestos por 12 proteínas, denominadas VirB1 a VirB11 y VirD4 (TrwB en el plásmido R388 utilizado en este proyecto). Tres de estas proteínas, VirB4 (TrwK), VirB11 (TrwD) y VirD4 (TrwB), funcionan como ATPasas que proporcionan energía al sistema. Tres proteínas más, VirB7 (TrwH), VirB9 (TrwF) y VirB10 (TrwE), forman el complejo central de la membrana externa (OMCC). Las demás proteínas, excepto VirB2/TrwL, que forma el pilus conjugativo, y VirB5/TrwJ, que se localiza en la punta del *pilus*, se ensamblan para formar tres subcomplejos adicionales, según lo revelado por Macé et al. (2022)². Para más detalles, véase la Figura 1.

La conjugación se inicia por una proteína específica codificada por el plásmido conjugativo, que reconoce una secuencia de ADN en el plásmido, en el origen de transferencia u *oriT*. Tras una escisión nucleofílica, para la cual es necesaria la ayuda de otras proteínas accesorias que forman el relaxosoma (TrwA e IHF)⁷, queda unida covalentemente al ADN. Esta proteína, llamada relaxasa (TrwC en el plásmido R388), se transporta a través de las membranas de las células

donadora y receptora unida covalentemente al ADN conjugativo. Este proceso se lleva a cabo con la ayuda de otra ATPasa conocida como proteína de acoplamiento (TrwB en el plásmido R388). TrwB es una ATPasa hexamérica, capaz de acoplar la energía liberada por la hidrólisis del ATP al bombeo de la copia de ADN de cadena sencilla a través del canal de secreción, de forma que el complejo nucleoproteico formado por el ADN conjugativo y la relaxasa atravesará las membranas de la célula donadora y será translocado a la receptora⁵.

En este proyecto se han realizado varios ensayos de interacción entre TrwB y TrwC con el propósito de caracterizar este complejo proteico a nivel estructural usando microscopía electrónica y cristalografía, con el fin último de diseñar un mecanismo que pueda inhibir esta interacción e intervenir así en el mecanismo de diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

Resultados

La co-elución y posible interacción entre las proteínas TrwB y TrwC ha sido previamente demostrada³. En este proyecto, se han reproducido los ensayos a mayor escala, con el fin de caracterizar la interacción entre ambas proteínas desde un punto de vista estructural, por microscopía electrónica y cristalografía.

Secuenciación del plásmido pGEX-3X::*trwB*ΔN75

TrwB es una proteína integral de membrana. Con el fin de facilitar su estudio *in vitro*, se utilizó una versión soluble de la misma, consistente en una delección de los primeros 75 aminoácidos fusionada a un *tag* de glutatión S-transferasa (GST) en su extremo amino terminal. La proteína resultante de esta construcción es GST-TrwBΔN75 (en adelante GST-TrwB).

Como paso inicial, se llevó a cabo la comprobación de la secuencia del plásmido pGEX-3X::*trwB*ΔN75 (denominado pMTX501³), que codifica dicha proteína, con el objetivo de descartar la aparición de mutaciones que hubieran podido alterar la estructura de la proteína de interés.

Para ello, se realizó la extracción del ADN plasmídico como se indica en la sección de Metodología y se diseñaron varios *primers* que abarcaran la secuencia completa de la proteína. Los resultados de secuenciación (Figura S1) fueron comprobados mediante la herramienta *Chromas*, observándose una excelente calidad de lectura. La secuencia resultante fue alineada en *SnapGene* con la obtenida al insertar la secuencia de GST-TrwBΔN75 en el vector pGEX-3X. Se observó una única mutación silenciosa en la posición 1121 del constructo (c.1121C>G (p.Thr374Thr)).

Purificación de la proteína GST-TrwB

Para la incubación de ambas proteínas y posterior estudio de su interacción, fue necesario disponer de muestras aisladas e independientes de cada una de ellas. En este proyecto, se contaba con muestras de TrwC previamente purificadas y congeladas por otros miembros del grupo de investigación, por lo que se puso el foco exclusivamente en la purificación de la proteína de fusión GST-TrwB.

En primer lugar, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (C41) mediante electroporación y se cultivaron para inducir la sobreexpresión de la proteína de interés. Las muestras fueron lisadas en distintos tampones (tampón de lisis 1 y 2 en la sección de Metodología) y sometidas a cromatografía de afinidad utilizando una columna GSTrap de 1 ml (Cytiva Life Sciences™), tal y como se indica en la sección de Metodología. Esta columna atrapa la proteína GST, permitiendo así la separación de la proteína de fusión del resto de proteínas celulares (Figura 2). Como muestra la figura, en la elución también aparecen restos de proteína GST (sin TrwB) procedentes de la rotura de la proteína de fusión, por lo que es necesario llevar a cabo otro paso de purificación con el fin de separar ambas poblaciones.

En un segundo paso de purificación, las fracciones que contenían GST-TrwB (fracciones 9 – 20 de la Figura 2) se combinaron y concentraron en centricones (Amicon Ultra 15 - 10K, Merck Millipore) hasta un volumen final de 500 µl. Esta muestra se sometió a cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex-200 (Cytiva Life Sciences™ Superdex™200 10/300 GL 24ml) con tampón S200 (Metodología), para separar las proteínas en función de su tamaño molecular, obteniendo muestras puras de GST-TrwB aislada (Figura 3).

Al cargar la muestra en la columna S200 se observa la elución de la misma en dos picos principales. Un primer pico, con un volumen de elución (V_e) de 12 ml, que corresponde a la proteína GST-TrwB (MW teórica 72 kDa), tal y como muestra la electroforesis en gel del panel B de la misma figura. El segundo pico observado corresponde a la proteína GST sola, con un volumen de elución de 13,1 ml (MW teórica 25,5 kDa). La columna había sido previamente calibrada con patrones de diferente peso molecular (apoferritina (443 kDa), amilasa (200 kDa), BSA (66 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa), lo que permite estimar el peso molecular asociado a cada pico de elución. Según esta calibración, el primer pico observado con GST-TrwB correspondería a una proteína con un tamaño aproximado de 226 kDa. Este tamaño, en comparación con la masa molecular teórica de la proteína (72 kDa), sugiere que la proteína está presente en un estado oligomérico, posiblemente como un trímero. Es importante señalar que las condiciones en las que se cargó la muestra en la columna difieren ligeramente de las empleadas en la calibración de la misma, por lo que se necesitan nuevos experimentos para poder determinar el estado oligomérico. En concreto, se enviarán muestras para su análisis por ultracentrifugación analítica, técnica más adecuada para resolver el estado oligomérico de una proteína.

Ensayo de interacción GST-TrwB/TrwC

El objetivo de este experimento es reproducir a mayor escala los resultados de co-elución y posible interacción entre las proteínas TrwB y TrwC reportados anteriormente³, con el fin de caracterizar esta interacción desde un punto de vista estructural. Con este propósito, se incubaron juntas muestras purificadas de cada proteína para favorecer la interacción y se sometió la mezcla a cromatografía de afinidad.

Para confirmar que la co-elución de GST-TrwB y TrwC no se debía a la adherencia de TrwC a la columna, se realizó previamente una cromatografía de afinidad con TrwC en las mismas condiciones que se hizo con GST-TrwB (ver apartado anterior), utilizando una muestra purificada de TrwC (61 μ M) en tampón S200 TrwC. En la figura suplementaria 2 se observa que toda la muestra de TrwC eluye en las primeras fracciones, correspondientes al lavado de la columna. Esto demuestra que TrwC no queda adherida a la columna. Por lo tanto, si se produjera una co-elución de ambas proteínas, se debería a una interacción entre ellas.

Una vez comprobado el punto anterior (Figura S2), la muestra de TrwC purificada (59 μ M) en tampón S200 TrwC, 300 mM de NaCl, se diluyó con Pipes (pH 6,2) para poder reducir la concentración de NaCl a 150 mM. A continuación, se añadió la muestra de GST-TrwB purificada (41 μ M) en tampón B, 100 mM de NaCl. Finalmente, la mezcla se llevó a un volumen final de 1 ml (concentraciones finales de proteína: 15 μ M de TrwC, 10 μ M de GST-TrwB). El motivo principal de llevar a cabo estas diluciones es que la interacción entre ambas proteínas es muy sensible a la concentración de sal³, por lo que se ajustó finalmente a 80 mM. Posteriormente, ambas proteínas se incubaron juntas durante una hora a temperatura ambiente y la muestra se cargó en una columna GSTrap de 1 ml. Se realizó una cromatografía de afinidad, tal y como se describe en el apartado de Metodología, realizando un lavado extenso de 10 ml hasta asegurar que no quedaban restos de proteína TrwC libre en la columna. Las fracciones obtenidas se cargaron en un gel SDS-PAGE al 8%, teñido con *BlueSafe* (Figura 4), comprobándose que ambas proteínas coelúan y demostrando su interacción. Se seleccionaron las fracciones que contenían el complejo GST-TrwB/TrwC, se combinaron, concentraron y posteriormente se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford, con el objetivo de obtener muestras adecuadas para su visualización mediante microscopía electrónica y cristalografía.

Estudio estructural del complejo GST-TrwB/TrwC

Las muestras del posible complejo GST-TrwB/TrwC eluidas de la columna anterior fueron analizadas por microscopía electrónica. Tras cuantificar la concentración de las muestras, se prepararon alícuotas a una concentración de 0,1 mg/ml. Se aplicó 5 μ l de esta muestra a rejillas de microscopía electrónica con carbono (Agar) tratadas con plasma (*Glow discharge*) previamente a su uso. Estas rejillas fueron analizadas en un microscopio electrónico JEOL-1100 y se tomaron imágenes como las que se muestran en la Figura 5 (panel A). El tamaño

de las partículas es compatible con el de un complejo GST-TrwB/TrwC. Sin embargo, al no poder estimar la estequiometría de esta mezcla ternaria por filtración en gel (el complejo se separa) es difícil controlar la homogeneidad de la muestra, paso clave para el análisis de imagen y reconstrucción tridimensional del complejo.

Como aproximación alternativa en el estudio estructural del complejo proteico, se prepararon también placas de cristalografía, tal y como se indica en el apartado de Metodología. Se utilizaron placas de 96 pocillos (*MRC 96-Well 2-Drop Crystallization plate, Molecular Dimensions*) y se observaron las muestras de forma continuada en los días siguientes a su preparación, utilizando un microscopio óptico de luz polarizada (*Stereo Microscope Leica MZ16*). Tal y como muestra el panel B de la Figura 5, se obtuvieron pequeños cristales en la condición C4 (20% w/v PEG 3350, 0,2 M Tartrato de Potasio Tetrahidratado). Estos cristales han crecido principalmente en dos dimensiones. Sin embargo, su reducido tamaño y la gran cantidad de precipitado proteico que los rodea hacen especialmente complicada su manipulación para llevarlos al sincrotrón para su difracción. Por ende, se repetirán estos experimentos, variando ligeramente la concentración de proteína y de los agentes precipitantes (PEG y tartrato potásico), con el objetivo de optimizar la muestra.

Discusión

En este proyecto, se han realizado diversos experimentos con el objetivo de caracterizar la interacción estructural entre las proteínas TrwB y TrwC, utilizando técnicas de microscopía electrónica y cristalografía. Los resultados obtenidos proporcionan una visión detallada de la complejidad y las dificultades inherentes al estudio de estos complejos proteicos.

La co-elución observada de TrwB y TrwC durante los experimentos de cromatografía sugiere una posible interacción entre ambas proteínas. Sin embargo, este hallazgo plantea varias preguntas sobre la naturaleza y la estabilidad de esta interacción. La co-elución indica que las proteínas pueden estar formando un complejo estable, pero no proporciona información sobre la estequiometría del complejo ni sobre las condiciones exactas que favorecen esta interacción. Un cálculo aproximado de las concentraciones de estas proteínas en la co-elución (Figura S3) parece indicar una estequiometría 3:1 (TrwB:TrwC). La dificultad para obtener valores más exactos con esta aproximación subraya la necesidad de utilizar métodos más robustos para estudiar estas interacciones, como, por ejemplo, la ultracentrifugación analítica.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica muestran partículas cuyo tamaño es compatible con el complejo GST-TrwB/TrwC. Este resultado es alentador, ya que apoya la hipótesis de que ambas proteínas interactúan de manera específica. Sin embargo, la homogeneidad de la muestra sigue siendo un desafío crucial. La variabilidad en la preparación de las muestras y la incapacidad para controlar completamente la estequiometría complican el análisis de las imágenes y la posterior reconstrucción tridimensional del complejo.

Aunque se ha avanzado en la purificación de las proteínas y en la obtención de datos preliminares de interacción, los intentos de cristalización no han proporcionado resultados concluyentes hasta el momento. La obtención de cristales de alta calidad es esencial para la resolución de estructuras a nivel atómico, y los problemas encontrados en este proyecto reflejan las dificultades comunes en este tipo de estudios. Se precisa optimizar las condiciones de cristalización encontradas para poder crecer cristales de mayor calidad que permitan su posterior difracción y análisis en el sincrotrón.

Para avanzar en la comprensión de la interacción entre TrwB y TrwC, será necesario implementar enfoques complementarios. La realización de estudios de mutagénesis dirigidos podría ayudar a identificar los residuos críticos para la interacción y mejorar la estabilidad del complejo. En este sentido, la reciente versión de *AlphaFold* que acaba de hacerse pública (*AlphaFold Server, powered by AlphaFold 3*) ha posibilitado realizar una predicción de la interacción entre ambas proteínas. La Figura 6 muestra el resultado de dicha predicción, indicando en detalle las cadenas laterales de los amino ácidos implicados en ambas proteínas. Un posterior análisis de esta interacción utilizando la herramienta PISA (*PDBePISA*) ha proporcionado el detalle de las distancias y residuos implicados, mostrándose en el panel C de esa misma figura.

En conclusión, aunque se han logrado progresos significativos en la caracterización preliminar de la interacción entre TrwB y TrwC, se requieren esfuerzos adicionales para superar las limitaciones actuales y obtener una comprensión más completa de este sistema proteico. Estos estudios no solo contribuirán al conocimiento básico de los sistemas de secreción tipo IV, sino que también podrían tener implicaciones importantes para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra la resistencia a los antibióticos.

Metodología

Cepas bacterianas

La cepa DH5 α de *Escherichia coli*⁹⁻¹² se usó para almacenar el plásmido pMTX501 (pGEX-3X::*trwB* Δ N75), mientras que para sobre-expresar la proteína GST-TrwB Δ N75 se empleó la cepa C41¹³⁻¹⁵. Además, se llevó a cabo un estudio de antibiogramas para verificar la resistencia a los antibióticos esperada en las células utilizadas para la conservación del plásmido (cepa DH5 α). Estas células son resistentes al ácido nalidíxico y el plásmido confiere resistencia a ampicilina. Se testaron seis antibióticos: Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CHL), Kanamicina (KNM), Ácido nalidíxico (NAL), Estreptomicina (SMN) y Trimetropin (TMP), encontrando las resistencias esperadas a AMP y NAL.

Extracción y secuenciación del ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico, se inoculó un matraz de 10 ml de medio LB + 10 μ l de ampicilina con 10 μ l de un glicerol de células DH5 α conteniendo el plásmido de interés. Se dejó incubar a 37°C en agitación *overnight* y al día

siguiente la muestra se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 minutos. Para la extracción se empleó el kit *GeneJET Plasmid Miniprep* (Thermoscientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eluir el ADN plasmídico se añadió 50 µl de agua MilliQ a la membrana de la columna, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó finalmente a 13.400 rpm durante 2 minutos. La muestra recogida se cuantificó en el Nanodrop, midiendo la absorbancia a 260 y la relación 260/280.

Para comprobar la secuencia del plásmido, se diseñaron los siguientes *primers*: FW1_pMTX501 (5' CTGGCAAGCCACGTTTGGT 3'), FW2_pMTX501 (5' TGATCTCCGCATGGGTTGACG 3') y Reverse_pMTX501 (5' GGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCA 3'). Las muestras para cada reacción se prepararon de forma independiente, añadiendo 10 µl del ADN plasmídico (127 ng/µl) y 3 µl del oligonucleótido (10 µM). Los resultados de secuenciación por el método de Sanger (StabVida) fueron analizados con *Chromas* y *SnapGene*.

Purificación de GST-TrwB

La proteína GST-TrwB se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna GSTrap (*Cytiva Life Sciences™ GSTrap™ 4B 1ml*), seguida de cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex-200 (*Cytiva Life Sciences™ Superdex™200 10/300 GL 24ml*). Los eluidos obtenidos se analizaron en geles SDS-PAGE al 12%, teñidos con BlueSafe.

Las cepa C41 de *E. coli* conteniendo el plásmido pMTX501³ fue sobreexpresada con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en 2 litros de LB con agitación a 37°C durante 5 horas. Se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en tampón de Lisis 1 (50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10% Sacarosa, 0,001% PMSF, pastilla de inhibidores de proteasas, 50 mg Lisozima) y, tras una incubación de 30 minutos en hielo, se les añadió el tampón de Lisis 2 (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 0,5% Tritón X-100, 0,001% PMSF). Los lisados se centrifugaron a 40.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se cargó mediante bomba peristáltica en una columna de afinidad GSTrap de 1ml.

La cromatografía de afinidad se realizó en tampón A (50 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,001% PMSF), eluyendo las proteínas con un gradiente de 0 a 100% de tampón B (similar al tampón A pero con 20 mM Glutación). La elución se realizó en 5 volúmenes de columna (5 ml), a un flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 500 µl.

Para la elución de las proteínas en la cromatografía de gel filtración, se equilibró la columna con tampón S200 (50 mM Pipes pH 6,2, 0,1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,001% PMSF). Las fracciones se recogieron en volúmenes de 300 µl a un flujo de 0,3 ml/min durante un volumen de columna (24 ml). Se tomaron 5 µl de cada una de ellas para cuantificar la concentración mediante el ensayo de Bradford y se congeló el resto añadiendo glicerol 5% para su almacenamiento a -80°C hasta su posterior uso.

Análisis de interacciones proteína-proteína

Se empleó una muestra de TrwC purificada y congelada por otros miembros del grupo de investigación previamente en tampón S200 TrwC (50mM Tris pH 7,5, 0,1mM EDTA, 300mM NaCl, 0,001% PMSF y 10% Glicerol). Se concentró en centricones (*Amicon Ultra 0,5 ml - 3K, Merck Millipore*).

Las proteínas TrwC (15 μ M) y TrwB-GST (10 μ M) fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón Pipes (pH 6,2) y la muestra se sometió a cromatografía de afinidad en una columna GSTrap. Se lavó la columna con 10 ml para asegurar que no quedaban restos de TrwC libre en la columna y se eluyó con un gradiente isocrático (100% de tampón B, 20 mM Glutación) en 10 ml. Las diferentes fracciones obtenidas se cargaron en geles de SDS-PAGE (8%) teñidos con *BlueSafe* y se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford. Se tomaron 20 μ l para preparar rejillas para microscopía electrónica de tinción negativa y se congeló el resto añadiendo glicerol 5% para su almacenamiento a -80°C hasta su posterior uso.

Análisis estructural por Microscopía Electrónica (ME)

La preparación de rejillas para microscopía electrónica de tinción negativa requiere generar una hidrofiliidad que permita la adherencia de la muestra proteica a la rejilla, para lo cual se colocaron las rejillas sobre un portaobjetos cubierto de parafilm en una placa de Petri sin tapa y se introdujeron en el equipo *Emitech K100X Glow Discharge System Surface Plasma Cleaning with Edwards Pump*. Posteriormente, se añadió 5 μ l de cada una de las muestras (0,1 mg/ml) a la rejilla y se dejó incubar durante 1 minuto. Transcurrido ese tiempo, se retiró el exceso de muestra mediante capilaridad con papel Whatman y se lavó con 5 μ l de agua MilliQ. Se añadió el agente de tinción (5 μ l de acetato de uranilo 2 %) y se dejó incubar durante 1 minuto, para retirar posteriormente el exceso mediante capilaridad con papel de filtro. Las muestras se almacenaron en un rejillero hasta su visualización en un Microscopio JEOL 1100 (IDIVAL), dotado de una cámara Orius SC1000 (GATAN). Las imágenes fueron tomadas a una magnificación x 150.000.

Análisis estructural por Cristalografía

Las fracciones del complejo proteico GST-TrwB/TrwC obtenidas de la cromatografía de afinidad se combinaron y concentraron en centricones (*Amicon Ultra 0,5 ml - 10K, Merck Millipore*) para tratar de obtener una muestra a una concentración adecuada para la preparación de placas de cristalografía. La concentración máxima de complejo que se pudo conseguir fue de 7 mg/ml. A partir de 75 μ l de esta muestra se preparó una placa de cristalización de *sitting drop* de 96 pocillos (*MRC 96-Well 2-Drop Crystallization plate, Molecular Dimensions*) en la que se probaron 96 tipos de precipitante, utilizando para ello un kit comercial (*SG1 screen, Molecular Dimensions*). En cada condición se añadió 50 μ l de precipitante en el reservorio y se mezcló en cada pocillo 1 μ l de muestra con 1 μ l de agente precipitante.

Agradecimientos

Por supuesto, quería comenzar dando las gracias a mi familia, a mis padres, porque si no fuera por ellos no estaría escribiendo esto ahora mismo. Gracias por la educación que me habéis dado y la formación que me habéis permitido, pero sobre todo, gracias por los valores que me habéis inculcado y, fuera del ámbito científico, gracias por enseñarme a ser una buena persona.

A tati, por ser una referencia como hermana mayor y de la que he aprendido un montón de cosas. Estoy seguro de que vas a vivir la vida que quieres, vas a viajar mucho y grabar un montón de documentales, defendiendo todas las causas que te parecen humanas en este mundo tan loco. Aunque ya no estés en casita, me alegra poder contar contigo para lo que sea y ayudarte en lo que pueda, como siempre he hecho y seguiré haciendo. Te quiero hermanita.

A mis abuelos, por estar en cada etapa de mi vida animándome a dar lo mejor de mí. Siento no haber podido verlos tanto como me gustaría durante estos últimos meses, aunque por desgracia el resto de la carrera tampoco ha sido muy distinto. Me gustaría poder devolverlos algún día todo lo que me habéis dado. Con mucho cariño, el chinín de güelo.

Al resto de mi familia, por aguantar que esté siempre tan ocupado y con cosas pendientes. A mis tíos Elva y Samuel, que se mudaron hace no tanto para estar más cerquita de nosotros, cuidarnos y dejarnos cuidarles. Agradezco haber podido compartir mi vida contigo y acompañarte en el final de la tuya, por todos tus consejos y apoyo incondicional. Te quiero y te echo de menos tío Samuel.

A mi pareja, Sofía, por haber aguantado tanto, especialmente estos últimos meses con el fin de la carrera y todo lo que ello ha involucrado. Por entender la situación y entenderme a mí, por ayudarme en lo que ha podido, por apoyarme desde el primer momento y, sobre todo, por quererme.

A mis amigos más cercanos, sin dar nombres para evitar que se me escape alguien. Gracias por tantos años, por lo que me habéis aportado todos y cada uno de vosotros y por enseñarme a ver las cosas desde otras perspectivas.

Quería terminar los agradecimientos con Elena e Iñaki, mi directora y codirector del TFG. Gracias por supervisar este proyecto, por estar pendientes de mí y preocuparos por los avances. Gracias por tanta ayuda, por estar siempre disponibles y por hacer de esta experiencia de prácticas algo tan positivo para mi formación. Gracias por dejarme participar en este proyecto con vosotros. Ha sido un placer. Tampoco me olvido de Tamara, a la que quería agradecer especialmente por haberme enseñado tantas cosas, por haberme explicado otras muchas y por toda la paciencia que ha tenido conmigo estos meses. Espero no haberte vuelto demasiado loca y agradezco con mucho cariño todo lo que me has ayudado, con el trabajo, tiempo y esfuerzo extra que te ha supuesto.

Gracias a todos, de corazón.

Bibliografía

1. Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., and Cruz, F. de la (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology* 45, 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x>.
2. Macé, K., Vadakkepat, A.K., Redzej, A., Lukyanova, N., Oomen, C., Braun, N., Ukleja, M., Lu, F., Costa, T.R.D., Orlova, E.V., et al. (2022). Cryo-EM structure of a type IV secretion system. *Nature* 607, 191–196. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04859-y>.
3. Llosa, M., Zunzunegui, S., and De La Cruz, F. (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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1830264100>.
4. Von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., Van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., Van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., and Wolfs, P.F.G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
5. Carranza, G., Menguiano, T., Valenzuela-Gómez, F., García-Cazorla, Y., Cabezón, E., and Arechaga, I. (2021). Monitoring Bacterial Conjugation by Optical Microscopy. *Front. Microbiol.* 12, 750200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750200>.
6. Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., De La Cruz, F., and Arechaga, I. (2014). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>.
7. Cabezón, E., and De La Cruz, F. (2006). TrwB: An F1-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Research in Microbiology* 157, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.12.002>.
8. Cabezón, E., Valenzuela-Gómez, F., and Arechaga, I. (2023). Primary architecture and energy requirements of Type III and Type IV secretion systems. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1255852. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1255852>.
9. Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645–4649. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4645>.
10. Siguret, V., Ribba, A.S., Chérel, G., Meyer, D., and Piétu, G. (1994). Effect of plasmid size on transformation efficiency by electroporation of *Escherichia coli* DH5 alpha. *Biotechniques* 16, 422–426.

- 528 11. Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency
529 transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16,
530 6127–6145. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>.
- 531 12. Signoretto, C., and Canepari, P. (1996). Simpler peptidoglycan chemical
532 composition in the highly transformant *Escherichia coli* DH5 alpha strain. *New*
533 *Microbiol* 19, 211–220.
- 534 13. Ni, Z., Li, Z., Wu, J., Ge, Y., Liao, Y., Yuan, L., Chen, X., and Yao, J.
535 (2020). Multi-Path Optimization for Efficient Production of 2'-Fucosyllactose in
536 an Engineered *Escherichia coli* C41 (DE3) Derivative. *Front Bioeng Biotechnol*
537 8, 611900. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.611900>.
- 538 14. Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in
539 *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins
540 and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289–298.
541 <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0399>.
- 542 15. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., and Vuillard, L. (2004). The toxicity of
543 recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in
544 BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* 37, 203–206.
545 <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.025>.
- 546

Pies de Figuras

Figura 1. Sistema de secreción de Tipo IV. (A) Estructura del T4SS (tomada de Cabezón et al.(2023)⁸. **(B)** Modelo del mecanismo conjugativo en R388 (tomada de Cabezón et al.(2023)⁸. La conjugación bacteriana se desencadena por una señal (probablemente el contacto con una célula receptora), lo que induce la unión de la relaxasa (TrwC en R388) al plásmido conjugativo. Después de cortar el ADN, la relaxasa permanece unida covalentemente al ADN, que es desenrollado por el dominio helicasa dentro de la misma proteína. El procesamiento del ADN requiere la ayuda la proteína de acoplamiento (VirD4/TrwB), que presenta el sustrato nucleoproteico en la base del canal para su transporte.

Figura 2. Cromatografía de afinidad en el primer paso de purificación de GST-TrwB. (A) Perfil de elución obtenido al cargar en una columna GSTrap el lisado obtenido tras inducir la sobreexpresión de la proteína en células C41 (pMTX501). Se representa la absorbancia a 280 nm frente al volumen de elución. La línea verde muestra el porcentaje de concentración del tampón de elución (tampón B). **(B)** Gel SDS-PAGE al 12%, teñido con BlueSafe, de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad: MW, marcadores de peso molecular (kDa); S, sobrenadante tras ultracentrifugación, FL, *flow-through*. Los números 9, 11, 15 y 18 corresponden a las fracciones con el mismo número obtenidas en la cromatografía de afinidad. La posición de las proteínas GST-TrwB (71,9 kDa) y GST (25,5 kDa) se ha señalado con una flecha.

Figura 3. Cromatografía gel filtración en el segundo paso de purificación de GST-TrwB. Las fracciones 9 a 20 obtenidas en la cromatografía previa de afinidad se concentraron y se cargaron en una columna S200. **(A)** Perfil de elución obtenido. Se representa la absorbancia a 280 nm frente al volumen de elución. **(B)** Gel SDS-PAGE al 12%, teñido con *BlueSafe*, de los eluidos obtenidos de la cromatografía de filtración en gel: MW, marcadores de peso molecular (kDa). Los números 13 a 20 corresponden a las fracciones con el mismo número obtenidas en la cromatografía de gel filtración. La posición de las proteínas GST-TrwB (71,9 kDa) y GST (25,5 kDa) se ha señalado con una flecha. Los eluidos que contenían la proteína de interés se recogieron, cuantificaron mediante el ensayo de Bradford y se congelaron a -80°C.

Figura 4. Ensayo interacción GST-TrwB/TrwC. Se muestra el resultado obtenido tras la incubación y posterior carga en una columna GSTrap de las proteínas GST-TrwB y TrwC **(A)** Gel SDS-PAGE al 8%, teñido con BlueSafe, de los eluidos obtenidos de la cromatografía de afinidad: MW, marcadores de peso molecular (kDa). Los números 1, 2 (lavado) y 17 a 23 (elución) corresponden a las fracciones con el mismo número obtenidas en la cromatografía de afinidad. Las bandas superiores corresponden a TrwC, observándose una pérdida parcial durante el lavado de la columna (se pierde en menor medida GST-TrwB y GST). **(B)** Gel SDS-PAGE al 8%, teñido con BlueSafe, de los eluidos obtenidos de la cromatografía de afinidad: MW, marcadores de peso molecular (kDa). Los números 24 a 26, 29, 31 y 33 a 36 corresponden a las fracciones con el mismo número obtenidas en la cromatografía de afinidad. Se observa que TrwC

comienza a aparecer a la vez que GST-TrwB, demostrando la co-elución de ambas proteínas. **(C)** Gel SDS-PAGE al 8%, teñido con BlueSafe, de los eluidos obtenidos de la cromatografía de afinidad: MW, marcadores de peso molecular (kDa). Los números 37 a 45 corresponden a las fracciones con el mismo número obtenidas en la cromatografía de afinidad. En los tres geles SDS-PAGE, la posición de las proteínas TrwC (107,4 kDa) y GST-TrwB (71,9 kDa) se ha señalado con una flecha.

Figura 5. Microscopía electrónica de tinción negativa y cristales obtenidos en placas por *sitting drop*. **(A)** Imagen representativa de las partículas observadas, cuyo tamaño es compatible con el complejo GST-TrwB/TrwC. El análisis se realizó en un microscopio electrónico JEOL-1100 equipado con una cámara Orius SC1000 (GATAN) en el centro IDIVAL. **(B)** Fotografía de la visualización en microscopio de luz polarizada de la placa de cristalografía, condición C4 (20% w/v PEG 3350, 0,2M Tartrato de Potasio Tetrahidratado).

Figura 6. Predicción por *AlphaFold3* de la interacción TrwB-TrwC. **(A)** Representación en *PyMol* de la predicción por *AlphaFold* de la interacción entre un monómero de TrwB (beige) y TrwC (magenta) **(B)** Ampliación del panel A, con la representación los residuos que interaccionan entre ambas proteínas. **(C)** Tabla con el resultado de la predicción de *PISA* (*PDBePISA*), que detalla los residuos que interaccionan entre ambas proteínas, los átomos implicados y la distancia entre ellos.

Pies de Figuras de la Información Suplementaria

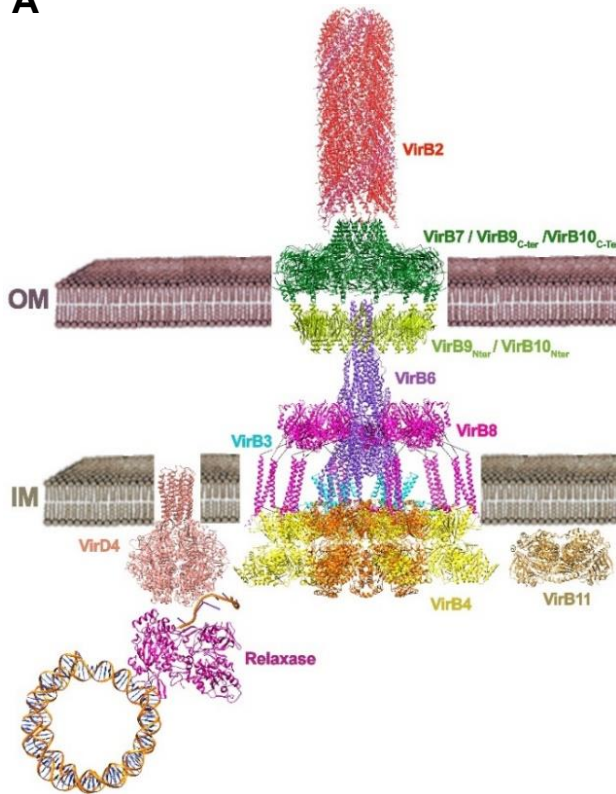
Figura S1. Análisis de los resultados de secuenciación del plásmido pGEX-3X::*trwB*Δ*N75* (pMTX501). (A) Alineamiento de la secuencia teórica del plásmido (fila superior) y la obtenida en la secuenciación (fila inferior) mediante la herramienta *SnapGene*. Se resalta la mutación hallada en la posición 1121 del constructo (posición 221 de la primera reacción de secuenciación): c.1121C>G (p.Thr374Thr). (B) Resultado de la primera reacción de secuenciación (plásmido + FW1_pMTX501). Se enmarca la base mutada respecto a la secuencia teórica del constructo.

Figura S2. Cromatografía de afinidad de TrwC. (A) Perfil de elución obtenido al cargar una muestra de TrwC previamente purificada en una columna GSTrap de 1 ml. Se representa la absorbancia a 280 frente al volumen de elución. La línea verde muestra el porcentaje de concentración del tampón de elución (tampón B). (B) Gel SDS-PAGE al 8%, teñido con BlueSafe, de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad: MW, marcadores de peso molecular (kDa). Los números 1 a 4 corresponden a las fracciones con el mismo número obtenidas en la cromatografía de afinidad, correspondientes al *flow-through*. La posición de TrwC (71,9 kDa) se ha señalado con una flecha.

Figura S3. Análisis cuantitativo de TrwC y GST-TrwB mediante SDS-PAGE y densitometría. (A) Gel SDS-PAGE al 8%, teñido con BlueSafe, de muestras purificadas de GST-TrwB y TrwC. Los números corresponden a la cantidad de cada proteína (en µg) cargada y cuantificada en cada calle. La posición de las proteínas TrwC (107,4 kDa) y GST-TrwB (71,9 kDa) se ha señalado con una flecha. (B) Recta patrón de TrwC, obtenida mediante el análisis de la intensidad de cada banda del gel en *ImageJ*. (B) Recta patrón de GST-TrwB, obtenida mediante el análisis de la intensidad de cada banda del gel en *ImageJ*.

FIGURA 1

A



B

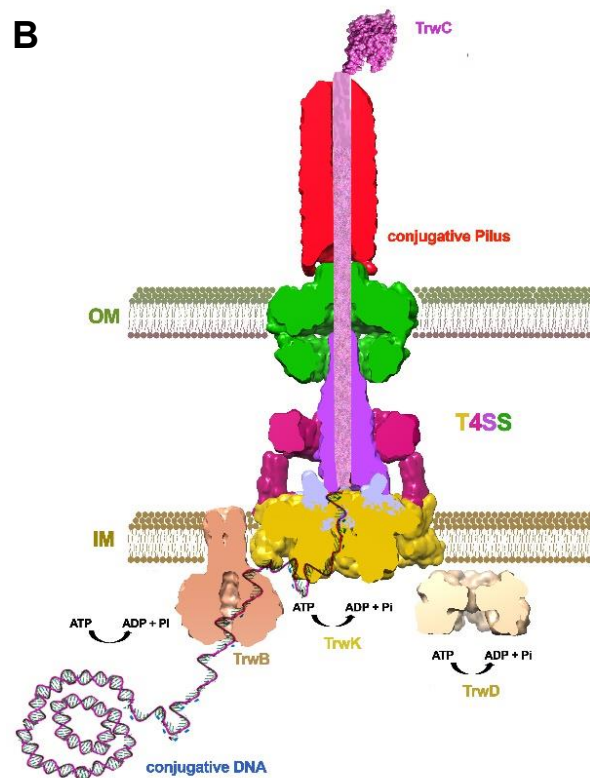


FIGURA 2

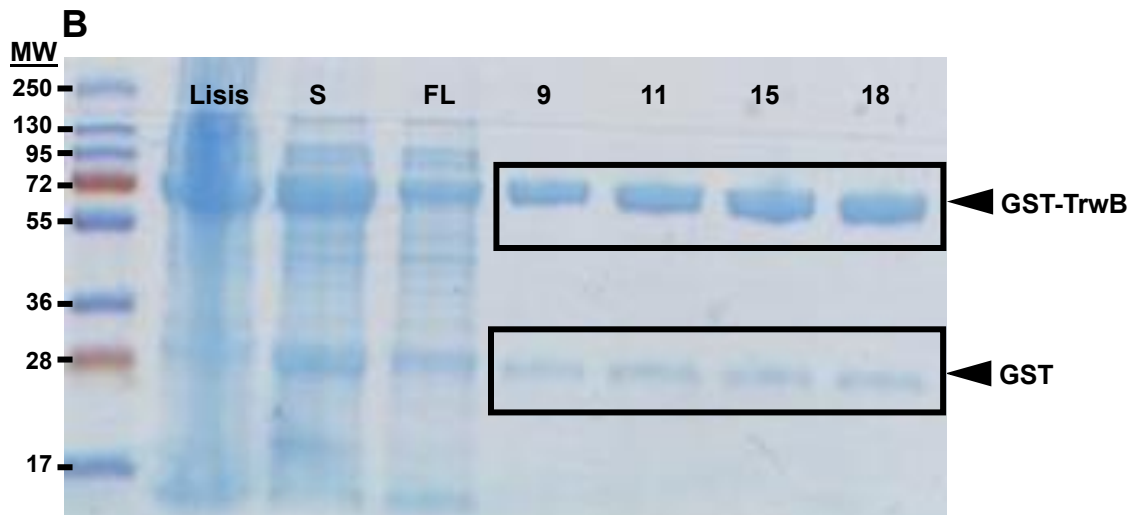
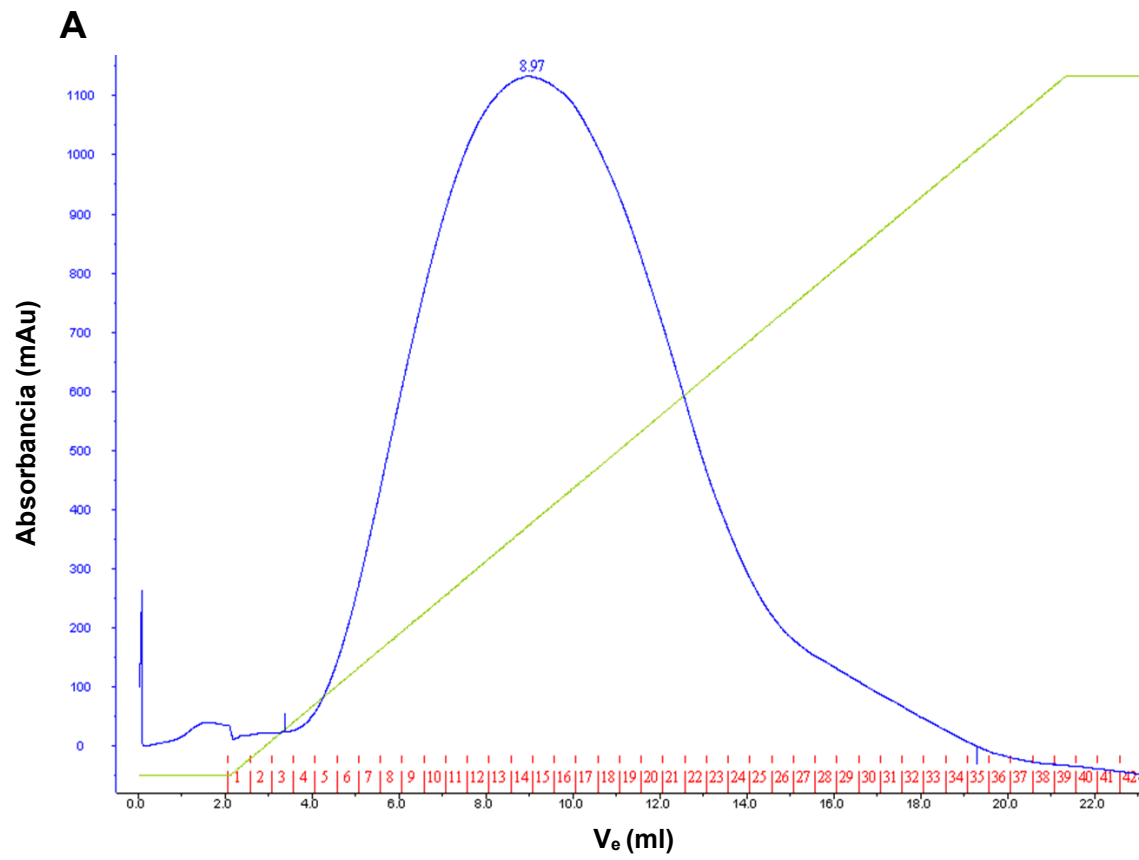


FIGURA 3

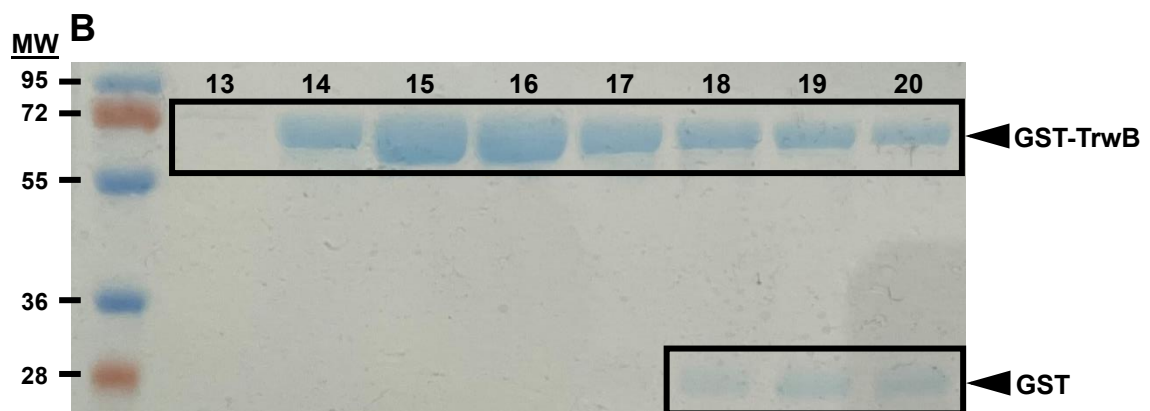
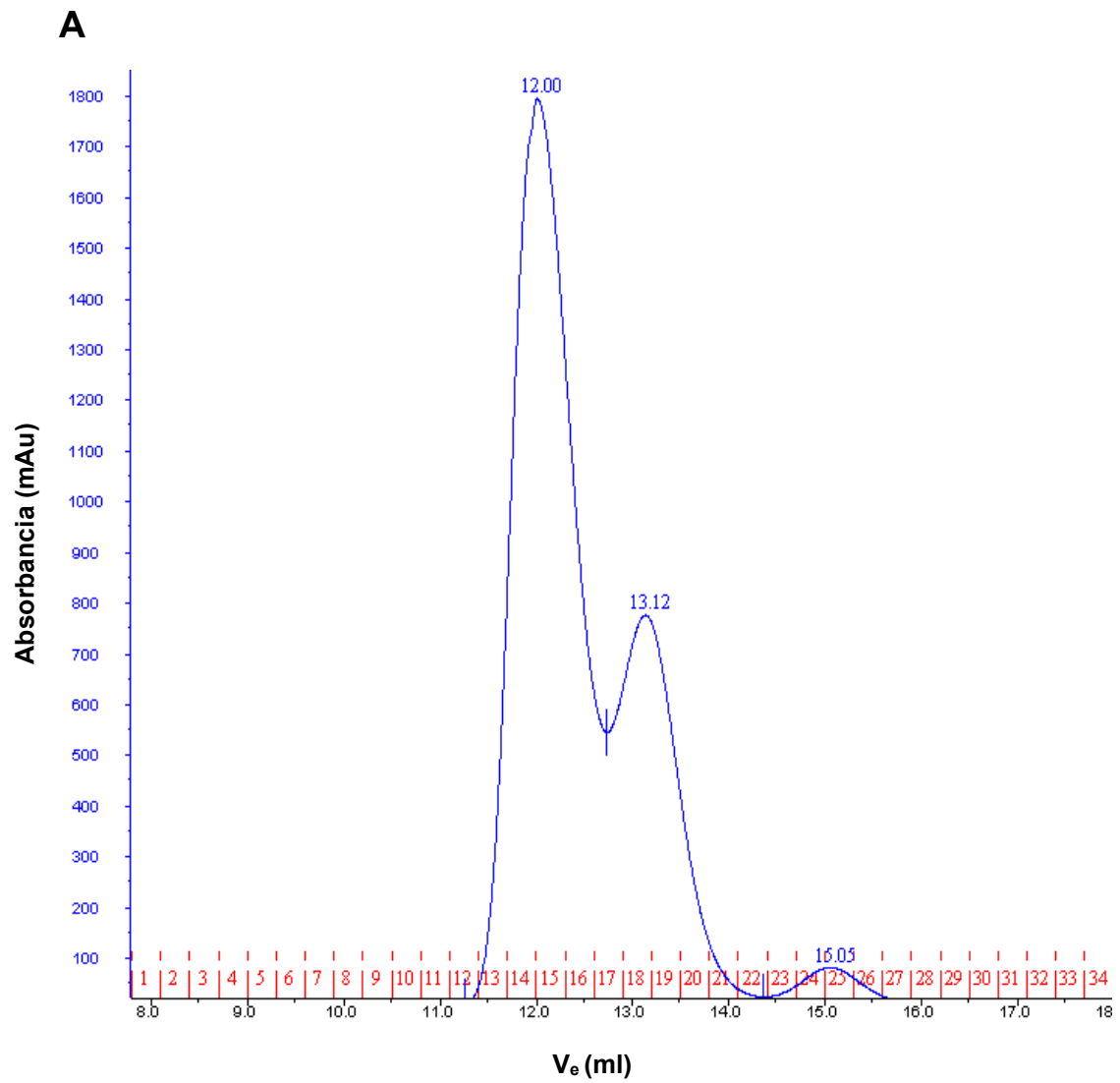


FIGURA 4

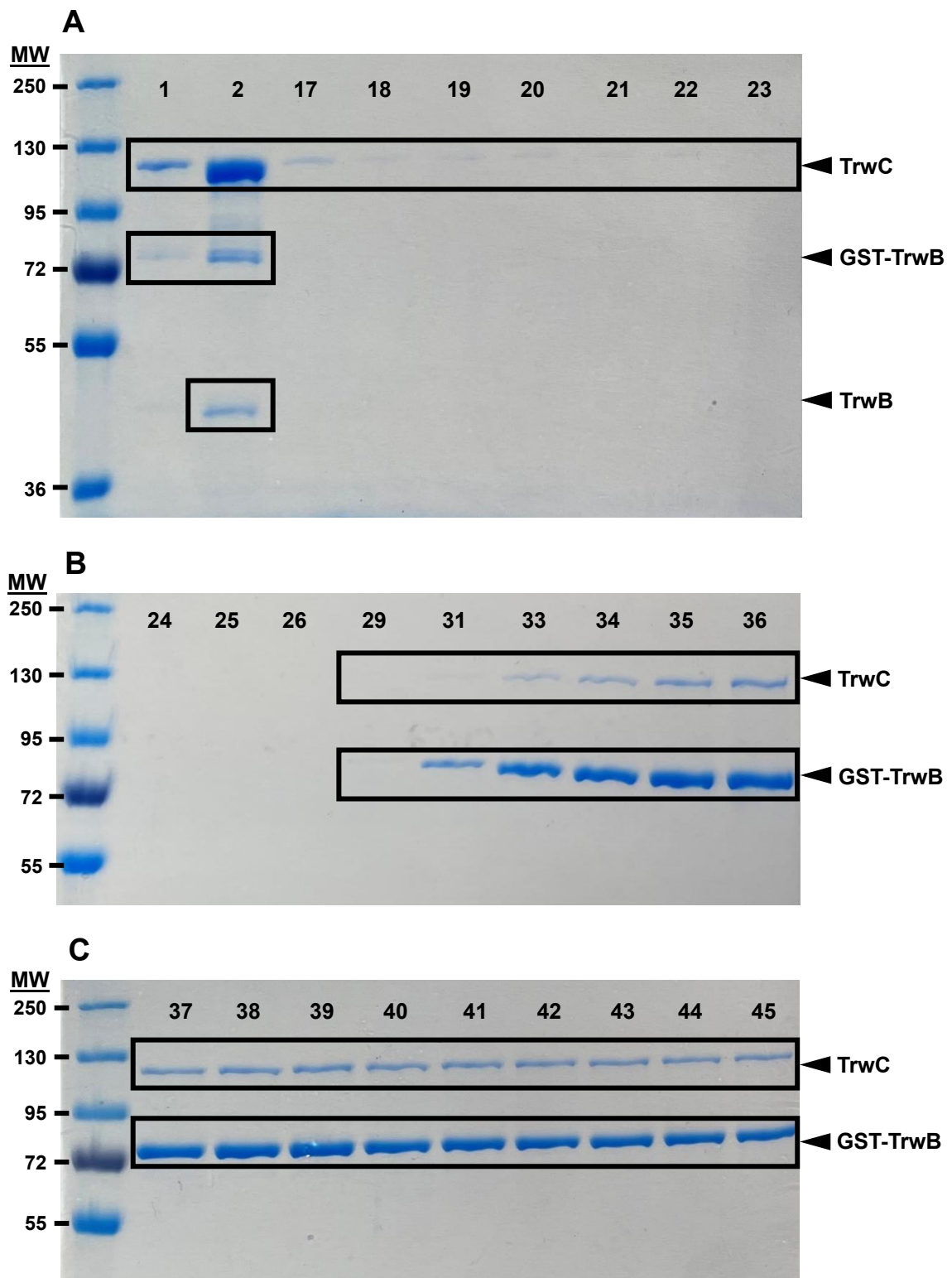
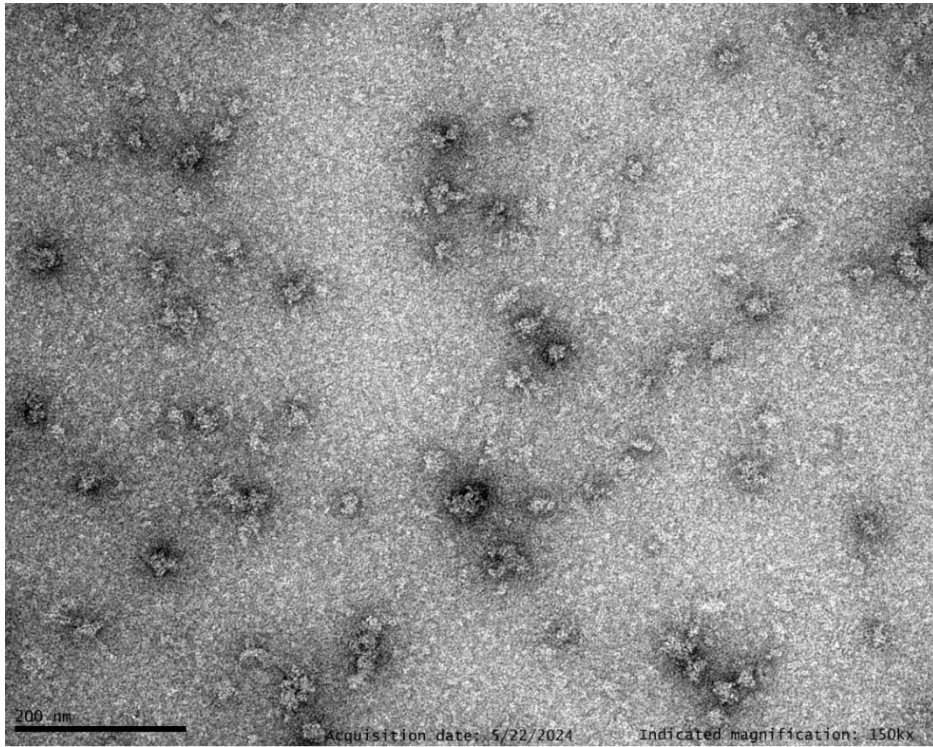


FIGURA 5

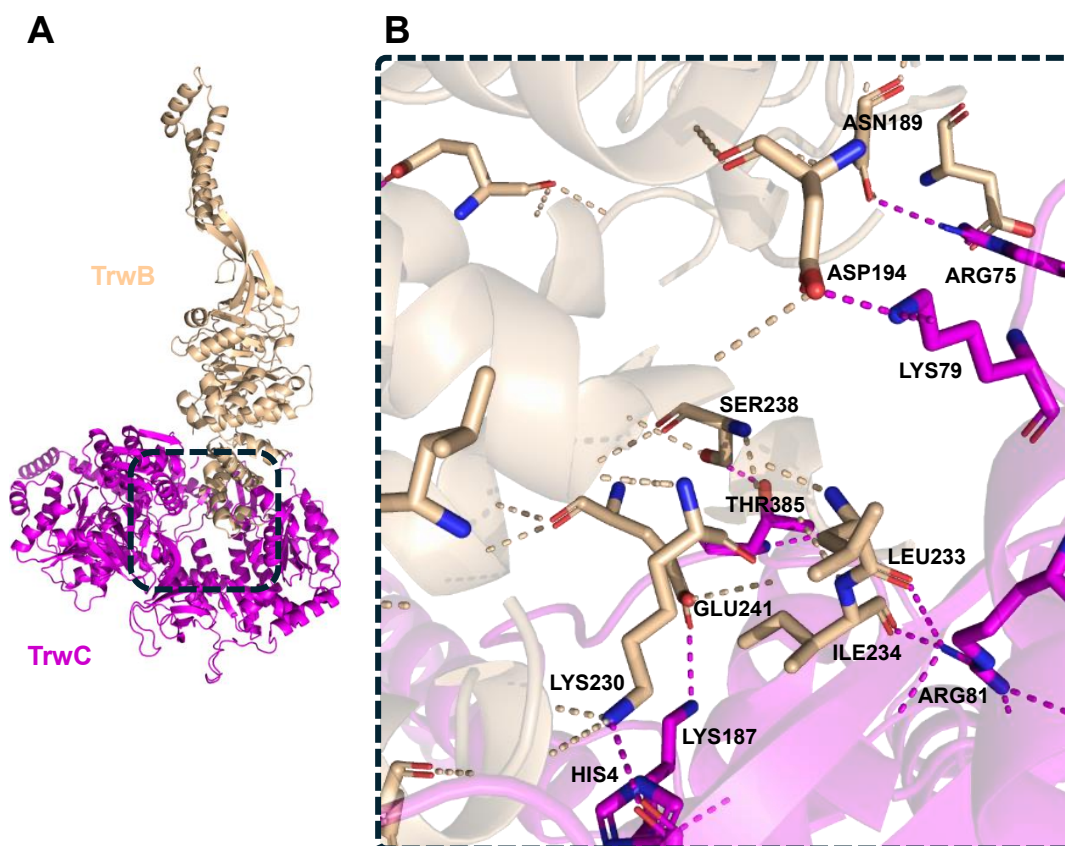
A



B



FIGURA 6



C

TrwB		TrwC		Distancia (Å)
RESIDUO	ÁTOMO	RESIDUO	ÁTOMO	
ASN 189	OD1	ARG 75	NH1	2,87
ASP 194	OD1	LYS 79	NZ	2,68
ASP 194	OD2	LYS 79	NZ	2,75
THR 210	OG1	GLU 659	OE1	2,87
LYS 230	NZ	HIS 4	OE1	3,55
LEU 233	O	ARG 81	NH1	3,43
ILE 234	O	ARG 81	NH1	2,21
SER 238	OG	THR 385	OG1	3,23
GLU 241	OE1	LYS 187	NZ	2,91
ASP 252	OD2	ARG 190	NH2	3,31
ASP 253	OD1	ARG 190	NH1	3,4
LEU 262	O	GLN 259	NE2	3,66
GLU 264	OE2	LYS 262	NZ	2,87
SER 279	OG	HIS 658	NE2	3,3
SER 285	OG	HIS 869	NE2	3,34
ASP 286	OD2	LYS 655	NZ	3,63
ASP 286	O	LYS 900	NZ	3,81
GLU 290	OE1	LYS 900	NZ	3,13
GLU 290	OE2	LYS 900	NZ	3,28
ASP 298	OD1	ARG 75	NH2	2,65
ASP 298	OD2	ARG 75	NH2	3,77
GLU 362	OE1	LYS 655	NZ	3,13

FIGURA S1

A

```
974 GCGATTTTTGCGCGGAACTCGCATCGTCAGTGGGGGAAAACTCAAACGCATGACACGCGAAAAAGCCAAG 1043
    |||||||
74 GCGATTTTTGCGCGGAACTCGCATCGTCAGTGGGGGAAAACTCAAACGCATGACACGCGAAAAAGCCAAG 143

1044 CAAGTTACCGTTGCTGGTGTACCAATGCCGCGTGATGCAGAGCCGCGCCATTTGCTGGTAAATGGTGCCA 1113
    |||||||
144 CAAGTTACCGTTGCTGGTGTACCAATGCCGCGTGATGCAGAGCCGCGCCATTTGCTGGTAAATGGTGCCA 213

1114 CTGGTACGGGTAAATCGGTGTTGCTTCGTGAGCTTGCTTATACCGGACTTTTGC GCGGCGACCGCATGGT 1183
    |||||||
214 CTGGTACCGGTAAATCGGTGTTGCTTCGTGAGCTTGCTTATACCGGACTTTTGC GCGGCGACCGCATGGT 283

1184 AATTGTTGACCCGAATGGCGATATGTTGTGCGAAATTCGGCAGGGATAAAGACATTATCTTGAACCCCTAC 1253
    |||||||
284 AATTGTTGACCCGAATGGCGATATGTTGTGCGAAATTCGGCAGGGATAAAGACATTATCTTGAACCCCTAC 353

1254 GATCAGCGTACAAAGGGTTGGTCTTTCTTCAACGAAATCCGAAATGACTACGACTGGCAGCGTTATGCGT 1323
    |||||||
354 GATCAGCGTACAAAGGGTTGGTCTTTCTTCAACGAAATCCGAAATGACTACGACTGGCAGCGTTATGCGT 423
```

B

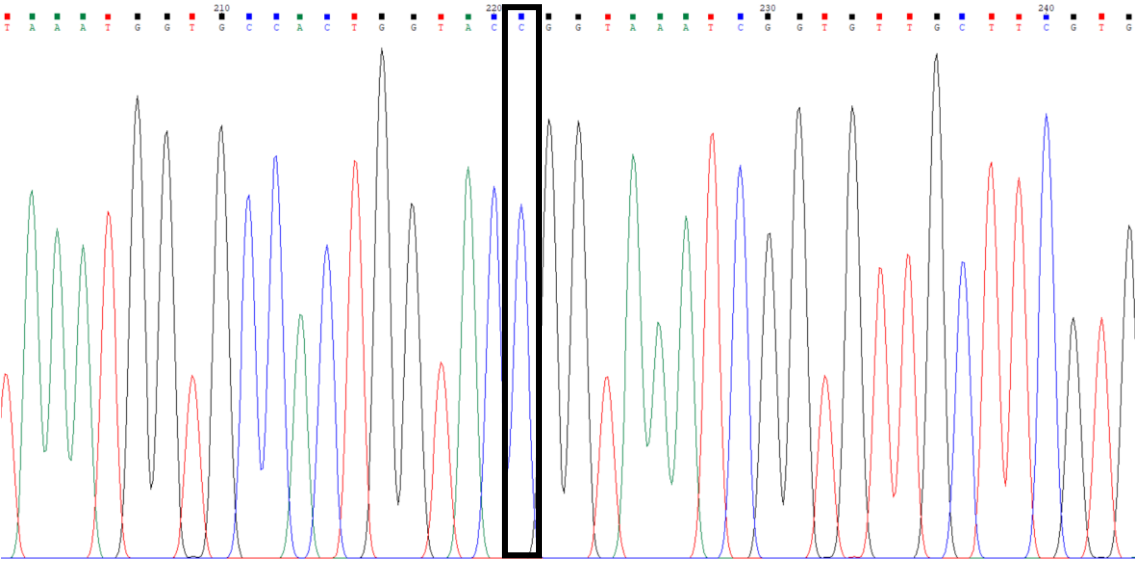


FIGURA S2

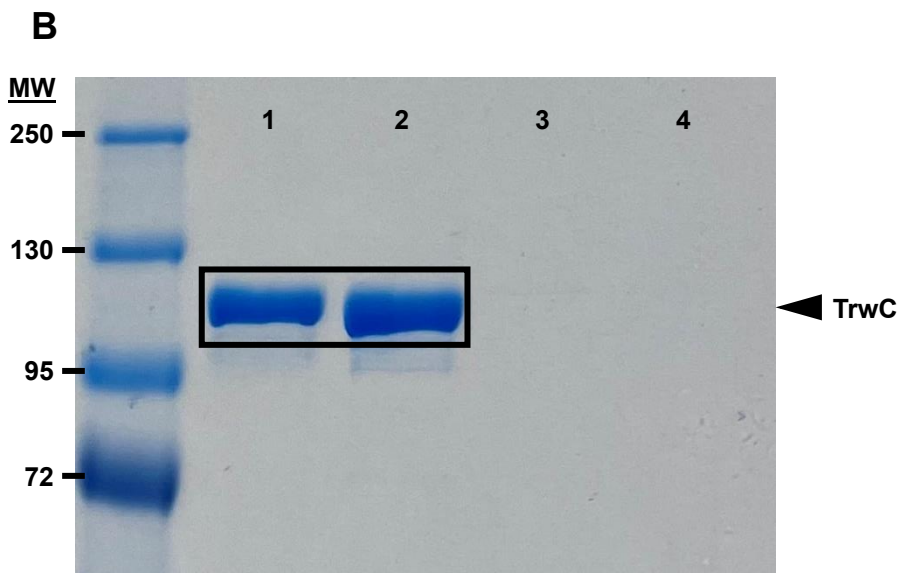
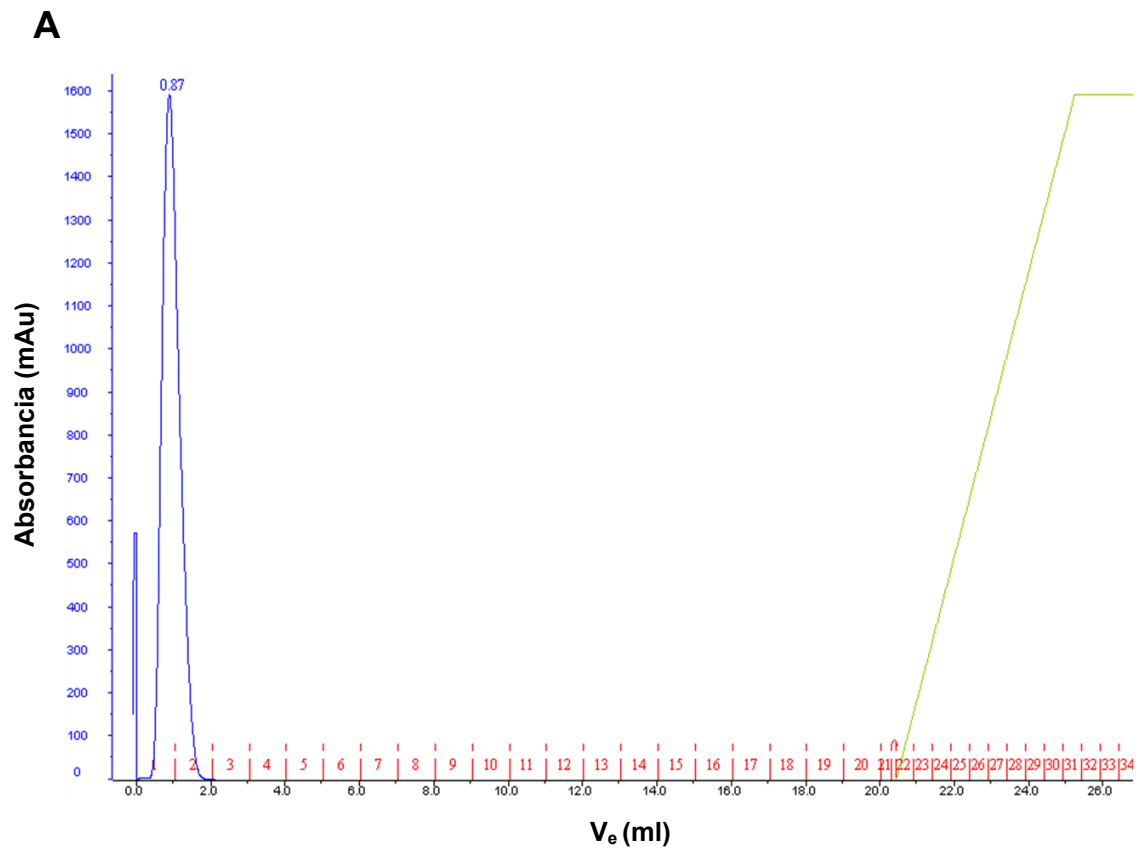
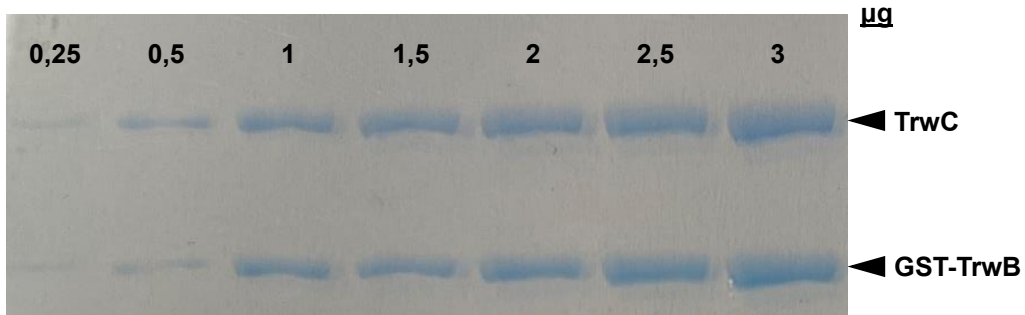
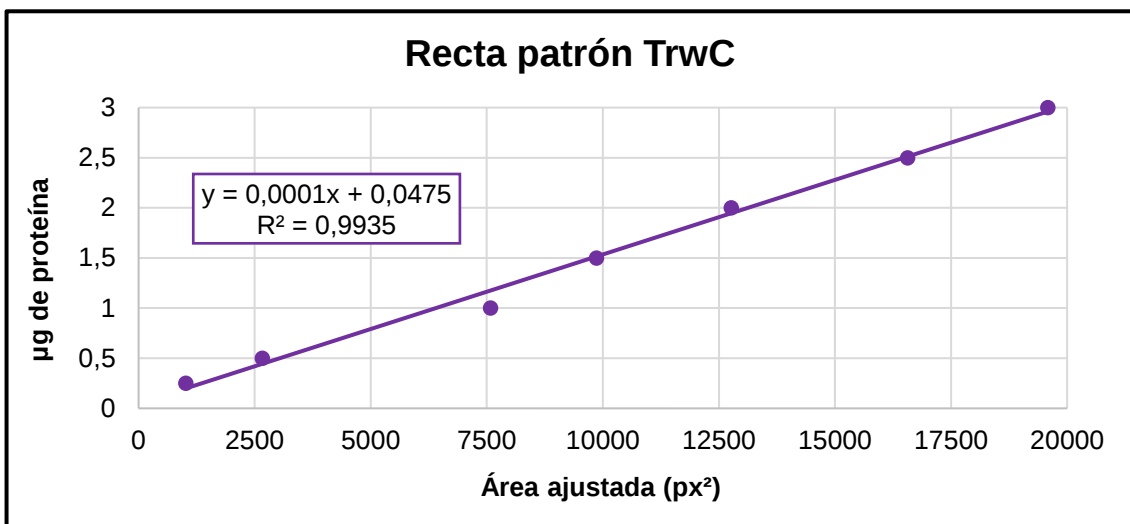


FIGURA S3

A



B



C

