Universidad de Cantabria

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Molecular



Regulación enzimática y funcional de TrwD, una proteína esencial en la secreción bacteriana

Jorge Ripoll Rozada

Noviembre 2013

Elena Cabezón Navarro e Ignacio Arechaga Iturregui, Profesores Titulares de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, certifican que:

Jorge Ripoll Rozada ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que lleva por título: "Regulación enzimática y funcional de TrwD, una proteína esencial en la secreción bacteriana".

Consideramos 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 en Ciencias Biológicas.

Santander, Noviembre 2013

Fdo. Elena Cabezón e Ignacio Arechaga

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria bajo la dirección de los profesores Elena Cabezón e Ignacio Arechaga, gracias a la beca predoctoral concedida por la Universidad de Cantabria.

AGRADECIMIENTOS

Los que me habéis conocido a lo largo de estos años sabéis que no suelo destacar en lo que a expresar sentimientos se refiere. Por este motivo os pido que valoréis las palabras que aquí os escriba y a la vez me perdonéis por ser tan escueto. Sois muchas las personas que me habéis marcado a los que os quiero y admiro. Siento no mencionaros a todos. Muchas gracias.

En primer lugar y como no podía ser de otra manera agradecer a mis jefes **Elena** e **Iñaki**. Gracias por todo. Sin vosotros no hubiese sabido que es la ciencia. Gracias por vuestra paciencia con mi carácter "gallego", por enseñarme todo lo que ha estado en vuestra mano y sobre todo porque a pesar de ser buenos jefes habéis sido mejores personas. A **Fernando**, por mostrarme tu interés sobre mi trabajo, por las críticas y sugerencias en los seminarios, en definitiva por poder formar parte del *Intergenomics group*. A **Gabi**, por tus ayudas y consejos durante la tesis.

A los motores moleculares. A **Inma**, por ayudarme en los inicios. A **Sandra**, porque sin duda gran parte de esta tesis es tuya. Gracias por ser la mejor técnico y sobre todo por estar siempre ahí para lo que fuera. Has sido un gran apoyo durante estos años. A **Alej**, por ser un gran amigo, por ser mi *yang* en el laboratorio y por poder aprender de ti varios valores. Otra parte de esta tesis es tuya. Eres muy grande y te tengo un gran cariño.

A todos los Intergenómicos. A Mapi, por tu ayuda incondicional. No sólo eres insustituible a nivel laboral sino que eres una persona excepcional. Gracias por todo, te voy a echar de menos. A Lillo, por poder compartir contigo momentos buenísimos tanto en el laboratorio como sobre todo fuera de él. Has sido uno de mis pilares fundamentales en esta etapa. Sé que dejo a un "Gran" amigo (de Gran Bilbao). A Yera, por compartir en tan poco tiempo tanto contigo. Hay personas que no necesitas años para cogerles tanto aprecio. A **David**, porque eres uno de los mosqueteros. Ha sido genial poder compartir estos años contigo "pucelo". A Juantxo, por compartir risas en el labo, fiesta y olas contigo. Tienes un corazón enorme y por desgracia ya he tenido tiempo para echarte de menos antes de escribir estos agradecimientos. A Val, por tantos buenos momentos juntos. Eres muy grande a pesar de ser santanderino (jeje). A Getino y Maris, por vuestro sentido del humor y por lo divertidas que sois. Sin vosotras el laboratorio no hubiese sido igual y los "findes" más aburridos. Os voy a echar mucho de menos. A Ruli, por tus consejos y por ser tan divertido. De ti se aprende un montón. A Atha, porque es un placer trabajar al lado de gente como tú. No pierdas nunca esa risa que contagia al resto. A Omar, porque eres un cachondo y por tu retranca gallega. Una pena que llegaras tan tarde. A Bea, por estar siempre animada a hacer planes y por preguntarme cómo van las cosas a menudo. A Mati, Carlos, Sheila, Ana, Ráquel, por contribuir a tantos momentos buenos del grupo y ayudarme durante estos años.

A **Esterina**, por un sinfín de cosas. Has sido mi otro gran pilar en Sandander. Tengo muchísimo que agradecerte y no sabría por dónde empezar. Solo decirte lo que me dijiste nada más conocerte "gallegos y asturianos primos hermanos". A **Coral**, porque eres genial. Me alegro mucho de haberte conocido y poder compartir horas de café y extralaboratoriales. A **Héctor**, por animarme en los inicios. Por tu boda, tu escapada a León y tantos otros buenos momentos. Me hubiese gustado compartir más años contigo. A **Anabel** y **Nico**, porque aunque no hayamos compartido tantos momentos juntos como me hubiese gustado os tengo un gran cariño.

A **Manu**, porque simplemente eres genial. "¿Cómo con alguien de tan lejos se puede hacer tan buenas migas?". A **Gabi**, por compartir olas, fútbol, consejos de trabajo y alguna que otra

conversación para arreglar el mundo. A **Risoto**, por muchos momentos. Gracias por estar ahí. Te tengo un cariño especial y serás de las primeras personas en llamar, sino la primera, cuando pase por Santander.

A Jorge y Javier, por tantas horas de pádel. Sois muy buena gente y me he divertido con vosotros.

A **David** y **Nuria**, por acogerme durante mis primeros meses en Santander. Os habéis portado muy bien conmigo.

A mi gente de Coruña. A **Luis**, por coincidir conmigo en Santander esta última etapa de la tesis y acogerme como compañero de piso. Sobra decir que ha sido un placer y has sido un gran apoyo. **Jesús**, **Javito**, **Berni**, **Viqueira**, **Botana**, **etc**. Por hacerme sentir, cada vez que voy allí, como si nunca me hubiese ido a vivir fuera. Por tantos años juntos, por ser mis AMIGOS.

También quiero agradecer a una persona por hacerme ver que a veces lo irracional puede ser lo correcto. Que lo difícil puede merecer mucho la pena.

Y por último a mi familia. A **Alfonso**, por hacerme ser padrino dos veces y simplemente por ser mi cuñado. A **Noemi**, por tantas facturaciones aquí y allá. Por preocuparte por cómo me va. Gracias a los dos por esos sobrinos tan ricos. A **Javi** y **Jorge** por ampliar la familia y traer alegría. A mis padres **Jesús** e **Isabel** por TODO. Simplemente os lo debo todo a vosotros y como no podía ser de otra manera esta tesis también. Gracias por estar siempre ahí y apoyarme en todo momento. Esta tesis va dedicada a vosotros.



ÍNDICE

ABREVIATURAS

1.	INTI	RODU	CCIÓN		7
	1.1	Sisten	nas de Se	ecreción bacterianos	7
	1	1.1	Sistema	s de Secreción tipo I (T1SS)	8
	1	1.2	Sistema	s de Secreción tipo II (T2SS)	9
	1	1.3	Sistema	s de Secreción tipo III (T3SS)	10
	1	1.4	Sistema	s de Secreción tipo IV (T4SS)	12
	1	1.5	Sistema	s de Secreción tipo V (T5SS)	13
	1	1.6	Sistema	s de Secreción tipo VI (T6SS)	15
	1.2	Sisten	nas de Se	ecreción tipo IV (T4SS)	16
	1	2.1	Arquite	ctura general de los T4SSs	16
	1	2.2	Importa	ncia clínica asociada a la actividad de los T4SS y búsqueda de	
			inhibido	pres	17
	1	2.3	Análisis	estructural y funcional de los componentes del core complex	18
	1	2.4	Compor	nentes del <i>pilus</i>	21
	1	2.5	ATPasas	s asociadas a la membrana interna	22
		1.2	.5.1	VirD4	22
		1.2	.5.2	VirB4	26
		1.2	.5.3	VirB11	28
	1.3	Super	familia d	e las traffic ATPases	32
	1	3.1	Estructu	ıra general	33
	1	3.2	Estructu	ira y mecanismo de acción de GspE, ATPasa del T2SS	34
	1	.3.3	Estructu	ira y mecanismo de acción de PilT, ATPasa implicada en la	
			retracci	ón del <i>pilus</i> tipo IV	37
	1	.3.4	Reajuste	es entre dominios en el contexto de la superfamilia de	
			RecA/A	AA+ ATPasas	38

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Cepa	s bacteri	ianas	47
3.2	Plásm	nidos		47
3.3	Medi	edios de cultivo		
3.4	Técni	cas de B	iología Molecular	49
	3.4.1	Clonac	ión y amplificación de ADN por PCR	49
	3.4.2	Mutage	énesis dirigida	50
3.5	Técni	cas Micr	robiológicas	51
	3.5.1	Prepar	ación de células competentes y electroporación de ADN	51
	3.5.2	Curvas	de crecimiento	52
	3.5.3	Ensayc	os de conjugación bacteriana	52
3.6	Técni	cas Bioq	Juímicas	53
	3.6.1	Produc	cción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	53
	3.6.2	Purifica	ación de proteínas	53
	3.6.3	Análisi	s proteico	55
	3.6	5.3.1	Cuantificación de proteínas (Método de Bradford)	55
	3.6	5.3.2	Purificación de anticuerpos	55
	3.6	5.3.3	Detección por Western Blot de proteína en extracto total y en	
			fracción extracelular	56
	3.6.4	Análisi	s de actividad	57
	3.6	5.4.1	Ensayos de actividad ATPasa	57
	3.6	5.4.2	Cálculo de parámetros cinéticos	59
	3.6	5.4.3	Ensayos de movilidad electroforética con TrwC y TrwC (1-293)	61
	3.6	5.4.4	Ensayos de actividad de corte específica con TrwC y TrwC (1-293)	61
	3.6.5	Proteo	lisis limitada de TrwD	62
	3.6.6	Secuer	nciación N-terminal	62
3.7	Técni	cas Biof	ísicas	63
	3.7.1	Fluorin	netría	63
	3.7.2	Dicrois	mo circular	63
	3.7.3	Ultrace	entrifugación analítica	64
3.8	Micro	oscopía e	electrónica	64
3.9	Técni	cas Bioii	nformáticas	65
	3.9.1	Alinea	miento de secuencias y predicción de estructura secundaria	65
	3.9.2	Model	ado molecular y predicción de estructura tridimensional	65

47

4. **RESULTADOS**

4.1	Purifi	cación y caracterización bioquímica de TrwD	69
	4.1.1	Purificación de TrwD	69
	4.1.2	Caracterización del estado oligomérico de TrwD mediante cromatografía de	
		tamizado molecular y ultracentrifugación analítica	70
	4.1.3	Análisis de la actividad de TrwD	72
4.2	Mode	elado Molecular de TrwD y otros homólgos de VirB11	74
4.3	Efecto	o del magnesio en la actividad, oligomerización y estabilidad de TrwD	76
	4.3.1	Regulación de la actividad ATPasa de TrwD por magnesio	76
	4.3.2	Efecto del magnesio sobre la unión de nucleótidos a TrwD	78
	4.3.3	Efecto del magnesio en la estabilidad térmica de TrwD	79
	4.3.4	Efecto del magnesio en la estructura de TrwD: estudios de proteólisis parcial	81
	4.3.5	Efecto del magnesio sobre el estado oligomérico de TrwD	85
	4.3.6	Efecto del magnesio <i>in vivo</i> en la conjugación	87
4.4	Efecto	o inhibitorio de los ácidos grasos insaturados en la actividad de TrwD	88
	4.4.1	Caracterización de la inhibición de la actividad de TrwD por el ácido linoleico	89
4.5	Intera	acciones funcionales entre las tres ATPasas citoplasmáticas del T4SS	91
	4.5.1	Caracterización de la interacción TrwD-TrwK	91
	4.5.2	Análisis de la interacción de TrwK con distintos homólogos de TrwD	94
	4.5.3	El homólogo de TrwD del plásmido pKM101 se une a TrwK pero no puede	
		complementar a TrwD <i>in vivo</i>	96
	4.5.4	Caracterización de la interacción de la proteína acopladora TrwB con	
		TrwK y TrwD	98
	4.5.5	Efecto de mutaciones en TrwD sobre la interacción con TrwK	99
	4.5.6	Análisis del papel de TrwD en la biogénesis del pilus	101
	4.5.7	Estudio de la interacción de TrwD con las otras ATPasas del T4SS mediante	
		proteolisis y cromatografía de tamizado molecular	104
4.6	Estud	io del posible efecto de TrwD en las actividades <i>in vitro</i> de TrwC	107
4.7	Ensay	os de actividad ATPasa de TrwD en presencia de otros componentes del T4SS	111

69

5.	DISCUSIÓN		121
	5.1	Regulación de la actividad de TrwD por el magnesio: implicaciones en el	
		mecanismo catalítico de la superfamilia de traffic ATPases	121
	5.2	Interacciones de TrwD con otros miembros del T4SS	125
	5.3	TrwD: un posible interruptor molecular que regula la localización de TrwB y	
		TrwK en la base del T4SS	129
	5.4	Efecto inhibitorio de los ácidos grasos sobre la actividad ATPasa de TrwD	130

6.	CONCLUSIONES	135
7.	BIBLIOGRAFÍA	139
8.	PUBLICACIONES	155

Figuras Introducción

1.1	Representación de los principales sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas	7
1.2	Representación del T1SS de E. coli encargado de la translocación de HlyA	8
1.3	Mecanismo de pistón para la secreción de proteínas a través del T2SS	9
1.4	Comparación entre las distintas familias de T3SSs y el flagelo	11
1.5	Representación tridimensional del NC de S. typhimurium	11
1.6	Representación esquemática de las distintas funciones de los T4SS en bacterias	13
1.7	Representación esquemática de los distintos tipos de T5SSs	14
1.8	Comparación esquemática del bacteriófago T4 y la maquinaria de inyección del T6SS	15
1.9	Representación esquemática del T4SS	16
1.10	Estructura por crio-microscopía electrónica del core complex de pKM101 formado	
	por TraN (VirB7), TraO (VirB9) y TraF (VirB10)	19
1.11	Estructura del core complex del T4SS de pKM101	20
1.12	Estructura cristalográfica de TraC, homólogo de VirB5 en pKM101	22
1.13	Características estructurales de TrwB	23
1.14	Mecanismo general de transferencia de plásmidos	25
1.15	Estructura tridimensional de TrwK (homólogo de VirB4 en R388) obtenida por	
	microscopía electrónica	27
1.16	Dominios de interacción mapeados en los modelos de VirB4 y VirB11	29
1.17	Comparación entre los hexámeros de VirB11 de B. suis y HP0525 de H. pylori	30
1.18	Modelo del modo de acción de las ATPasas VirB11	31
1.19	Árbol filogenético de un conjunto de NTPasas de sistemas de secreción tipo II/IV	
	construido con algoritmos de máxima parsimonia	32
1.20	Estructura cristalográfica de las cinco proteínas de la superfamilia de traffic ATPases	
	resueltas hasta el momento	33
1.21	Comparación de las estructuras y los distintos subdominios de las traffic ATPases	
	implicadas en la secreción bacteriana de tipo II y tipo IV	34
1.22	Estructura hexamérica con AMP-PNP de GspE de A. fulgidus alternando distintas	
	conformaciones	35
1.23	Modelo de acción de GspE	36
1.24	Distintas conformaciones hexaméricas de PilT variando su simetría	37
1.25	Fuerza generada a partir de los reajustes entre subunidades en las ATPasas	
	hexaméricas de la familia RecA	39

Figuras Materiales y Métodos

3.1	Esquema representativo del ensayo acoplado	57
3.2	Esquema representativo del ensayo EnzCheck [™]	58
3.3	Ensayo de actividad de corte de TrwC	62

Tablas Materiales y Métodos

3.1	Cepas utilizadas	47
3.2	Plásmidos empleados	47
3.3	Plásmidos construidos	48
3.4	Lista de anticuerpos utilizados	56

Figuras Resultados

4.1	Purificación de TrwD	69
4.2	Estudio del estado oligomérico de TrwD a distinta concentración por cromatografía	
	de tamizado molecular	70
4.3	Cromatografía de tamizado molecular para determinar el estado oligomérico de TrwD	71
4.4	Experimento de velocidad de sedimentación de TrwD	71
4.5	Efecto del pH en la actividad ATPasa de TrwD	72
4.6	Isoterma de respuesta de TrwD	73
4.7	Actividad de hidrólisis de TrwD para distintos nucleótidos	73
4.8	Diferencias en el plegamiento en diferentes homólogos de VirB11 en función de la	
	longitud del linker	75
4.9	Efecto del magnesio en la actividad ATPasa de TrwD	77
4.10	Inhibición de la actividad ATPasa de TrwD por efecto del magnesio	77
4.11	Inhibición de la actividad de TrwD por ADP	78
4.12	Efecto del magnesio en la unión del TNP-ATP a TrwD	79
4.13	Desnaturalización térmica de TrwD seguida por dicroísmo circular	80
4.14	Desnaturalización térmica de TrwD en tampón ATPasa seguida por dicroísmo circular	80
4.15	Proteolisis parcial de TrwD con papaína	82
4.16	Localización del sitio de corte por la papaína en el modelo de TrwD	83
4.17	Disposición de la región de 11 KDa resultante de la digestión por papaína dentro del	
	hexámero en los homólogos de VirB11	84
4.18	Microscopía electrónica de oligómeros de TrwD	85
4.19	Efecto del magnesio en experimentos de velocidad de sedimentación	86
4.20	Efecto del magnesio sobre el crecimiento de la cepa DH5α (R388)	88
4.21	Efecto de los ácidos grasos en la actividad ATPasa de TrwD	89
4.22	Inhibición de la actividad ATPasa de TrwD por el ácido linoleico	90
4.23	Interacción TrwK-TrwD detectada por cromatografía de afinidad	93
4.24	Niveles de TrwK en la interacción TrwK-TrwD e interacción HisTrwK-TrbB	94
4.25	Interacción entre distintos homólogos de VirB11 con TrwK detectada por	
	cromatografía de afinidad	95
4.26	Interacción HisTrwD-TrwK en gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie	96
4.27	Niveles de expresión de los distintos homólogos de TrwD	97
4.28	Interacción entre las tres ATPasas del T4SS detectada por cromatografía de afinidad	99
4.29	Interacción del mutante TrwD V106G con TrwK y TrwB detectada por	
	cromatografía de afinidad	100
4.30	Interacción entre el mutante TrwD K86A y TrwK	101
4.31	Detección de la pilina en la fracción extracelular	102
4.32	Sobre-expresión de TrwJ y detección por Western blot en extracto total	102
4.33	Niveles de TrwJ en el extracto total detectados por Western blot	103
4.34	Niveles de TrwJ en la fracción extracelular detectados por Western blot	104
4.35	Digestión parcial de de TrwD-TrwK y TrwD-TrwB∆N70 con papaína	104

4.36	Digestión parcial de TrwD-TrwK (413-823) con papaína	105
4.37	Ensayo de interacción TrwD-TrwK mediante tamizado molecular	106
4.38	Ensayo de interacción TrwD-TrwC(1-293) mediante tamizado molecular	108
4.39	Retardos en gel con TrwC (1-293) sola o en presencia de TrwD	109
4.40	Retardos en gel con TrwC sola o en presencia de TrwD	109
4.41	Ensayo de actividad de corte de TrwC (1-293) y TrwC	110
4.42	Ensayo de actividad de corte de TrwC (1-293) y TrwC en presencia de TrwD	110
4.43	Actividad ATPasa de TrwD en presencia de TrwC(K502T)	111
4.44	Actividad ATPasa de TrwD en presencia de TrwC(408-966) y el péptido TrwC ₉₄₇₋₉₆₆	112
4.45	Actividad de TrwD en presencia de TrwK	113
4.46	Actividad de TrwK y TrwK(1-801) en presencia de TrwD	114
4.47	Inhibición de la actividad ATPasa de TrwD por los últimos 19 aminoácidos de TrwL	115
4.48	Alineamiento de secuencia de aminoácidos entre distintas pilinas	116
4.49	Análisis de un posible complejo TrwD-TrwL94-112 mediante tamizado molecular	117

Tablas Resultados

4.1	Frecuencias de conjugación de R388 y un mutante de <i>trwD</i> complementado con	
	distintos homólogos de VirB11	97
4.2	Resumen de las actividades desarrolladas por los diferentes mutantes de TrwD	100
4.3	Péptidos ensayados en actividad ATPasa de TrwD	115

Figuras Discusión

5.1	Modelo de regulación catalítica por el magnesio en las ATPasas de la familia VirB11	124
5.2	VirB11 actuando como interruptor molecular entre la biogénesis del pilus y el	
	transporte de sustrato	129

Abreviaturas

Å	Amstrong
АсК	Acetato potásico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNcs	ADN de cadena sencilla
ADP	Adenosín 5´-difosfato
AMP-PNP	Adenosín 5´-(β, γ-imido) trifosfato
Ар	Ampicilina
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CL	Cardiolipina
Cm	Cloranfenicol
CTD	Dominio C-terminal
DC	Dicroísmo circular
DMS	Dimetil suberimidato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
DWE	Agua destilada estéril
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Microscopía Electrónica
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-ácido piperazina etano sulfónico)
His-tag	Cola de histidinas
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MI	Membrana interna
	Membrana externa
NAD (NADH+)	Nicotinamida adenina dinucleotido
NBD	Dominio union a nucleotido
NC	Sitio de complex
	Ni ²⁺ ácido pitrilogoático
NI-INTA NI+	Nu -actuo Intinoacetico
	Dominic N terminal
	Nucleátido trifosfato
Ny	Ácido Nalidívico
	Durante toda la noche
oriT	Origen de transferencia
nh	
РС 42	Fosfatidicolina
PCR	Reacción en cadena de la nolimera
PDR	Protein Data Bank
PEG	Polietilenglicol
. 20	

Pi	Fosfato
PIPES	Piperazina-N,N-bis (2-ácido etanosulfónico)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNP	Purina nucleósido fosforilasa
PVDF	Membrana de polivinil difluor
p/v	Relación peso : volumen
SCOP	Structural Classification of Proteins
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Gel electroforesis SDS-poliacrilamida
Sm	Estreptomicina
Sp	Espectinomicina
TBST	Buffer salino con Tris y Tween20
TEMED	N, N, N´,N´- tetrametiletilendiamina
TGM	Buffer de transferencia (Tris-NaOH, glicina y metanol)
тм	Transmembrana
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) adenosín trifosfato
Тр	Trimetroprin
Tris	Trihidroximetil-amino-metano
T1SS	Sistema de secreción tipo I
T2SS	Sistema de secreción tipo II
T3SS	Sistema de secreción tipo III
Т4СР	Proteína acopladora del T4SS
T4P	Pilus tipo IV
T4SS	Sistema de secreción tipo IV
T5SS	Sistema de secreción tipo V
Vmax	Velocidad máxima de reacción
Ve	Volumen de elución
VC	Volumen de columna

INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas de secreción bacterianos

Las bacterias secretan un gran número de efectores al medio extracelular y a otras células. Estos efectores, en su mayoría de naturaleza proteica, son requeridos por las propias bacterias secretoras en distintos procesos biológicos tales como: la biogénesis de orgánulos, la adquisición de nutrientes, la expresión de factores de virulencia, etc. Gran parte de estos procesos de secreción son de gran relevancia biológica ya que se relacionan directamente con la virulencia de diversas bacterias patógenas, la plasticidad genómica o la rápida dispersión de resistencias a antibióticos.

En bacterias Gram-negativas, los sustratos secretados al exterior de la célula tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico. Para ello, las bacterias usan complejas maquinarias macromoleculares conocidas como sistemas de secreción. A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan los sustratos secretados, el número de sistemas de secreción es limitado, habiendo únicamente seis sistemas en Gram-negativas, numerados del I al VI (Economou *et al.*, 2006) (figura 1.1). Estos sistemas de secreción se pueden subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que utilicen para el transporte a través de la membrana interna (MI). Hay sistemas de secreción que son Sec-dependientes (T2SS, T5SS), ya que utilizan los sistemas de secreción denominados Sec o Tat para translocar los sustratos seguirán su ruta de secreción a través de sus correspondientes sistemas. Por otro lado, en otros sistemas de secreción la translocación de sustratos es Sec-independiente (T1SS, T3SS), siendo los sustratos translocados directamente desde el citoplasma hasta el exterior celular en un solo paso (Thanassi and Hultgren, 2000).



Figura 1.1. Representación de los principales sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas. MH (host membrane).

1.1.1. Sistemas de secreción tipo I (T1SS)

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de gran variedad de sustratos de diferente tamaño (Delepelaire, 2004). Entre los sustratos secretados por sistemas de tipo I podemos encontrar citotoxinas (como CyaA de *Bordetella pertussis*, HIyA de *E. coli* o Lkta de *Pseudomonas haemolytica*), antibióticos peptídicos (CvaC de *E. coli*), lipasas (LipA de *Salmonella marcescens*) o factores de nodulación (NodO de *Rhizobium leguminosarum*) (Wandersman and Delepelaire, 2004). Es una vía Sec-independiente, es decir, la secreción proteica se da en un solo paso desde el citoplasma hasta el exterior celular (Koronakis *et al.*, 1991). Los sustratos a exportar por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal (C-terminal). Esta señal de secreción no es procesada, pero sí es reconocida por un transportador ABC ("ATP binding cassette") en la MI. El T1SS está constituido por tres componentes: un canal en la ME denominado factor de membrana externa (OMF, "<u>O</u>uter <u>M</u>embrane <u>F</u>actor"), un transportador ABC en la MI y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y que se denomina MFP ("<u>M</u>embrane <u>F</u>usion <u>P</u>rotein") (Holland *et al.*, 2005).

El sistema de secreción tipo I más estudiado y que se toma como modelo es el que presentan cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas de humanos. En dicho sistema, el complejo se denomina TolC-HlyD-HlyB. TolC es una proteína trímerica anclada a la ME con una estructura β -barrel similar a la que presentan las porinas (Koronakis *et al.*, 2000). TolC contiene unas largas hélices periplásmicas que le ayudan a contactar con la proteína HlyB, el transportador ABC en la MI. TolC no está permanentemente unida a HlyB, sino que es recrutada por HlyD (la proteína de fusión a membrana MFP, en este sistema) tras la unión del sustrato HlyA (α -hemolisisna) al transportador HlyB. Este proceso es dependiente de la fuerza protón motriz (Balakrishnan *et al.*, 2001; Letoffe *et al.*, 1996; Thanabalu *et al.*, 1998) (figura 1.2).



Figura 1.2. Representación del T1SS de *E. coli* encargado de la translocación de HlyA, una toxina del tipo α -hemolisina. HlyB: transportador tipo ABC; se muestran las estructuras de los dominios de unión a nucleótidos (NBDs) solubles (PDB ID: 1xef) y los dominios C39like (CLDs) (PDB ID: 3zua). HlyD: proteína de fusión a membrana. TolC: proteína de ME (PDB ID: 1ek9).

1.1.2. Sistemas de secreción tipo II (T2SS)

Este grupo de sistemas de secreción se encuentra ampliamente distribuido y bastante conservado entre las γ -proteobacterias (Cianciotto, 2005; Sandkvist, 2001). Son sistemas multiproteicos que utilizan un mecanismo de dos pasos para la translocación. En el primer paso, el precursor del efector se transloca a través de la MI por el sistema Sec (Pugsley *et al.*, 1991) o el sistema Tat (Voulhoux *et al.*, 2001). Una vez en el periplasma, el efector es translocado a través de la ME por el T2SS, también llamado secretón.

Los T2SSs están compuestos por entre 12 y 16 proteínas llamadas Gsp ("<u>G</u>eneral <u>s</u>ecretion <u>p</u>athway") (Filloux, 2004). Cada uno de estos sistemas se puede dividir en tres subcomplejos: subcomplejo 1, formado por proteínas situadas en la MI como GspF, GspL, GspC, GspM (Py *et al.*, 2001) o asociadas a la MI, como es el caso de la ATPasa citoplasmática GspE, asociada a la MI a través de la interacción con GspL (Ball *et al.*, 1999; Sandkvist *et al.*, 1995); subcomplejo 2, formado por proteínas que forman el pseudo-*pilus* (GspGIJKH) (Nunn and Lory, 1991; Pugsley and Dupuy, 1992); subcomplejo 3, formado por la secretina GspD, formando un poro en la ME que permite el paso de sustratos (Bitter, 2003; Reichow *et al.*, 2010) (figura 1.3 panel A).

En función de las distintas estructuras resueltas para la toxina del cólera AB₅, del pseudo*pilus* y de la secretina GspD de *Vibrio cholerae*, se ha propuesto un mecanismo de pistón común para este sistema (figura 1.3).



Figura 1.3. Mecanismo de pistón para la secreción de proteínas a través del T2SS. (A) Esquema de los componentes del T2SS. (B) La secretina (azul) está en su estado cerrado. Se ha propuesto que las exoproteínas grandes, tales como la toxina heterohexamérica del cólera AB₅ (dorado), interaccionan con la parte distal del complejo que constituye el pseudo-*pilus* (gris) situado en la MI por debajo del canal que forma la secretina, o bien, se unen directamente a la secretina. (C) El pseudo-*pilus* podría extenderse en un paso posterior, actuando de manera similar a un pistón para empujar la toxina a través del dominio periplásmico de la secretina hacia la constricción de la misma. (D) La interacción entre el dominio N3 (constricción) y las exoproteínas podría actuar como gatillo para abrir el canal periplásmico, permitiendo su entrada en la cámara extracelular de la secretina. El paso final implicaría la apertura de la parte extracelular, permitiendo la secreción de las exoproteínas. Modificada de (Korotkov *et al.*, 2012).

1.1.3. Sistemas de secreción tipo III (T3SS)

El T3SS se encuentra en gran número de bacterias Gram-negativas que tienen como hospedadores tanto plantas como animales, ya sea como agentes patógenos o mutualistas (Mota and Cornelis, 2005). Se encuentran en géneros como Salmonella spp., Shigella spp., Yersinia spp., E. coli enterohemorrágica y enteropatogénica (EPEC) o Pseudomonas aeruginosa. Existen dos grandes subfamilias de T3SS: sistemas de secreción implicados en la movilidad flagelar (F-T3SS) y sistemas implicados en la secreción de agentes virulentos (NF-T3SS), también conocidos como "inyectisomas". Existe una gran similitud estructural entre ambos sistemas, lo que sugiere un mecanismo evolutivo común (Gophna *et al.*, 2003), probablemente a partir de un ancestro flagelar bacteriano (Saier, 2004).

La principal función conocida del inyectisoma es transportar los efectores bacterianos al citoplasma de la célula hospedadora, donde modulan una gran variedad de sus funciones, incluyendo la respuesta inmune y otros mecanismos de defensa (Grant *et al.*, 2006; Mota and Cornelis, 2005). En algunos casos, sin embargo, las proteínas efectoras son simplemente secretadas al exterior de la bacteria. Independientemente del destino que sufran. Los efectores se secretan siempre mediante un mecanismo de secreción de un solo paso (Sec-Independiente).

El T3SS es un complejo macromolecular con forma de aguja (Kubori *et al.*, 1998; Marlovits *et al.*, 2004) compuesto por más de 20 proteínas diferentes que atraviesan la MI y la ME y el espacio periplásmico entre ellas (Cornelis, 2006; Galan and Wolf-Watz, 2006). Este complejo puede subdividirse en 3 grandes dominios: el canal de secreción en la MI, un cuerpo basal y el complejo "aguja" propiamente dicho (NC, *needle complex* en inglés) (figura 1.4).

La estructura de gran parte del inyectisoma de *Salmonella typhimurium* ha sido resuelta mediante crio-microscopía electrónica (crio-EM) (Marlovits *et al.*, 2004). En esta estructura se puede observar el cuerpo basal formado por tres proteínas (InvG, PrgH y PrgK), que forman dos estructuras en forma de anillo (anillos interior y exterior) apilados uno encima de otro. El anillo interior presenta una organización concéntrica y está formado por dos proteínas (PrgH-K) con una simetría 24 (Yip *et al.*, 2005), mientras que el anillo exterior tiene una simetría 15 (figura 1.5).

En la base del inyectisoma está el canal de secreción compuesto por 5 proteínas transmembrana (Deane *et al.*, 2010) y una familia de chaperonas citoplasmáticas que se unen específicamente a las proteínas secretadas y son esenciales para la secreción (Diepold *et al.*, ; Sorg *et al.*, 2007). Asociada a este canal se encuentra una ATPasa hexamérica (InvC, *Salmonella enterica*) que tiene una función esencial en el reconocimiento y desplegamiento del sustrato. Se ha demostrado que esta ATPasa, usando la energía liberada de la hidrólisis de ATP, induce la liberación de efectores específicos desplegados a partir de las chaperonas (Akeda and Galan, 2005). Además, se ha demostrado que los T3SSs también necesitan la fuerza protón motriz para su funcionamiento (Wilharm *et al.*, 2004). Atendiendo a estos resultados, se ha postulado que el requerimiento de ATP es necesario para desplegar las proteínas, mientras que la fuerza protón-motriz es requerida para el transporte (Paul *et al.*, 2008).



Figura 1.4. Comparación entre las distintas familias de T3SSs y el flagelo. (A) Representación esquemática del flagelo. (B) Inyectisoma de *Yersinia enterocolitica* (C) Inyectisoma de EPECs (*Enteropatogenic E. coli*). (D) Inyectisoma de un patógeno de plantas como es *Pseudomonas syringae*. Tomada de (Cornelis, 2006).



Figura 1.5. Representación tridimensional del NC de *S. typhimurium.* (A y C) Reconstrucción tridimensional del NC, aplicando simetría C3 y filtrando a una resolución de ~10 Å: vista de un corte transversal (A) y de la parte superior e inferior del NC (C), mostrando la organización interior y exterior de las distintas subunidades que lo forman. (B) Diferente simetría aplicada al anillo del cuello y al anillo externo (C15) así como al anillo basal de la membrana interna (C24). Tomada de (Schraidt and Marlovits, 2011).

1.1.4. Sistemas de secreción tipo IV (T4SS)

Los T4SSs están dedicados al transporte de un grupo diverso de sustratos tales como ADN, proteínas, o complejos ADN-proteína a través de la membrana citoplasmática (Cascales and Christie, 2003; Waksman and Fronzes, 2010; Wallden *et al.*, 2010). Los T4SSs están implicados en diversos procesos importantes, como son la propagación de resistencia a antibióticos (Waters, 1999), la plasticidad genómica (Frank *et al.*, 2005), la colonización bacteriana y la introducción de factores de virulencia en células eucariotas (Christie *et al.*, 2005). Los T4SSs se encuentran tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Alvarez-Martinez and Christie, 2009) y juegan un papel importante en la virulencia de muchos patógenos bacterianos (Backert and Meyer, 2006).

Todos los T4SSs son máquinas formadas por múltiples subunidades perfectamente ensambladas, generando un canal de secreción que atraviesa la envoltura celular. Muchos T4SSs también codifican un *pilus* u otras proteínas de superficie que median el contacto directo con las células diana (Lai and Kado, 1998; Tanaka *et al.*, 2003). Estos sistemas se han agrupado en tres tipos diferentes según su función: 1) sistemas conjugativos, que translocan ADN a las células receptoras a través de un contacto directo célula-célula, 2) sistemas de incorporación/liberación de ADN del medio o hacia el mismo respectivamente y 3) sistemas que translocan efectores (figura 1.6) (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Waksman and Fronzes, 2010). Todos los T4SSs presentan una arquitectura similar a pesar de las diferencias en cuanto a la naturaleza de los sustratos secretados, su rol biológico y el destino de los sustratos. La mayoría de ellos están compuestos por 12 proteínas (11 más la proteína acopladora), nombradas de VirB1 a VirB11, tomando como sistema modelo el T4SS de *Agrobacterium tumefaciens*.



Figura 1.6. Representación esquemática de las distintas funciones de los T4SSs en bacterias. (A) La translocación de proteínas por los T4SSs a células eucariotas está directamente implicada en la virulencia de muchos patógenos Gramnegativos. Puede ser una translocación de efectores directamente al medio, por contacto directo célula-célula, mediante invasión o infección. (B) La transferencia de ADN por los T4SSs incluye los sistemas conjugativos, los cuales transfieren plásmidos o transposones desde una célula donadora a una receptora en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, y los sistemas de incorporación (transformación) y liberación (C), los cuales median el intercambio de ADN con el medio extracelular. También incluyen los sistemas VirB–D4 responsables de la transferencia de una parte (T-ADN) del plásmido Ti de *A. tumefaciens* a células de plantes. Tomada de (Waksman and Fronzes, 2010).

1.1.5. Sistemas de secreción tipo V (T5SS)

Los T5SS son los sistemas de secreción bacteriana más simples que se conocen y están presentes en gran número de bacterias Gram-negativas (Henderson and Nataro, 2001; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001; Pallen *et al.*, 2003). Más de 700 proteínas con funciones diversas, tales como auto-agregación, adherencia, invasión, citotoxicidad, y proteólisis utilizan este tipo de sistema de secreción para atravesar las dos membranas en un proceso Sec-dependiente (Henderson *et al.*, 2004; Mazar and Cotter, 2007).

Dentro de la clasificación de los T5SSs se incluyen los autotransportadores (AT) y los sistemas TPS ("<u>T</u>wo-<u>P</u>artner <u>S</u>ecretion"). Los autotransportadores, son proteínas compuestas por 3 dominios: un dominio N-terminal, que contiene la secuencia señal reconocida por Sec (Brandon *et al.*, 2003), un dominio "pasajero", de secuencia y longitud variable (hasta 3000 aminoácidos) y que contiene el factor de virulencia (Henderson and Nataro, 2001), y un tercer dominio C-terminal que contiene el poro translocador y que está altamente conservado (Yen *et al.*, 2002). Por el contrario, en los TPS, el dominio "pasajero" y el poro translocador se encuentran en dos proteínas distintas (TpsA y TpsB, respectivamente), cada una con una secuencia señal *sec* en el N-terminal (Surana *et al.*, 2006). En *Haemophilus influenzae* se ha descrito una segunda familia de autransportadores (AT-2). En dicha familia además de los dominios pasajero, translocador y secuencia *sec* característicos de la familia AT, aparece una secuencia específica en el extremo C-terminal del autotransportador (Hia) necesaria para la oligomerización de tres polipéptidos generando así un translocador estable trimérico (Surana *et al.*, 2004) (figura 1.7).



Figura 1.7. Representación esquemática de los distintos tipos de T5SSs. Mecanismo de secreción de los autotransportadores (A) del sistema TPS (B) y de la familia AT-2 (C). Se muestran los cuatro dominios funcionales de las proteínas: la secuencia señal, el dominio pasajero, la región conectora y el dominio lámina-β. Tomada de (Henderson *et al.*, 2004).

1.1.6. Sistemas de secreción tipo VI (T6SS)

Los T6SSs son sistemas de secreción descubiertos recientemente que aparecen en al menos la cuarta parte de todos los genomas secuenciados de Gram-negativas. Se han encontrado en multitud de patógenos tales como *P. aeruginosa, E. coli* enteroagregativas, *S. typhimurium, V. cholerae* y *Yersinia pestis* (Silverman *et al.*, 2012). La mayoría de los estudios sobre la función de estos sistemas se han llevado a cabo en el contexto de las interacciones hospedador-patógeno, sugiriendo que el T6SS es una herramienta versátil con papeles en virulencia, simbiosis e interacciones entre bacterias.

Los T6SSs son sistemas multiproteicos que pueden estar formados por un número variable de subunidades (entre 12 y 25). Las proteínas del T6SS están relacionadas evolutiva y estructuralmente con proteínas de fagos, por lo que es probable que este sistema sea una reminiscencia de la maquinaria de inyección de los fagos (Leiman *et al.*, 2009; Pukatzki *et al.*, 2007) (figura 1.8).



Figura 1.8. Comparación esquemática del bacteriófago T4 y la maquinaria de inyección del T6SS. (A) Arquitectura molecular del bacteriófago T4, estudiada ampliamente y bien definida (Mesyanzhinov et al. 2004). (B) Modelo del T6SS, basado en predicciones de localización subcelular y en la homología de secuencia entre las proteínas del fago y del T6SS. Las proteínas del T6SS están representadas usando el mismo color que sus homólogos en el fago T4. Tomada de (Records, 2011).

1.2. Sistemas de secreción tipo IV (T4SS)

1.2.1. Arquitectura general de los T4SSs

Los T4SSs de bacterias Gram-negativas atraviesan la envoltura celular, formando un canal para el paso de sustratos a través del espacio periplásmico y las membranas plasmáticas (Fronzes *et al.*, 2009a; Waksman and Fronzes, 2010). Como ya se ha mencionado anteriormente, a pesar de la diversidad de T4SSs existentes, la mayoría de ellos están compuestos por 12 proteínas (11 más la proteína acopladora) siendo éste el sistema más simple. De este modo, las subunidades proteicas que componen los T4SSs se pueden agrupar por función y/o ubicación en tres grupos (figura 1.9).

- I. El primer grupo lo constituyen las tres ATPasas citoplasmáticas asociadas a la MI, VirB4, VirB11 y VirD4, que proporcionan la energía necesaria para la transferencia de sustrato y el ensamblaje del sistema (Atmakuri *et al.*, 2004; Fronzes *et al.*, 2009a; Rivas *et al.*, 1997; Tato *et al.*, 2005).
- II. Un segundo grupo estaría constituido por las proteínas que forman el *core*, el canal propiamente dicho, así como otras proteínas asociadas: VirB8, VirB6 y VirB3. El *core complex*, constituido por VirB7, VirB9 y VirB10 se expande desde la MI a la ME atravesando el espacio periplásmico (Chandran *et al.*, 2009; Fronzes *et al.*, 2009b). VirB8, VirB6 y VirB3 se sitúan en la MI y forman parte de la base del canal (Jakubowski et al., 2004; Mossey et al., 2010).
- III. El tercer grupo lo constituyen VirB2 y VirB5, las cuales polimerizan para formar el *pilus* situándose en la parte exterior de la ME.


1.2.2. Importancia clínica asociada a la actividad de los T4SS y búsqueda de inhibidores

Como se ha indicado en el apartado 1.1.4, los T4SS son usados por bacterias Gram-negativas para la transferencia de toxinas proteicas, genes de resistencia a antibióticos y otros factores virulentos a células huésped. Las patologías asociadas a esta actividad biológica comprenden desde la brucelosis causada por el género *Brucella*, la úlcera gástrica provocada por *Helicobacter pylori* hasta la aparición de cepas resistentes a tratamientos antibióticos (Burns, 2003). En concreto, la aparición clínica de estas cepas multirresistentes en el ámbito hospitalario se asocia, entre otros procesos, a la conjugación bacteriana. Así pues, la utilización de inhibidores específicos de estos sistemas, podría prevenir la diseminación de estos genes de resistencia a cepas patógenas, especialmente peligrosas en pacientes inmunodeprimidos.

Existen pocos trabajos sobre inhibidores de la conjugación bacteriana. Los bifosfonatos han sido identificados como inhibidores de la actividad de la relaxasa del plásmido F (Lujan *et al.*, 2007). Por otro lado, VirB8 ha resultado ser la diana de inhibidores específicos que reducen la proliferación intracelular del patógeno *Brucella abortus* (Paschos et al., 2011). Mediante cristalografía de rayos X y ensayos *in silico* se ha podido identificar el sitio de unión de estos inhibidores a la proteína y como éstos afectan a su dimerización (Smith *et al.*, 2012). A través de un ensayo automatizado *high-throughput* de conjugación, también se ha identificado a los ácidos grasos insaturados como posibles inhibidores de la conjugación bacteriana entre una amplia librería de compuestos (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005). Este efecto inhibitorio se observó sólo en ciertos plásmidos como F y R388, mientras que en plásmidos como RP4, R6K o pKM101 no fue observado. Una hipótesis plausible es que los ácidos grasos actúen directamente sobre algún/os componentes de la maquinaria de conjugación. Más concretamente, la ausencia de efecto del ácido linoleico sobre la movilización del plásmido CloDF13 por parte del plásmido R388 sugiere que la principal diana de este compuesto es la maquinaria de transferencia y replicación de DNA (Dtr).

Se ha observado que los ácidos grasos insaturados también pueden afectar a la función de algunas proteínas asociadas a la membrana, como es el caso de Na⁺/K⁺-ATPasa, la Ca²⁺-ATPasa o DnaA, una ATPasa implicada en la iniciación de la replicación del cromosoma (Haag *et al.*, 1999; Swarts *et al.*, 1990; Yung and Kornberg, 1988). Las ATPasas asociadas a membrana que serían susceptibles de ser afectadas por estos ácidos grasos insaturados en el T4SS serían TrwB, TrwK y TrwD. A este respecto, resultados preliminares de una tesis previa, mostraron que la actividad de TrwD se veía afectada por el ácido linoleico en lo que parecía ser una inhibición de tipo no competitivo (Machon, 2004).

1.2.3. Análisis estructural y funcional de los componentes del *core complex*

VirB7, VirB8, VirB9 y VirB10 son las subunidades que componen el *core complex* (Chandran *et al.*, 2009; Fronzes *et al.*, 2009b; Sivanesan *et al.*, 2010) y están muy conservadas en la mayoría de los T4SSs de bacterias Gram-negativas (Christie *et al.*, 2005).

- VirB7 es una lipoproteína pequeña de 55 aminoácidos en A. tumefaciens que, a través de puentes disulfuro, estabiliza a la proteína hidrofílica VirB9, permitiéndole asociarse con la ME (Anderson et al., 1996; Spudich et al., 1996). También en A. tumefaciens se ha observado que VirB9 no sólo juega un papel importante en el ensamblaje del T-pilus, sino que también tiene un rol en la selección del sustrato (Jakubowski et al., 2005).
- VirB8 es una proteína transmembrana con un dominio globular periplásmico. Se ha resuelto la estructura cristalográfica de dicho domino en VirB8 de *A. tumefaciens* y *Brucella suis* (Terradot *et al.*, 2005), revelando un dímero. Por otro lado, se ha demostrado que VirB8 es importante para el posicionamiento espacial de las demás proteínas VirB y que puede, por lo tanto, funcionar como un centro de nucleación para el T4SS (Judd *et al.*, 2005). Pese a su importancia en el sistema, VirB8 no aparece en las estructuras del canal periplásmico resueltas por microscopía electrónica (Fronzes *et al.*, 2009b) y cristalografía de rayos X (Chandran *et al.*, 2009), por lo que podría tener una función de andamiaje del propio complejo sin llegar a formar parte de él.
- VirB10 tiene un pequeño dominio N-terminal, una región transmembrana anclada a la MI, una región rica en prolinas en el periplasma, y un dominio C-terminal con estructura de lámina-β localizado en la ME. Es la única proteína descrita hasta la fecha capaz de conectar ambas membranas (Fronzes *et al.*, 2009b). VirB10 parece actuar como un sensor/transductor de energía, experimentando un cambio conformacional como respuesta a la hidrólisis de ATP por parte de VirB11 y VirD4. De esta forma, se activaría la transferencia de sustrato a través de la porción distal del canal de secreción (Cascales and Christie, 2004b; Cascales *et al.*, 2013).

Mediante crio-microscopía electrónica se ha observado que TraN, TraO y TraF (homólogos de VirB7, VirB9 y VirB10, respectivamente, en el plásmido pKM101) se ensamblan formando un complejo estable que tiene forma de anillo, con unas dimensiones de 185 Å tanto de ancho como de largo (Chandran *et al.*, 2009; Fronzes *et al.*, 2009b). El complejo, con 14 copias de cada subunidad, se compone de dos capas apiladas, capas interna y externa ("I- y O-layers") unidas por un tramo de baja densidad electrónica (figura 1.10).





La porción distal del canal periplásmico, presumiblemente anclada a la ME, se resolvió mediante cristalografía de rayos-X (Chandran *et al.*, 2009). Este complejo corresponde a la denominada "O-layer" en la estructura de crio-microscopía y contiene 14 copias del dominio C-terminal de TraO (VirB9) y TraF (VirB10), además de la proteína completa TraN (VirB7) (Figura 1.11 A y B). Las α hélices de TraF (VirB10) se extienden desde la parte superior del barril β creando un poro en la ME. El resto del dominio C-terminal de TraF (VirB10) forma la cámara interna de la "O-layer" y está rodeado por el complejo TraN-TraO (VirB7-B9). Los dominios C-terminal de TraO y TraF (VirB9 y VirB10) interaccionan directamente, mientras que TraN (VirB7) interacciona con el dominio C-terminal de TraO (VirB9) pero no con TraF (VirB10) (figura 1.11). Dada la conservación que existe entre la secuencia de las proteínas Tra de pKM101 y VirB de *A. tumefaciens*, así como con la de otros T4SS, la estructura del *core complex* de pKM101 se postula como modelo para todos los T4SSs de bacterias Gram-negativas.



Figura 1.11. Estructura del core complex del T4SS de pKM101. Estructura cristalográfica del complejo de la ME ("Olayer") del canal periplásmico. TraN (VirB7), TraO (VirB9) y TraF (VirB10) están coloreadas en azul, amarillo y rojo, respectivamente. (A) Vista lateral del heterotrímero compuesto por VirB7, el dominio C-terminal de VirB9 y el dominio Ctermianal de VirB10. (B) Estructura cristalográfica del "core" completo asociado a ME. *Superior*, vista inclinada desde la ME. *Inferior*, vista lateral con el dominio periplásmico en la parte inferior de la figura. Tomada de la Tesis Doctoral (Kerr, 2010).

Recientemente, mediante crio-EM, se ha resuelto también la estructura del *core complex* de pKM101 a una resolución de 12,4 Å (Rivera-Calzada *et al.*, 2013). Estudios bioquímicos de digestión con elastasa han revelado que son los 161 primeros residuos de TraF (VirB10) los que forman la base del *core complex* en contacto con la MI, mientras que el N-terminal de TraO (VirB9) constituye la "I-layer". El complejo VirB7/VirB9/VirB10 podría funcionar como andamiaje para el resto del T4SS.

En la MI del T4SS se encuentra también VirB6, una proteína con cinco dominios transmembrana y una región periplásmica de gran tamaño que resulta esencial para interaccionar con otras subunidades (Jakubowski *et al.*, 2003; Jakubowski *et al.*, 2004). Tanto VirB6 como VirB8 contactan directamente con el T-ADN en *A. tumefaciens* (Cascales and Christie, 2004b). Aparte de ayudar a la co-localización del resto de los componentes del sistema, la función de estas dos proteínas en el T4SS aún está por determinar.

1.2.4. Componentes del pilus

En el extremo distal del T4SS se encuentra el *pilus*, una estructura que ayuda a las bacterias a adherirse a la célula huésped (Achtman *et al.*, 1978; Bradley and Cohen, 1976; Bradley *et al.*, 1980). El *pilus* está formado por dos proteínas. Una mayoritaria, VirB2, o pilina, y otra minoritaria, VirB5, o adhesina (Aly and Baron, 2007; Lai and Kado, 1998).

Se sabe muy poco acerca del ensamblaje de los monómeros de la pilina para formar un *pilus* funcional. El gen *trwL*, el homólogo de *virB2* en el plásmido R388, codifica un polipéptido de 112 residuos (pre-pilina) que es dirigido hacia la MI a través de su secuencia señal en el extremo N-terminal. Esta secuencia N-terminal (45 residuos en el caso de TrwL) se procesa por una peptidasa señal de tipo I, presumiblemente LepB (Eisenbrandt *et al.*, 2000; Majdalani and Ippen-Ihler, 1996). En VirB2 de *A. tumefaciens*, el residuo N-terminal resultante del corte se une covalentemente al C-terminal dando lugar a una pilina cíclica madura (Eisenbrandt *et al.*, 1999). También se ha observado una pilina cíclica en el caso de TrbC del plásmido RP4 (Kalkum *et al.*, 2002). TrbC_{RP4} no sólo es procesada por una peptidasa señal de tipo I (Lep) sino que también sufre un proceso de corte en su extremo C-terminal por una peptidasa específica (TraF), codificada por la propia región de transferencia del plásmido (Haase and Lanka, 1997). Sin embargo, no todos los homólogos de VirB2 adoptan una conformación cíclica. TraA del plásmido F permanece lineal, probablemente por N-acetilación de su N-terminal (Moore *et al.*, 1993).

Debido a su naturaleza hidrofóbica, VirB2 es capaz de acumularse en la bicapa lípidica sin la ayuda de ninguna otra proteína del T4SS, ni de la participación de la maquinaria Sec. Se ha observado que la energía proveniente de la fuerza protón motriz es importante para esta acumulación (Majdalani and Ippen-Ihler, 1996). La biogénesis del *pilus* requiere que las subunidades de pilina acumuladas en la MI sean dislocadas hacia el espacio periplásmico, necesitando para ello la actividad de las ATPasas propias del sistema, VirB4 y VirB11. Existen evidencias bioquímicas de que ambas proteínas están implicadas en el proceso (Kerr and Christie, 2010). VirB4 actuaría como un motor dislocador, mientras que VirB11 estaría modulando la actividad dislocasa de VirB4, induciendo cambios conformacionales en la pilina. Una vez en el periplasma, las subunidades de pilina se empaquetarían por sus regiones hidrofóbicas quedando así protegidas del ambiente hidrofílico exterior. Así pues, la oligomerización del *pilus* podría venir dada por las sucesivas interacciones hidrofóbicas, de una manera similar a la formación del pilus en los T2SS y el T4P.

El otro componente del *pilus* es VirB5. Se ha observado mediante inmuno-microscopía electrónica que esta proteína se localiza en el extremo distal del *pilus* (Aly and Baron, 2007). La estructura resuelta de TraC, homólogo de VirB5 (Yeo *et al.*, 2003) en el plásmido pKM101, revela una estructura α -helicoidal alargada con una región C-terminal expuesta y un apéndice globular que podría servir para interaccionar con distintas proteínas (figura 1.12). Mediante análisis mutagénico, se han identificado residuos implicados en la adhesión de bacteriófagos (Yeo *et al.*, 2003). Al igual que VirB2, VirB5 (TrwJ en el plásmido R388) posee una secuencia señal en el N-terminal (22 residuos en TrwJ) que, presumiblemente, es procesada por una peptidasa señal de tipo I. Al contrario que VirB2, la proteína procesada no es hidrofóbica por lo que no parece que se acumule en la MI. Por lo tanto, una vez que la reacción de corte tiene lugar, VirB5 sería exportada al periplasma pudiendo iniciar la formación del *pilus*, como sugieren Aly & Baron (2007). Esto podría explicar la localización

de VirB5 en el ápice del *pilus* y también el papel esencial de VirB5 en la incorporación de VirB2 al mismo (Lai *et al.,* 2000).



Figura 1.12. Estructura cristalográfica de TraC, homólogo de VirB5 en pKM101. Las α -hélices, la hélice 3₁₀, y los "loops" se indican en cian, azul y ámbar, respectivamente. Las tres hélices mayores se nombran como α 1 a α 3, y las hélices cortas, situadas entre α 1 y la α 2, como α a y α d. Tomada de (Yeo *et al.*, 2003).

1.2.5. ATPasas asociadas a la membrana interna

La mayoría de los T4SSs tienen tres ATPasas hexaméricas encargadas de realizar un trabajo mecánico, derivado de la hidrólisis de ATP, durante la biogénesis del T4SS y el transporte de sustratos (Arechaga *et al.*, 2008; Stephens *et al.*, 1995; Tato *et al.*, 2005). En *A. tumefaciens*, la actividad de las tres ATPasas (VirB4, VirD4 y VirB11) es requerida para la transferencia de sustrato, mientras que la de VirB11 y VirB4 pero no la de VirD4, se requieren para la formación del T-*pilus* (Lai *et al.*, 2000; Sagulenko *et al.*, 2001). Estas proteínas estarían situadas a la entrada del canal, en la cara citoplasmática de la MI (Atmakuri *et al.*, 2004).

1.2.5.1. VirD4

VirD4, también llamada proteína acopladora (T4CP, <u>Type 4</u> <u>Coupling Protein</u>), es una ATPasa de membrana que se encuentra en todos los sistemas conjugativos y en algunos implicados en virulencia (Cabezon *et al.*, 1997). A diferencia de VirB4 y VirB11, VirD4 es un motor esencial para la translocación de sustrato pero prescindible para la biogénesis del *pilus* (Lai *et al.*, 2000).

TrwB del plásmido R388 es el homólogo de VirD4 mejor caracterizado. Esta proteína ha sido descrita como una ATPasa dependiente de ADN (Tato et al., 2005). La estructura cristalográfica de TrwBAN70, el dominio citoplasmático de TrwB, revela un hexámero de simetría seis con un canal central de 20 Å de diámetro y un poro externo de 8 Å (Gomis-Ruth et al., 2001) (figura 1.13). TrwB presenta similitudes estructurales y/o funcionales con otras ATPasas hexaméricas de la familia RecA como, F1-ATPasa, T7 helicasa, o FtsK, lo que sugiere que TrwB funciona como un motor que utiliza la energía liberada de la hidrólisis de ATP para bombear ADN de cadena sencilla a través de su canal central (Cabezon and de la Cruz, 2006). La proteína está anclada a la MI a través de dos α -hélices del domino N-terminal. Este dominio transmembrana de TrwB regula la afinidad por los distintos nucleótidos (Vecino et al., 2010) y es importante para la estabilización estructural de la proteína, como se demuestra en experimentos de reconstitución en liposomas (Vecino et al., 2011). El dominio C-terminal de TrwB, contiene los motivos "Walker A" y "Walker B" implicados en la unión e hidrólisis de ATP. Recientemente, se ha demostrado que TrwB une sustratos de ADN con estructura específica, siendo su sustrato preferente ADN G-quádruplex (Matilla et al., 2010). TrwB podría actuar resolviendo este tipo de estructuras secundarias surgidas durante el procesamiento del ADN durante la conjugación o, alternativamente, estas estructuras podrían actuar como sitios de carga para este motor. Así pues, son necesarios más estudios para tratar de aclarar la función in vivo que estas estructuras G-quádruplex tienen sobre la actividad de TrwB.



Figura 1.13. Características estructurales de TrwB. (A) Vistas frontal y lateral del hexámero mostrando sus dimensiones. (B) Representación de TrwB entera, está incluido un modelo de la región transmembrana (en color gris), correspondiente a dos hélices transmembrana consecutivas a partir de la estructura del centro de reacción fotosintético (PDB ID 1mps) de *Rhodobacter sphaeroides*. Tomada de (Gomis-Ruth *et al.*, 2001).

TrwB recibe el nombre de proteína acopladora por conectar el complejo del relaxosoma con el canal de secreción. El relaxosoma de R388 tiene varios componentes: un fragmento de ADN que contiene el *oriT* (origen de transferencia), la proteína piloto o relaxasa conjugativa (TrwC), el factor de integración (IHF) y la proteína accesoria (TrwA). Se ha visto que TrwB es una ATPasa ADN-dependiente que interacciona con el relaxosoma a través de TrwA (Tato *et al.*, 2007) y con el canal de secreción a través de TrwE (homólogo de VirB10 en R388) (Llosa *et al.*, 2003). VirB10 también ha

sido descrito como sensor de la actividad ATPasa de la T4CP en *A. tumefaciens* (Cascales and Christie, 2004a).

La relaxasa corta el ADN mediante un ataque nucleofílico llevado a cabo por un grupo hidroxilo de la tirosina catalítica en el extremo 5' fosfato del ADN, llevando a cabo una reacción de trans-esterificación que resulta en una unión covalente entre la proteína y el ADN (Grandoso *et al.*, 2000). Tras la reacción de corte, comienza la síntesis de ADN desde el extremo 3' de la cadena cortada, por replicación en círculo rodante (RCR). La nueva cadena de ADN sintetizada en el donador desplazaría la cadena vieja, la cual se transfiere a la célula recipiente covalentemente unida a la relaxasa.

El complejo nucleo-proteico debe ser reclutado en la MI para iniciarse la transferencia a través del T4SS. Como ya se ha indicado anteriormente, este paso es mediado por la proteína acopladora de membrana VirD4 (Cabezon *et al.*, 1997). En el plásmido R388, la interacción de TrwB con el ADN es facilitada por TrwA, una proteína accesoria tetramérica que se une a la secuencia *oriT* en el relaxosoma. TrwA se une a su secuencia específica en el plásmido R388 a través de su dominio N-terminal (Moncalian and de la Cruz, 2004), mientras que mediante el dominio C-terminal se une a TrwB estimulando la actividad ATPasa de esta última (Tato *et al.*, 2007). La formación de complejos TrwA-TrwB ha sido demostrada por cromatografía de tamizado molecular y experimentos de cross-linking (Tato *et al.*, 2007). En el plásmido F, se han observado interacciones equivalentes entre la proteína acopladora TraD y el componente del relaxosoma TraM (Lu and Frost, 2005) y se ha cristalizado el complejo formado por un péptido que contiene los 10-12 últimos residuos del dominio C-terminal de TraD unido al dominio de tetramerización de TraM (TraM⁵⁸⁻¹²⁷) (Lu *et al.*, 2008).

La relaxasa, unida covalentemente al ADN, se secreta unidireccionalmente a la célula recipiente en dirección 5'-3'. Mediante ensayos de conjugación triparentales se ha demostrado que la relaxasa TrwC es secretada a la célula recipiente a través del T4SS y, una vez en el huésped, puede complementar en conjugación un mutante de R388 que no expresa la proteína TrwC funcional (Draper *et al.*, 2005). Además, TrwC puede ser secretada incluso en ausencia de ADN, lo que sugiere que la propia proteína contiene la secuencia señal de transferencia para el complejo nucleoproteico. Recientemente se han descrito dos regiones de traslocación específicas (TS1 y TS2) en TrwC, localizadas en los residuos 796-802 y 813-819, respectivamente. Se ha observado que mutaciones en la región TS1 afectan drásticamente al proceso conjugativo (Alperi *et al.*, 2013). Así pues, se puede suponer que la secreción de la relaxasa, covalentemente unida al ADN de cadena sencilla, media los primeros pasos de transferencia del ADN.

Aunque son conocidas como relaxasas, gran parte de esta familia de proteínas presenta un dominio extra C-terminal con distintas actividades (helicasa, primasa, recombinasa, etc) (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Estas proteínas, por lo tanto, presentan grandes dimensiones. De hecho, Tral, la relaxasa del plasmido F, es una de las proteínas más grandes que existen en el interior de *E. coli* (182 kDa). TrwC de R388 también es una proteína de un gran tamaño (108 kDa). Debido a las dimensiones de estas proteínas y, teniendo en cuenta las dimensiones del canal del T4SS resuelto por crio-EM (Figura 1.10), es muy probable que sólo puedan ser secretadas en forma desplegada. Todavía no está claro cómo se lleva a cabo este proceso, ni que proteína está encargada del mismo.

La figura 1.14 ilustra los distintos pasos explicados, dentro del mecanismo general de transferencia de plásmidos.



Figura 1.14. Mecanismo general de transferencia de plásmidos. Los plásmidos conjugativos contienen una secuencia origen de transferencia (*oriT*), y expresan proteínas para la formación del *pilus*, el canal de secreción, la proteína acopladora (T4CP) (en color amarillo), la relaxasa (en color rosa) y las proteínas accesorias (en color gris). Algunos relaxasas, como es el caso de TrwC, pueden contener además un dominio helicasa o primasa para facilitar el procesamiento de ADN conjugativo (en rosa con línea de puntos). El procesamiento del T-ADN se lleva a cabo como se describe en el texto de la figura, y se transfiere como ADN de cadena sencilla. Para mayor claridad, las etapas 1-4 se ilustran con fragmentos de ADN lineal. Tomada de (Zechner *et al.*, 2012).

1.2.5.2. VirB4

Las proteínas de la familia VirB4 están muy conservadas y, a diferencia de otros componentes del sistema, están presentes en todos los T4SSs descritos (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006). Estas proteínas juegan un papel esencial en la biogénesis del *pilus*, en la virulencia y en el transporte de sustratos (Rabel *et al.*, 2003).

Son proteínas de entre 600 y 900 aminoácidos formadas por dos dominios estructurales, N y C-terminal, bien diferenciados. El motivo N-terminal es el menos conservado de los dos y se postula como un dominio que podría intervenir en la oligomerización de la proteína y/o en la unión a la MI. Esta unión parece estar mediada por la interacción con la proteína integral de membrana VirB3 (Arechaga *et al.*, 2008; Batchelor *et al.*, 2004). El dominio C-terminal, de aproximadamente unos 400 aminoácidos constituye el dominio motor de la proteína. Es el más conservado y contiene los motivos catalíticos "Walker A" y "Walker B", característicos de la familia RecA. Mutaciones en dichos motivos en TrbE del plásmido RP4 han demostrado ser esenciales para la producción del *pilus* y la transferencia de ADN (Rabel *et al.*, 2003). Una mutación en el motivo Walker B de TrwK del plásmido R388 inhibe totalmente la actividad ATPasa así como el proceso de la conjugación (Arechaga *et al.*, 2008). Los últimos 51 residuos en este dominio C-terminal forman 3 α -hélices que otorgan un importante papel regulador en la actividad ATPasa de esta familia de proteínas, tal y como se ha comprobado en el caso de TrwK, homólogo del plásmido R388 (Pena *et al.*, 2011).

La homología entre el dominio C-terminal de las proteínas VirB4 y la proteína acopladora de R388, TrwB, sugiere que este dominio motor de VirB4 puede también formar un homohexámero (Middleton *et al.*, 2005). Sin embargo, existe cierta controversia en relación al estado oligomérico de esta familia de proteínas. TrwK se ha descrito como proteína soluble y con capacidad de formar hexámeros en presencia de sales de acetato (Arechaga *et al.*, 2008). Por otro lado, la fracción de membrana de TraB de pKM101 forma dímeros estables, mientras que la fracción soluble puede formar hexámeros (Durand *et al.*, 2011). Recientemente, en nuestro grupo se ha obtenido mediante microscopía electrónica (EM) la estructura de TrwK, siendo ésta la primera estructura de la proteína entera en su estado hexamérico (Pena *et al.*, 2012) (figura 1.15). La estructura cristalográfica, resuelta recientemente, del dominio motor del homólogo de VirB4 de *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* ha confirmado una homología estructural con la proteína TrwB/VirD4 (Wallden *et al.*, 2012). Además, se ha sugerido una relación evolutiva entre este dominio C-terminal y diversas translocasas de ADN (Cabezon et al., 2012; Iyer et al., 2004; Pena et al., 2012).



Figura 1.15. Estructura tridimensional de TrwK (homólogo de VirB4 en R388) obtenida por microscopía electrónica. Vista inferior (A), inclinada (B), superior (C) y lateral (D) del volumen obtenido filtrado a 22 Å. Las vistas superiores e inferiores, correspondientes a los dominios N-terminal y C-terminal, respectivamente, difieren en tamaño (132 Å y 124 Å, respectivamente), siendo el tamaño longitudinal de 165 Å. Modificada de (Pena *et al.*, 2012).

La presencia de VirB4 es importante para la estabilización del resto de componentes del T4SS (Yuan *et al.*, 2005). Por otra parte, existen evidencias de que VirB4 es la encargada de dislocar las subunidades de pilina (VirB2) desde la MI al espacio periplásmico, habiéndose observado una interacción directa entre VirB2 y VirB4 (Kerr and Christie, 2010). Además de interaccionar con VirB2, VirB4 también interacciona con las otras dos ATPasas del sistema VirD4 y VirB11 (Atmakuri *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012; Middleton *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2012). En *A. tumefaciens*, mediante un ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para las distintas proteínas VirB seguido de una PCR específica para el plásmido Ti ("TriP Assay") (Cascales and Christie, 2004b), se ha definido la ruta de secreción para el sustrato de ADN. Los intermediarios y el orden de transferencia del sustrato sería el siguiente: VirD4-VirB11-VirB6-VirB8-VirB9 y VirB2. Se ha observado que mutando el motivo "Walker A" de VirB4 se bloquea el paso del ADN en el punto mediado por VirB11, impidiendo la transferencia de sustrato a VirB6 (Atmakuri *et al.*, 2004).

Con todos estos resultados, es plausible pensar en VirB4 como una proteína implicada tanto en la biogénesis del aparato como en la transferencia de sustrato.

1.2.5.3. VirB11

La familia de proteínas VirB11 está ampliamente distribuida en sistemas conjugativos y sistemas patogénicos de bacterias Gram-negativas (Alvarez-Martinez and Christie, 2009). En estos sistemas, esta familia de proteínas es esencial para la formación del *pilus* y la transferencia de sustrato (Sagulenko *et al.*, 2001). A diferencia de lo que ocurre con las proteínas de la familia VirB4, presentes en todos los T4SS, se han descrito sistemas que no poseen un homólogo VirB11. Algunos ejemplos son sistemas de captación ComB de *H. pylori*, el sistema conjugativo del plásmido F, o la mayoría de sistemas de bacterias Gram-positivas (a excepción del sistema del género *Bacillus*). La razón por la que esto sucede es todavía una incógnita.

Entre los miembros de esta familia encontramos cuatro motivos con un alto grado de conservación: los motivos "Walker A y B" de unión e hidrólisis de nucleótidos, la caja His y la caja Asp (Krause *et al.*, 2000a; Rivas *et al.*, 1997). Estudios genéticos en *A. tumefaciens* muestran que la mutación en el motivo "Walker A" (GxxGxGKT/S) suprime tanto la transferencia de sustrato como la formación del *pilus* (Sagulenko *et al.*, 2001; Stephens *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha descrito que mutaciones en el motivo "Walker A" tanto de TrwD (homólogo de VirB11 en R388) como de TrbB (homólogo de VirB11 en RP4), suprimen la actividad ATPasa y con ello la función *in vivo* (Krause *et al.*, 2000b; Rivas *et al.*, 1997). Los motivos caja His y Asp también son importantes para la formación del *pilus* como se ha demostrado en mutantes de PilQ (homólogo de VirB11 en R64) (Sakai *et al.*, 2001). En *A. tumefaciens* se han identificado mutaciones que afectan, de una manera selectiva, la producción del T-*pilus* sin interferir en la transferencia de sustrato (Sagulenko *et al.*, 2001).

Todavía no está del todo claro cómo VirB11 regula la biogénesis del *pilus*. Se ha propuesto un modelo en el cual VirB4 funcionaría como un motor dislocador extrayendo la pilina desde la MI durante la biogénesis del sistema. VirB11 actuaría conjuntamente con VirB4 para inducir un cambio estructural en la pilina, siendo por tanto, un modulador de la actividad dislocasa de VirB4 (Kerr and Christie, 2010). En este sentido, para llevar a cabo esta modulación en la actividad de VirB4, es lógico pensar en la existencia de una interacción entre ambas proteínas. Dicha interacción ha sido observada mediante técnicas de coinmunoprecipitación y doble híbrido (Atmakuri *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2006), tal y como se ha explicado en la sección anterior. En *A. tumefaciens* la región de interacción delimitada correspondería al dominio N-terminal de VirB11 (residuos del 1 al 106) y al dominio C-terminal de VirB4 (residuos 443 al 564) (figura 1.16).



Figura 1.16. Dominios de interacción mapeados en los modelos de VirB4 y VirB11. (A) Mapeado de las posibles regiones de interacción de VirB4 y VirB11 en su secuencia. (B, C) Vistas lateral y frontal del mapeado de dichas regiones en el modelado del hexámero del CTD de VirB4 (cian) y VirB11 (azul) implicadas en la interacción. Modificada de (Draper *et al.*, 2006).

Los miembros de la familia VirB11 son proteínas que se asocian estrechamente con la MI sin poseer ninguna región transmembrana conocida, encontrándose en un equilibrio dinámico entre la forma citoplasmática y la forma asociada a la MI. Se ha propuesto que este comportamiento dinámico regularía su actividad (Krause *et al.*, 2000a; Rashkova *et al.*, 1997). Aunque las proteínas VirB11 tienen actividad ATPasa por sí solas, esta actividad puede ser estimulada al interaccionar con lípidos de membrana, sugiriendo que su asociación con la membrana es biológicamente relevante (Krause *et al.*, 2000b; Rivas *et al.*, 1997). Por otro lado, mediante experimentos de reconstrucción en liposomas y basándose en la estructura de HP0525 de *H. pylori*, se ha sugerido que TrwD interacciona con la bicapa lipídica a través de regiones hidrofóbicas en su dominio N-terminal, lo que conllevaría a un cierto grado de desestabilización de la membrana (Machon *et al.*, 2002).

Con respecto al estado oligomérico, se ha demostrado que VirB11 de *A. tumefaciens* es capaz de asociarse consigo misma (Rashkova *et al.*, 2000) y se ha observado por microscopía electrónica que tanto TrbB de RP4, HP0525 de *H. pylori* como TrwD de R388 forman anillos hexaméricos (Krause *et al.*, 2000a; Krause *et al.*, 2000b). Además, estudios estructurales en homólogos como HP0525 de *H. pylori* y VirB11 de *B. suis* han aportado evidencias de que estas ATPasas se ensamblan como homohexámeros formados por dos anillos apilados (Hare *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2000). Las proteínas de esta familia comparten una organización estructural común que consiste en dos dominios, un dominio N-terminal (NTD) y un dominio C-terminal (CTD) catalítico con actividad ATPasa, conectados por un *linker* flexible. La comparación de las estructuras

Capítulo 1 Introducción

cristalográficas de HP0525 y VirB11 desveló un movimiento de pivotación del dominio NTD sobre el dominio CTD a través del *linker*, sin afectar a la estructura hexamérica en su conjunto (figura 1.17 panel A) (Hare *et al.*, 2006). Pese a no verse afectada la estructura hexamérica, las interacciones entre subunidades contiguas dentro del mismo sí se ven afectadas. De este modo, las subunidades contiguas en el hexámero de *B. suis* se mantienen juntas mediante interacciones entre el *linker*-CTD y CTD-CTD, mientras que en el hexámero de HP0525, las interacciones ocurren principalmente entre el NTD de una subunidad con el CTD de la subunidad adyacente (figura 1.17 panel B). Estas diferencias en la interacción entre subunidades contiguas afecta al sitio de unión a nucleótido. Así pues, en HP0525, dicho sitio está coordinado entre el NTD y el CTD de la misma subunidad, mientras que en VirB11 de *B. suis* se localiza entre el NTD de una subunidad y el CTD de la subunidad contigua. La consecuencia directa de esta diferencia es que la actividad ATPasa de VirB11 de *B. suis* podría ser dependiente de la oligomerización mientras que HP0525 podría ser capaz de hidrolizar ATP independientemente de la formación del hexámero (Savvides *et al.*, 2003).



Figura 1.17. Comparación entre los hexámeros de VirB11 *B. suis* **y HP0525 de** *H. pylori*. (A) Dos subunidades contiguas de VirB11 (rojo y magenta) y HP0525 (azul y cian), así como el resto de subunidades de VirB11 (dorado) y HP0525 (gris). (B) Vista en detalle de la interfaz de contacto entre las dos subunidades destacadas en azul y cian (HP0525) y rojo y magenta (VirB11). La orientación está girada 90° sobre el eje horizontal del hexámero que se muestra en (A). Se muestra el sitio de unión a nucleótido (NBS) de un monómero de HP0525 (Hare *et al.*, 2006).

Estudios bioquímicos y estructurales de HP0525 de *H. pylori* han proporcionado detalles acerca del dinamismo en las proteínas pertenecientes a la familia VirB11. Se ha observado que HP0525 sufre cambios conformacionales de una manera dependiente a la unión de nucleótido. Por otro lado, mientras que en la estructura resuelta con ADP los seis monómeros presentan dicho nucleótido, en la estructura con ATP_YS sólo uno de los dos monómeros de la unidad asimétrica se encuentra ocupado (Savvides *et al.*, 2003). Basándose en estas diferencias los autores han propuesto un modelo del mecanismo (figura 1.18). En ausencia de nucleótidos, el anillo formado por los dominios CTD permanece inmóvil, manteniendo los contactos entre subunidades en la estructura hexamérica, mientras que los dominios NTDs son flexibles y muestran varias conformaciones que provocan asimetrías en el anillo. La unión de tres moléculas de ATP inducen un cambio conformacional de tres NTDs hacia una conformación rígida. Posteriormente, la hidrólisis de estas moléculas junto con la unión de otras tres moléculas de ATP a las subunidades libres restantes, bloquea el hexámero en una estructura rígida y simétrica. Cuando todos los nucleótidos son hidrolizados y liberados, la estructura se relaja y el hexámero vuelve a su estado libre de nucleótido.



Figura 1.18. Modelo del modo de acción de las ATPasas VirB11. El dominio NTD y el CTD se representan en rosa y azul celeste, respectivamente. Los dominios NTD mantienen una conformación bloqueada rígida en la forma ATP (azul) y la forma ADP (amarillo). Tomada de (Savvides *et al.*, 2003).

1.3. Superfamilia de *traffic ATPases*

Evolutivamente hablando, los homólogos de VirB11 pertenecen a la superfamilia de las llamadas *traffic ATPases*, donde se incluyen ATPasas del T2SS (GspE) y T4SS, ATPasas implicadas en la síntesis del *pilus* tipo IV y ATPasas implicadas en el ensamblaje del flagelo en arqueobacterias (figura 1.19) (Planet *et al.*, 2001).



Figura 1.19. Árbol filogenético de un conjunto de NTPasas de sistemas de secreción tipo II/IV construido con algoritmos de máxima parsimonia. Las subfamilias de genes se designan por cajas de colores y los subgrupos por líneas verticales. Las divisiones de Arquea y Bacteria en la subfamilia de genes *tadA* se muestran en dos tonos de verde. Tomada de (Planet *et al.*, 2001). *Gsp* (*General Secretory Pathway*, T2SS); *pilT, pilB, pilU, comG1* (ATPasas Type IV pili, T4P); *tadA, virB11* y *trbB* (ATPasas T4SS).

1.3.1. Estructura general

Estructuralmente, todos los miembros de la superfamilia de secreción *traffic ATPases* se caracterizan por formar una anillo toroidal hexamérico donde las subunidades interaccionan entre sí de una manera muy estrecha y constan de un dominio NTD y otro CTD separados por un *linker*. Tanto el dominio NTD como el CTD, en general, están estructuralmente conservados a pesar de la escasa identidad de secuencia entre homólogos pertenecientes a esta familia (figura 1.20). Como consecuencia de las diferencias existentes en la longitud de secuencia, aparecen elementos estructurales adicionales. Por ejemplo, el NTD de PilT de *Aquifex aeolicus* se asemeja a los dominios Per/Arndt/Sim, los cuales funcionan como sensores en proteínas de señalización. Por otra parte, el dominio de unión a nucleótido CTD en este sistema presenta un motivo extra de 7 α -hélices cortas, con una secuencia señal para la retracción del *pilus* (AIRNLIRE) (Aukema *et al.*, 2005).



Figure 1.20. Estructura cristalográfica de las cinco proteínas de la superfamilia de traffic ATPases resueltas hasta el momento. HP0525 de H. pylori (PDB ID: 1g6o), PilT de A. aeolicus (PDB ID: 2ewv), VirB11 de B. suis (PDB entry: 2gza), GspE de Archaeglobulus fulgidus (PDB ID: 20ap), y EpsE de V. cholerae (PDB ID: 1p9w). Los dominios NTD y CTD están coloreados en naranja y azul, respectivamente. El esquema central representa el anillo toroidal hexamérico típicamente adoptado por estas ATPasas. No se han observado hexámeros directamente en la estructura cristalográfica de EpsE pero se postula que éste es su estado oligomérico in vivo (Robien et al., 2003). Para PilT, se muestran elementos de estructura secundaria adicionales en el NTD y CTD coloreados en verde y rojo, respectivamente. Tomada de (Savvides, 2007).

Puesto que las ATPasas del T2SS (GspE y sus homólogos) y las implicadas en la biogénesis del *pilus* tipo IV (PiIT) presentan una clara similitud estructural con la familia VirB11, están ampliamente caracterizadas a nivel bioquímico-estructural y son miembros altamente representativos de la superfamilia de las *traffic ATPases*, se les ha dedicado un apartado aparte (apartados 1.3.2 y 1.3.3, respectivamente).

1.3.2. Estructura y mecanismo de acción de GspE, ATPasa del T2SS

Para el correcto funcionamiento del T2SS se requiere la presencia de GspE, una ATPasa citoplasmática que utiliza la energía liberada en la hidrólisis de ATP para secretar proteínas. Esta proteína pertenece a la superfamilia de las *traffic ATPases*. GspE presenta los motivos de unión a nucleótidos "Walker A" y "Walker B" característicos de esta familia de ATPasas, así como las cajas His y Asp (Planet *et al.*, 2001). Una mutación en el motivo "Walker B" del homólogo EpsE en *V. cholerae* suprime la actividad ATPasa (Camberg *et al.*, 2007). Se ha cristalizado la forma truncada del homólogo EpsEΔ90 de *V. cholerae* con y sin nucleótido (Robien *et al.*, 2003) relacionándola estructuralmente con su homólogo HP0525 en el T4SS de *H. pylori* (figura 1.21). La cristalización del complejo formado por el dominio N-terminal de EpsE y el dominio citoplasmático de otra proteína anclada a la MI (EpsL) ha permitido dilucidar la forma en la que la ATPasa de este sistema se asocia a la MI (Abendroth *et al.*, 2005). EpsL está implicada en la oligomerización de EpsE, estimulando de este modo su actividad ATPasa. Además, este complejo EpsE/EpsL ve incrementada su actividad en presencia de fosfolípidos (Camberg *et al.*, 2007). En *Xanthomonas campestris* también se ha observado cómo XpsE (homólogo de GspE) interacciona con el dominio N-terminal de XpsL (homólogo de GspL) estimulando así su actividad ATPasa (Shiue *et al.*, 2006).



Figura 1.21. Comparación de las estructuras y los distintos subdominios de las *traffic ATPases* implicadas en la secreción bacteriana de tipo II y tipo IV. (A) Vista esquemática de los distintos subdominios (N1, N2, C1 y C2) de tres ATPasas implicadas en distintos procesos de secreción: T4SS de *H. pylori*, T2SS de *A. fulgidus* y T2SS de *V. cholerae*, respectivamente. (B) Estructuras de los monómeros de HP0525 (izquierda), afGspE (centro), y EpsE (derecha). Los subdominios similares N2 (verde) y C1 (azul) forman un "core" conservado flanqueado por los dominios variables N-terminal en HP0525 (gris), N1 (amarillo) y C2 (magenta) en afGspE, y la región C_M (naranja claro) y C2 (naranja) en EpsE. Tomada de (Yamagata and Tainer, 2007).

La estructura cristalográfica resuelta de GspE de *A. fulgidus* en presencia de AMP-PNP y magnesio, ha revelado por primera vez una alternancia entre una conformación abierta y otra cerrada de las subunidades dentro del anillo hexamérico (Yamagata and Tainer, 2007) (figura 1.22).





Tanto el estudio sobre la ATPasa HP0525 del T4SS del patógeno humano *H. pylori* (Savvides *et al.*, 2003) como el trabajo sobre GspE del T2SS de *A. fulgidus* (Yamagata and Tainer, 2007), donde se combinan estudios cristalográficos, estudios de ultracentrifugación analítica y "small-angle X-ray scattering" (SAXS), han demostrado que los miembros de esta superfamilia de *traffic ATPases* son anillos hexaméricos dinámicos que sufren grandes reajustes en la disposición de sus dominios debido a la unión e hidrólisis del ATP. Basándose en dichos estudios, se ha propuesto un modelo de acción para GspE que puede ser extrapolable a todos los miembros de esta familia de proteínas (figura 1.23).



Figura 1.23. Modelo de acción de GspE. En la forma libre de nucleótido (apo) (parte superior izquierda), el dominio NTD (azul claro) y el CTD (azul) están en equilibrio entre la conformación abierta y cerrada. La conformación abierta y más accesible (parte superior derecha) favorece la unión de ATP (nucleótido en rojo y fosfatos en amarillo). La interacción entre las dos argininas (en representación "stick" residuos rojos y en azul los átomos de nitrógeno) y el Y-fosfato bloquea la conformación cerrada catalítica activa (parte central derecha), y consecuentemente la interacción del Mg²⁺ (esfera morada) con las dos residuos glutamato conservados (en representación "stick" residuos verdes y en rojo los átomos de oxígeno). La liberación del Y-fosfato después de la hidrólisis de ATP, desbloquea la conformación cerrada y acelera el cambio conformacional hacia la forma abierta (parte central izquierda), lo que favorece la liberación del ADP. Este mecanismo de pivotamiento del NTD sobre el CTD se ha propuesto como mecanismo universal para la superfamilia de las *traffic ATPases.* En la parte inferior de la figura se muestran el hexámero simétrico en su estado unido a ADP (izquierda). Tomada de (Yamagata and Tainer, 2007).

1.3.3. Estructura y mecanismo de acción de PilT, ATPasa implicada en la retracción del *pilus* de tipo IV

Los pili de tipo IV bacterianos son filamentos largos, finos y flexibles situados en la superficie celular, mediando diversas funciones tales como: la adhesión celular, formación de biofilms, migración quimiotáctica, *twitching motility*, etc. El *twitching motility* es un movimiento de superficie asociado a ciclos sucesivos de polimerización/despolimerización del *pilus* (Skerker and Berg, 2001) que tiene lugar gracias a la energía liberada por las ATPasas PilB y PilT, respectivamente (Jakovljevic *et al.*, 2008). En *P. aeruginosa* existe una tercera ATPasa PilU (Burrows, 2005) cuya ausencia provoca la pérdida de dicho movimiento.

Al igual que para GspE y la familia VirB11, se ha propuesto un comportamiento dinámico en el mecanismo de acción de PiIT de *A. aeolicus* atendiendo a las estructuras cristalográficas resueltas (Satyshur *et al.*, 2007). Ninguno de los hexámeros simétricos resueltos con ATP o ADP corresponde a la forma activa de la proteína ya que el sitio de unión a nucleótido en ambos se encuentra incompleto. Este hecho sugiere que la forma funcional debe ser una conformación hexamérica distinta a las anteriores. Existe una tercera estructura hexámerica de simetría dos (figura 1.24 panel C) donde las subunidades A, C, D y F presentan una conformación cerrada del dominio NTD sobre el CTD al compararla con la estructura hexamérica de simetría seis. Las subunidades B y E presentan una conformación abierta alejándose del centro del hexámero, a través de una rotación de 65° sobre el *linker*. Con esta estructura asimétrica, la subunidad F presenta un sitio de unión a nucleótido completo formado por argininas de la propia subunidad, como de la subunidad adyacente, formando lo que los autores denominan *arginine wire*.

Según lo expuesto, el modo de acción propuesto implicaría que para un momento concreto, sólo alguna subunidad del hexámero de PilT puede ser activa, mientras que el resto tendría un papel estructural de soporte.



Figura 1.24. Distintas conformaciones hexaméricas de PilT variando su simetría. (A) Se muestra la estructura cristalográfica del hexámero de grupo espacial P6 con una de las subunidades en amarillo. (B) Vista perpendicular al eje de simetría de la principal interacción entre subunidades presente tanto en la estructura cristalográfica unida a ATP como a ADP. El dominio CTD de una subunidad interacciona con el domino NTD de la subunidad contigua. (C) Estructura cristalográfica asimétrica. Las subunidades E y B (azul claro y azul oscuro, respectivamente) están desplazadas con respecto al centro del hexámero. Tomada de (Satyshur *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha sugerido que PilT podría sufrir grandes movimientos derivados de la unión e hidrólisis de ATP, al igual que GspE y HP0525, lo que haría posible el desplazamiento de las subunidades del *pilus* decenas de amstrongs hacia su localización final. Esta hipótesis fue corroborada al resolver las estructuras de PilT de *P. aeruginosa* en su ausencia y presencia de nucleótidos AMP-PCP (Misic *et al.*, 2010). La magnitud de estos movimientos del dominio NTD sobre el CTD observados en PilT está en concordancia con los observados en otras estructuras cristalinas de otras NTPasas de secreción como por ejemplo GspE (20AP.pdb) (Yamagata and Tainer, 2007).

1.3.4 Reajustes entre dominios en el contexto de la superfamilia de RecA/AAA+ ATPasas

Los motores moleculares son, por definición, capaces de realizar un trabajo mecánico asociado a la energía que se libera a través de la unión e hidrólisis de ATP. A lo largo de esta última parte de la introducción se ha explicado cómo distintos miembros de la familia de *traffic ATPases* sufren grandes reajustes en la disposición de sus dominios gracias a la energía liberada de la unión e hidrólisis del ATP. Este tipo de movimientos no sólo son comunes en dicha familia sino que también son extrapolables a la superfamilia de RecA/AAA+ ATPasas (ATPasas Asociadas a diversas Actividades celulares), caracterizadas por presentar una estructura tridimensional hexamérica en forma de anillo.

Se ha propuesto que la dirección de la fuerza generada, como consecuencia del movimiento entre dominios, se puede predecir basándose en la orientación de las láminas β centrales características del dominio RecA (Wang, 2004). De este modo, en la F1 ATPasa el movimiento resultante hace girar la subunidad central del motor en el plano de la membrana (figura 1.25, panel D). En el caso de HIsU, la fuerza generada es paralela al eje del hexámero (figura 1.25, panel E), lo que ayudaría a translocar las cadenas polipeptídicas a través de su canal central antes de ser entregadas al complejo de degradación proteosomal HsIV (Rohrwild *et al.*, 1996).

Por último, los motivos de plegamiento característicos del dominio RecA de PilT se disponen en la tercera orientación ortogonal posible. Este hecho también se observa en GspE y HP0525 por lo que las fuerzas generadas son diagonales al eje central del hexámero para estos tres miembros de la superfamilia de *traffic ATPases* (figura 1.25, paneles A, B y C, respectivamente). Además, esta dirección diagonal de la fuerza generada concuerda con los movimientos necesarios para que las subunidades de pilina se retiren coordinadamente desde su posición en el *pilus* hacia la membrana interna siguiendo el eje central del mismo y por otro lado se desplacen hacia fuera del eje del hexámero en el plano de la membrana.



Figura 1.25. Fuerza generada a partir de los reajustes entre subunidades en las ATPasas hexaméricas de la familia RecA. La unión de ATP conduce a grandes movimientos (flechas rojas) en la subunidad (azul claro). Los paneles de la izquierda muestran dos vistas del hexámero con cada subunidad representada en un color diferente. El zoom sobre la subunidad en azul claro, ilustra el movimiento del dominio durante la unión a nucleótido mientras el dominio RecA se encuentra fijado. Las ATPasas de secreción (A) PiIT, (B) GspE y C) HP0525 presentan movimientos diagonales al eje central del hexámero mientras (D) la F1-ATPasa y (E) HSIU tienen movimientos perpendiculares y paralelos al eje central del hexámero, respectivamente. Imagen modificada de (Misic *et al.*, 2010).

Según este último capítulo de la Introducción, queda patente cómo el estudio de esta familia de proteínas a nivel bioquímico y estructural es de gran validez para determinar no sólo su función biológica sino también el mecanismo por el cual trasducen la energía liberada de su actividad a la realización de una determinada función.



2. Objetivos

- 2.1. Estudiar el mecanismo enzimático de TrwD para aportar pruebas bioquímicas que corroboren que TrwD y las proteínas VirB11 pertenecen a la superfamilia de ATPasas implicadas en el tráfico de proteínas durante la secreción bacteriana.
- 2.2. Determinar el papel biológico de TrwD durante la biogénesis del sistema y/o la transferencia de sustrato.
- 2.3. Evaluar inhibidores de la conjugación bacteriana que actúen específicamente sobre la actividad ATPasa de TrwD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

3.1. Cepas bacterianas

Tabla 3.1. Cepas utilizadas en esta tesis.

Сера	Genotipo	Referencia
BL21 (DE3)	F^{-} ompT hsdS ⁻ gal	(Studier and Moffatt, 1986)
C41 (DE3)	F dcm ompT hsdS (r_B m_B) gal λ	(Miroux and Walker, 1996)
C43 (DE3)	F dcm ompT hsdS ($r_B m_B$) gal λ	(Miroux and Walker, 1996)
DH5a	F supE44 DlacU169 (f80lacZDM15) hsdR17	(Grant et al., 1990)
	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	
D1210	F recA hspR hsdM rpsl lacI ^q	(Sandler and Clark, 1990)
UB1637	F recA56 his lys trp rpsL	(de la Cruz and Grinsted, 1982)

3.2. Plásmidos

Tabla 3.2. Plásmidos empleados para esta tesis.

Plásmido	Descripción	Fenotipo	Referencia	
pET3a	Vector de Expresión	Ap ^r , Cm ^r Rep (pMB8)	(Rosenberg <i>et al.,</i> 1987)	
pET28a	Vector de Expresión	Km ^r , Rep (pMB8)	(Jin <i>et al.,</i> 2002)	
pET29c	Vector de Expresión	Km ^r , Rep (pMB8)	Novagen	
pCDF	Vector de Expresión	Sm ^r , Sp ^r , Rep (CloDF13)	Novagen	
pBAD33	Vector de Expresión	Ap ^r	(Guzman <i>et al.,</i> 1995)	
R388	Plásmido conjugativo IncW	Tp ^r	(Avila and de la Cruz, 1988)	
рКМ101	Derivado por delección del plásmido R46	Ap ^r , IncN	(Hall, 1987)	
RP4	Plásmido conjugativo IncP	Ap ^r , Km ^r , Tc ^r , IncP	(Pansegrau <i>et al.,</i> 1994)	
pSU4132	R388-Δ <i>trwD</i> ::Tn5 <i>tac1</i>	Km ^r	(Bolland, 1991)	
pSU4039	R388-∆trwD::omega deltaE	Cm ^r	(Rivas <i>et al.,</i> 1997)	
pSU4059	PILw	Ap ^r , Rep (pMB8)	(Bolland, 1991)	
pSU5038	pET3a:: <i>trwJ</i>	Ap ^r , Rep (pMB8)	(Revilla C., unpublished)	
pAB2	pLAFR5-Km::Bt trw region	Km ^r , Tc ^r	(Seubert <i>et al.,</i> 2003)	
pMEC05	pET28a:: <i>TrwB∆N70</i>	Km ^r	(Ripoll-Rozada <i>et al.,</i> 2013)	
pUCD4002	pET3a:: <i>trwL</i>	Ap ^r , Rep (pMB8)	(Sastre, 1996)	
pSAN2	pET28a:: <i>trwK</i>	Km ^r , Rep (pMB8)	(Pena <i>et al.,</i> 2012)	
pSU1547	pET22b:: <i>trwA</i>	Ap ^r , Rep (pMB8)	(Moncalian and de la Cruz, 2004)	
pSAN17	pET28a:: <i>trwK</i> (1-787)	Km ^r , Rep (pMB8)	(Pena <i>et al.,</i> 2011)	
pSAN18	pET28a:: <i>trwK</i> (1-801)	Km ^r , Rep (pMB8)	(Pena <i>et al.,</i> 2011)	
pSAN19	pET28a:: <i>trwK</i> (413-823)	Km ^r , Rep (pMB8)	(Pena, 2012)	
pSAN43	pET28a:: <i>trwK</i> (1-375)	Km ^r , Rep (pMB8)	(Pena, 2012)	

Plásmido	Descripción	Resistencia	Molde	Enzimas / Oligonucleótidos 5' 3'
pJR01	pET3a:: <i>trwD</i> ,	Ap ^r	pSU2007	AAAAT <u>CATATG</u> TCTACAGTCTCGAAAGC
	Rep (pMB8)			AAAAT <u>GGATCC</u> TAAGCATCTTGGAC
pJR02	pET28a:: <i>trwD</i> ,	Km'	pJR01	Ndel - BamHl
DIDU3		۸p ^r	nCU1621	Ndol Damul
μιιου	Rep (pMB8)	Λp	h201051	Nuci - Dumm
pJR04	pET3a:: <i>trwC</i> (K502T),	Ap ^r	pCIG1026	Ndel - BamHl
·	Rep (pMB8)			
pJR05	pET3a:: <i>trwD</i> (K203A),	Ap ^r	pJR01	Quickchange
	Rep (pMB8)			ACCGGCTCGGGCGCAACCACGTTTGC
				GCAAACGTGGTTGCGCCCGAGCCGGTC
pJR06	pCDF:: <i>trwD</i> ,	Sm', Sp'	pSU2007	GGATTTCAG <u>CCATGG</u> CTACAGTCTC
	Rep (CIODF13)	K and f		
рјко7	$\begin{array}{c} p \in I \ 28a :: \ (rwD(r \ 203A), \\ Ren (nMB8) \end{array}$	кт	рлкоз	Ndel - BamHi
pJR08	pET28a:: <i>trwC</i> ,	Km ^r	pJR03	Ndel – BamHI
P0.100	Rep (pMB8)		p	
pJR10	pET29c::trwD,	Km ^r	pSU2007	AAAACCATATGTCTACAGTCTCGA
	Rep (pMB8)		·	AACCG <u>CTCGAG</u> AGCCATCTTGGAC
pJR11	pCDF:: <i>trwK,</i>	Sm ^r , Sp ^r	pSU2007	AAAAT <u>CCATGG</u> GGGCAATTGAATC
	Rep (CloDF13)			AACGC <u>GGATCC</u> TCATACGTCGCTC
pJR13	pCDF:: <i>trwD</i> (K203A),	Sm ^r , Sp ^r	pJR05	GGATTTCAG <u>CCATGG</u> CTACAGTCTC
	Rep (CloDF13)			AAAAT <u>GGATCC</u> TAAGCATCTTGGAC
pJR19	pET3a:: <i>trwD</i> (K86A),	Ap ^r	pJR01	Método Megaprimer
	Rep (pMB8)			PCR1:AAAAT <u>CATATG</u> TCTACAGTCTCGAAAGC
				ATAGTTGACGCTTGCTGGAGCCACC
				PCR2:AAAAT <u>GGATCC</u> TAAGCATCTTGGAC
pJR20	pET28a:: <i>trwD</i> (K86A),	Km'	pJR19	Ndel – BamHl
pJR21	nET3a:: <i>trwDΔN164</i> ,	Ap ^r	pJR01	TGCCCATATGTTCGAGGTTGAGCTAT
P	Rep (pMB8)	, I .	h	AAAATGGATCCTAAGCATCTTGGAC
pJR22	pET3a:: <i>trwD</i> (1-121),	Ap ^r	pJR01	AAAATCATATGTCTACAGTCTCGAAAGC
r	Rep (pMB8)			TATGGATCCCTAGGAGTGTTTGCGGATG
pJR23	pCDF:: <i>trwD</i> (V106G),	Sm ^r , Sp ^r	pSU4677	GGATTTCAGCCATGGCTACAGTCTC
	Rep (CloDF13)			AAAAT <u>GGATCC</u> TAAGCATCTTGGAC
pJR24	pCDF:: <i>trbB</i> ,	Sm ^r , Sp ^r	RP4	AAAA <u>CCATGG</u> CCGGGAAAGAAGAG
- 	Rep (CloDF13)			AAT <u>GGATCC</u> TTACAGGGTTTTGGTGA
pJR27	pCDF:: <i>traG</i> ,	Sm ^r , Sp ^r	pKM101	AAAA <u>CCATGG</u> CTGATGCAGCTTTCT
	Rep (CloDF13)			AAT <u>GGATCC</u> TTACAGGCTCCCGTTCAC
pJR28	pBAD33::trwD,	Cm ^r	pJR01	CGG <u>GGTACC</u> AAGAAGGAGATATACATATGTCTACAGTCTCG
	OriV (pACYC184)			CCC <u>AAGCTT</u> CTAAGCCATCTTGGACT
pJR29	pBAD33::traG,	Cm ^r	pJR27	CGG <u>GGTACC</u> AAGAAGGAGATATACATATGACTGATGCAGCT
	OriV (pACYC184)			CCC <u>AAGCTT</u> TTACAGGCTCCCGT
pJR30	pBAD33::trbB,	Cm ^r	pJR24	CGG <u>GGTACC</u> AAGAAGGAGATATACATGTGAGCGGGAAAGAA
	OriV (pACYC184)			CCC <u>AAGCTT</u> TTACAGGGTTTTGGTGA
pJR31	pCDF:: <i>trwB∆N70,</i>	Sm ^r , Spʻ	pMEC05	AAAA <u>CCATGG</u> CTAATAGCGTCGGACAA
	Rep (CloDF13)			AAT <u>GGATCC</u> TTAGATAGTCCCCTCAACA
pJR32	pET28a::trbB,	Km'	pJR24	AAAAT <u>CATATG</u> AGCGGGAAAGAAGAGTTT
	Rep (pMB8)			AAT <u>GGATCC</u> TTACAGGGTTTTGGTGA
pJR33	pET3a::trwD B.trib,	Apʻ	pAB2	AAAAT <u>CATATG</u> TCTACAGTCTCGTCACAC
	Rep (pMB8)	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,		AAT <u>GGATCC</u> TTAAGCGATTTTTGATTTAG
pJR34	pET28a:: <i>trwD B.trib,</i> Rep (pMB8)	Km'	pJR33	Ndel – BamHl

Tabla 3.3. Plásmidos construidos durante esta tesis.

3.3. Medios de cultivo

Para el crecimiento de bacterias en medio líquido se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (10 g/l triptona, 5 g/l extracto levadura, 5g/l NaCl) (Sambrook et al. 1989). Este medio fue suplementado con 1,5 % agar (p/v) para los cultivos sólidos. En el caso de crecimiento en medios selectivos, se añadieron los siguientes antibióticos, según el caso, a las concentraciones indicadas: ácido nalidíxico (Nx, Sigma-Aldrich) 25 µg/ml, estreptomicina (Sm, Apollo) 300 µg/ml, ampicilina (Ap, Apollo) 100 µg/ml, kanamicina (Km, Sigma-Aldrich) 25 µg/ml, trimetoprim (Tp, Sigma-Aldrich) 10 µg/ml, espectinomicina (Sp, Sigma-Aldrich) 50 µg/ml y cloranfenicol (Cm, Sigma-Aldrich) 25 µg/ml.

Para la conservación de las cepas, se centrifugaron los cultivos en fase estacionaria y se resuspendieron en una mezcla 50 % de glicerol y 50 % de peptona al 1,5% (p/v) en LB. Las cepas se guardaron a -80° C.

Métodos

3.4. Técnicas de Biología Molecular

3.4.1. Clonación y amplificación de ADN por PCR

<u>Extracción y purificación de ADN</u>: para las extracciones de ADN se utilizaron los distintos kits comerciales disponibles de la marca Sigma-Aldrich. De este modo, para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit *GenElute Plasmid Miniprep* (Quiagen). Para la extracción de ADN de geles de agarosa, se utilizó el kit *GenElute Gel Extraction* y para la limpieza del ADN y/o cambio de tampón se utilizó el kit *GenElute PCR Clean-Up*. Para la determinación de la concentración del ADN se utilizó un Nano-Drop Spectrophotometer ND-1000.

<u>Amplificación por PCR</u>: las mezclas de reacción para la amplificación de fragmentos de ADN se hicieron en un volumen final de 50 µl. Dicha mezcla contiene: los oligonucleótidos directo y reverso a una concentración de 10 pmol/µl, ADN molde (50-100 ng), 200 µM de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs), 1U de polimerasa, 1X del tampón de la polimerasa y agua destilada. Siempre que se requirió usar una polimerasa de alta fidelidad, se usó la polimerasa *Vent* (Biolabs). Para amplificaciones de comprobación, se utilizó la polimerasa *Biotaq* (Bioline) y una polimerasa recombinante producida por D. Carlos Revilla en el laboratorio del Dr. Fernando de la Cruz.

<u>Digestión Enzimática</u>: tanto los vectores de clonación como los insertos, provenientes de digestiones de otros plásmidos o de reacciones de PCR, fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes. Todas las digestiones se hicieron en un volumen final de 20 μ l. La mezcla de digestión contenía 500 ng de ADN, 1U de las enzimas de restricción (Fermentas), 1X del tampón comercial recomendado por el fabricante y agua destilada. Las digestiones se dejaron un mínimo de dos horas a una temperatura de 37°C.

<u>Defosforilación de ADN</u>: para aumentar la eficacia de la ligación y disminuir la aparición de falsos positivos se defosforilaron los extremos libres del vector digerido con fosfatasa alcalina (Fermentas) según las indicaciones del fabricante, manteniéndola 30 minutos a 37°C e inactivándola posteriormente a 65°C durante 20 minutos.

<u>Ligación</u>: las reacciones de ligación se llevaron a cabo poniendo una relación vector:inserto de 1:5. Dichas reacciones contenían 10-15 ng de vector, 5 veces más de inserto, 5U de la ligasa del fago T4 (Fermentas), 1X del tampón comercial y agua destilada hasta un volumen final de 20 μ l. Las digestiones se dejaron a 16°C o/n. Como control negativo de las ligaciones se utilizó la misma reacción sin inserto, añadiendo el volumen equivalente de agua.

<u>Secuenciación de ADN</u>: se secuenciaron todos los clones obtenidos mediante amplificación por PCR. Para ello se enviaron al servicio de MACROGEN Inc. "DNA Sequencing Service" (Amsterdam, Holanda). Las muestras para secuenciación contenían 500 ng de ADN molde y 25 pmoles del oligonucleótido necesario en cada caso en un volumen final de 10 µl.

3.4.2. Mutagénesis dirigida

Para realizar mutaciones puntuales en residuos específicos de la proteína se emplearon los dos métodos que se describen a continuación.

Doble PCR: se realizó por el método del megaprimer de Sarkar (Sarkar and Sommer, 1990). Consta de dos PCRs. En la primera de ellas, uno de los oligonucleótidos contiene la mutación que se quiere introducir y el otro oligonucleótido lleva un sitio de restricción conocido en la secuencia. Como resultado de la primera reacción de PCR, la mutación queda fijada en uno de los extremos de la molécula amplificada. En la segunda PCR, el producto amplificado de la primera PCR actúa como cebador, junto a un oligonucleótido que se encuentra en dirección opuesta. De esta forma, la mutación queda en el interior de la molécula amplificada final. <u>QuickChange</u>: para realizar la mutación en el sitio Walker A de TrwD (K203A), se usó el kit de mutagénesis sitio-específica *QuickChange*[®] (Stratagene). La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 20 µl en una mezcla de reacción que contenía 2 µl de tampón 10X, 25 ng de plásmido molde, 0,5 µM de cada oligonucleótido mutagénico, 1 µM de dNTPs y 0,25 µl de la enzima KDO Hot-Star DNA polimerasa (2,5 U/ml). Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v). El producto amplificado se trató con 10 U/µl de la endonucleasa *DpnI* durante 2 horas a 37°C y se electroporó a células de *E. coli* DH5 α competentes (1 µl de DNA / 50 µl de células).

Finalmente, se sembraron 100 μ l de la reacción de transformación sobre placas de LB-Agar que contenían el antibiótico apropiado para el vector y fueron incubadas (o/n, "overnight") toda la noche a 37° C.

3.5. Técnicas Microbiológicas

3.5.1. Preparación de células competentes y electroporación de ADN

Con el siguiente protocolo se obtuvieron células competentes de las cepas DH5 α , D1210 y C41(*DE3*) de *E. coli*, permitiendo obtener frecuencias de transformación $\geq 5 \times 10^8$ colonias/µg (Hanahan, 1983).

La cepa a electroporar se sembró directamente a partir de un cultivo congelado en glicerol en una placa de LB y se incubó a 37°C. Se inoculó una colonia puntual en un matraz de 10 ml de LB y se dejó creciendo en agitación a 37°C o/n. El cultivo se diluyó en una relación 1:20 en un matraz de 200 ml con medio LB fresco y se incubó en agitación a 37°C hasta una $DO_{600} = 0,6$.

Las células se incubaron en hielo durante 30 min y posteriormente se centrifugaron a 5.000 *g* durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* con las células se resuspendió en 200 ml de agua destilada autoclavada y fría. Se repitió este paso de lavado y centrifugación para luego resuspender las células en 200 ml de una solución 10 % glicerol (p/v) autoclavada y mantenida en hielo. Por último, se volvió a centrifugar, se descartó el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspendió en un volumen mínimo de 1 ml aproximadamente del glicerol restante. Se hicieron alícuotas de 60 μ l en tubos *Eppendorf* estériles y se almacenaron a -80°C.

El ADN a transformar se dializó en filtros Millipore GS de 0,05 μ m de tamaño de poro en una placa Petri con agua destilada durante 20-30 min para eliminar la mayor cantidad posible de sales. El ADN dializado se recogió y se añadió (1- 100 pg) a una alícuota (60 μ l) de células competentes. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm Gene Pulser (BioRad) enfriada previamente en hielo. Para la transformación, se utilizó un electroporador MicropulserTM (BioRad) a 2,5 kV, 25 μ F y 200 Ω . Las células electroporadas fueron disueltas en 1 ml de LB estéril y se incubaron

a 37°C con agitación para la expresión de la resistencia del antibiótico correspondiente (de 60 a 90 min en función del antibiótico). Por último, se sembraron 100 μ l de células en una placa de LB-Agar suplementado con el antibiótico correspondiente.

3.5.2. Curvas de crecimiento

La cepa de *E. coli* DH5 α que contenía el plásmido conjugativo R388 nativo fue inoculada partiendo de colonia puntual y crecida a 37°C o/n en un medio mínimo que contenía 1 % sales M9 (Fluka), 20 µg/ml Tp, 0,5% casaminoácidos (p/v), 0,4 % glucosa (p/v), 1 mM cloruro cálcico, 1 mM tiamina y 10 µM, 1 mM ó 5 mM de sulfato magnésico, según el experimento.

Los cultivos saturados se diluyeron 1:1000 en un medio fresco. Se inocularon en una placa de noventa y seis pocillos con las tres condiciones de magnesio, cada una de ellas en doce pocillos para poder hacer medias. Otros doce pocillos fueron usados como blanco, con medio sin inocular, en las mediciones de absorbancia. La placa fue incubada a 37°C en agitación durante doce horas en un fluorímetro automatizado Victor3 (Perkin-Elmer). La DO₆₀₀ para cada pocillo se registró cada 5 min.

3.5.3. Ensayos de conjugación bacteriana

Los cultivos fueron crecidos a 37°C, en agitación, o/n, en 10 ml de medio LB o mínimo (según experimento) con el antibiótico correspondiente. Las células donadoras fueron diluidas en una relación 1:20 y crecidas hasta fase exponencial (DO_{600} ~ 0.6). Posteriormente 200 µl de estas células donadoras se mezclaron con 500 µl de las células recipientes en fase estacionaria. Se centrifugó la mezcla a 15.000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se desechó. Las células fueron resuspendidas en un mililitro de medio fresco y se volvieron a centrifugar para eliminar los antibióticos. El precipitado resultante se resuspendió en un volumen aproximado de 100 µl y se dispuso en filtros de acetato de celulosa de 0.2 µm de poro (Sartorius stedim biotech) sobre una placa de LB-Agar o medio mínimo (según experimento) durante una hora a 37°C. Por último, los filtros fueron lavados en 2 ml de medio LB sin antibióticos y agitados con *vortex*. Se hicieron diluciones seriadas y se sembraron 100 µl de las mismas en placas con los antibióticos correspondientes, seleccionando para células transconjugantes y donadoras. Para el cálculo de las frecuencias de conjugación se usó la siguiente fórmula:

 $Frecuencia \ de \ conjugación = \frac{n \'umero \ de \ transconjugantes \ x \ dilución}{numero \ de \ donadores \ x \ dilución}$
3.6. Técnicas Bioquímicas

3.6.1. Producción de proteínas recombinantes en E. coli

Para la producción de proteínas recombinantes se usaron todos los plásmidos que contenían el gen a sobre-expresar bajo el promotor de la T7 RNA polimerasa. Todas las sobreexpresiones se llevaron a cabo en la cepa C41(DE3) exceptuando casos en los que la proteína presentaba bajos niveles de sobre-expresión o bien dicha sobreexpresión resultaba tóxica para la célula. En estos casos, se utilizaron las cepas C43(DE3) y BL21pLys, respectivamente. Las sobreexpresiones se llevaron a cabo en matraces de 1 litro de LB con los antibióticos correspondientes a una temperatura de 37°C, inoculando a partir de colonia puntual. La inducción de la sobre-expresión del gen correspondiente se llevó a cabo en fase exponencial tardía (DO_{600} ~0,6) mediante la adición de 1 mM IPTG. Al cabo de 6 horas tras la adición de IPTG (3 horas en el caso de TrwC) los cultivos se centrifugaron a 5.000 g durante 15 min y a 4°C. Los precipitados resultantes se resuspendieron en 5 ml por litro de cultivo en un tampón consistente en 100 mM spermidin3-3HCl, 200 mM NaCl y 2 mM EDTA y se guardaron a -80°C.

3.6.2. Purificación de proteínas

Purificación de TrwD y TrwD (K203A)

Como primer paso en la purificación, se procedió a lisar las células utilizadas para la sobreexpresión de TrwD. Para ello, se descongeló el volumen equivalente a 2 litros de cultivo y se resuspendió en 24 ml de tampón (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10% sacarosa, 2 mM EDTA, 5 mM benzamidina, 1 mg/ml lisozima, 2 μg/ml aprotinina, 2,5 μg/ml leupeptina, 1 mM PMSF y una pastilla de un cocktail de inhibidores de la casa comercial Roche). Tras 15 min de incubación en hielo se añadieron otros 24 ml de tampón (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 M NaCl, 1 mM EDTA y 0,6 % (p/v) Triton X-100). Se mantuvo la mezcla de lisis durante 20 min en hielo y, seguidamente, las células lisadas se ultracentrifugaron a 100.000 g y a 4°C durante una hora, con un rotor tipo 50.2 Ti. El sobrenadante se precipitó mediante la adición de una solución saturada de (NH₄)₂SO₄ al 60 % (p/v) durante una hora. Posteriormente se centrifugó a 100.000 g x durante 30 min. El pellet se resuspendió en 40 ml de tampón A (20 mM Hepes pH 6.8, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT, 10 % glicerol, 1 mM PMSF) y se dializó o/n en 4 litros del mismo tampón. Se filtró y se cargó en una columna de intercambio iónico HiTrap Q-Sepharose (5 ml) (Amersham, GE). El volumen no retenido en la columna se dializó durante 3 horas con 4 litros de tampón A pH 7,6. Pasado ese tiempo, la muestra se cargó en una columna Resource Q (6 ml) y la proteína se eluyó usando un gradiente lineal de 0,1 M NaCl a 1 M NaCl. Por último, se concentró y se cargó en una columna HiLoad 16/60 Superdex200 (Amersham, GE). Las fracciones se eluyeron en 20 mM Hepes/NaOH pH 7,6, 0,2 mM NaCl, 1 mM PMSF y 5 % glicerol (p/v) y fueron guardadas a -80°C.

Purificación de HisTrwD

Los pasos de lisado fueron los mismos que en el caso de TrwD nativa. El lisado se diluyó hasta conseguir una concentración final de 100 mM de NaCl y 50 mM imidazol. La muestra se cargó en una columna de afinidad HisTrap FF (5ml) (Amersham, GE) y se eluyó con un gradiente lineal en un tampón 50 mM Tris pH 7.6, 100 mM NaCl y 1 mM PMSF que contenía imidazol a concentraciones crecientes (50 mM a 500 mM). Se juntaron las fracciones que contenían HisTrwD, se diluyeron hasta alcanzar una concentración de 50mM de NaCl y se cargaron en una columna HiTrap Q-Sepharose (5ml). La proteína se eluyó aplicando un gradiente lineal (50 mM a 1M) de cloruro sódico. Finalmente, la proteína se concentró y cargó en una columna HiLoad 16/60 Superdex200 (Amersham, GE). Las fracciones se eluyeron en 50 mM Tris pH 7.6, 0.2 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 10% glicerol (p/v) y guardaron a -80°C.

Purificación de TrwC y TrwC (K502T)

Los pasos a seguir para la obtención del lisado fueron los mismos que en los dos casos anteriores. En este caso, se partió de 1 litro de cultivo. El lisado se diluyó hasta conseguir una concentración final de 200 mM NaCl.

Se realizó una primera cromatografía de intercambio iónico en una columna de fosfocelulosa-P11 (Whatman). La resina se activó según las instrucciones de la casa comercial y se empaquetaron 15 ml con un adaptador de 2,5 cm de diámetro interno (BioRad). El lisado se cargó en la columna previamente equilibrada con tampón A (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF y 10% glicerol (p/v)) y se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón A. Se eluyó la proteína con tampón B (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 600 mM NaCl, 1 mM PMSF y 10% glicerol (p/v)). Las fracciones enriquecidas en TrwC se juntaron, se diluyeron en un tampón (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF y 10% glicerol (p/v)) y se cargaron en una columna HiTrap SP (5 ml) (Amersham, GE). La proteína se eluyó mediante un gradiente lineal de 200 mM NaCl a 600 mM NaCl. Como último paso en la purificación, se empleó una columna Mono S HR 5/5 (1 ml) (Amersham, GE). La proteína se diluyó a 200 mM NaCl, se cargó en dicha columna y se eluyó en el mismo gradiente lineal de NaCl. Las fracciones que contenían TrwC fueron eluídas a 400 mM NaCl y se guardaron a -80°C.

Purificación y detección de complejos formados por las ATPasas del T4SS

Para la producción de complejos entre las distintas ATPasas del T4SS se usaron vectores de expresión con orígenes de replicación compatibles que asegurasen una correcta segregación. En todos los casos, una de las proteínas fue clonada en un vector de expresión pET28a, que introduce una cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína, y la otra proteína con la que testar la interacción en un vector compatible pCDF-1b. En todos los casos las células se lisaron tal y como se describe en la purificación de TrwD. El lisado se diluyó con tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 100 mM NaCl, 70 mM Imidazol y 10 % glicerol (p/v) en relación 1:4 y se cargó en una columna HisTrap HP (1 ml) (Amersham, GE). Una vez lavada la columna, se eluyó con un gradiente lineal de 70 mM a 500 mM Imidazol en 2 volúmenes de columna, recogiendo fracciones de 500 µl. Por último, se cargaron

las muestras en un gel SDS-PAGE y se realizó un Western-Blot con el anticuerpo correspondiente para detectar la presencia de la proteína en cuestión.

3.6.3. Análisis proteico

3.6.3.1. Cuantificación de proteínas (Método de Bradford)

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método de Bradford (Bradford, 1976). Esta técnica se basa en el uso del agente Azul Brillante Coomassie G-250 en ácido fosfórico y metanol (Protein Assay, BioRad). La curva de calibrado fue obtenida utilizando seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich). A las muestras (50 μ l) se añadieron 950 μ l de una dilución 1:5 del reactivo Bradford con agua destilada durante 10 min. Se midió la D0 a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 para obtener los datos y extrapolarlos según la curva patrón.

3.6.3.2. Purificación de anticuerpos

Para la producción de anticuerpos anti-TrwD se inoculó una alíquota de TrwD eluída de un gel SDS-PAGE en conejos de la raza New Zealand White, tal y como se describe en Peña et al. (2011) para el caso de TrwK. El suero obtenido tras la inmunización mediante 3 inyecciones del antígeno correspondiente fue testado por Western blot para comprobar su especificidad. Para aumentar la especificidad y eliminar bandas contaminantes se procedió a purificar los anticuerpos mediante una técnica decrita en (Sambrook, 1989). Para ello, se cargó un gel SDS-PAGE con la máxima cantidad de proteína purificada posible y se transfirieron las bandas a una membrana de nitrocelulosa (Whatman) mediante la técnica Western blot en una solución usando un tampón de transferencia Tris 20 mM, glicina 15 mM y metanol al 20%, pH 9,2 y cubetas de BioRad a un amperaje de 360 mA durante 60 minutos. Las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para observar las bandas con la proteína de interés y así cortarlas e introducirlas en un tubo estéril. Se añadió PBS-T (tampón fosfato salino y Tween-20) en 10 % (p/v) de leche en polvo y se incubó 2 horas a temperatura ambiente (o 4°C o/n). Las membranas fueron lavadas en PBS-T sin leche en polvo (5 min x 4 veces). Tras el lavado, se añadió un volumen de suero de conejo por cuatro volúmenes de PBS-T y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (o 4°C o/n). Las membranas fueron lavadas durante 5 minutos con PBS-T hasta un total de 4 veces. Posteriormente las membranas se incubaron durante 10 minutos con 400 µl de 100 mM glicina pH 2.5. Pasado ese tiempo, el eluido de glicina fue mezclado con 50 µl de 1M Tris pH 8.0. Los pasos de elución con glicina fueron repetidos un total de 4 veces. Finalmente las fracciones obtenidas fueron comprobadas mediante Western blot. Este protocolo de purificación se aplicó también al anticuerpo anti-TrwJ.

Anticuerpo	Concentración	Referencia	
Anti TrwK	1:5000	(Pena <i>et al.,</i> 2011)	
Anti GST-TrwD	1:10000	(Rivas <i>et al.,</i> 1997)	
Anti TrwB	1:5000	(de Paz <i>et al.,</i> 2010)	
Anti TrwJ	1:10000	(Sastre, 1996)	
Anti TrbB	1:500	(Grahn <i>et al.,</i> 2000)	
lgG goat anti-rabbit DylightTM 800	1:5000	Thermo Scientific	

Tabla 3.4. Lista de anticuerpos utilizados en esta tesis	Tabla 3.4.	Lista de anticuerpo	os utilizados en	esta tesis.
--	------------	---------------------	------------------	-------------

3.6.3.3. Detección por Western Blot de proteína en el extracto total y en la fracción extracelular

Para detectar de forma específica una proteína del extracto total, se centrifugaron 10 ml de un cultivo crecido o/n a 5.000 g durante 5 min a 4°C. El precipitado se resupendió en 500 μ l de tampón (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10% sacarosa, 2 mM EDTA, 5 mM benzamidina, 1 mg/ml lisozima, 1 mM PMSF) y tras 15 min de incubación en hielo se añadieron otros 500 μ l de tampón (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 M NaCl, 1 mM EDTA y 0,6 % (p/v) Triton X-100). Finalmente se sonicaron las muestras y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 15 % de acrilamida para detectar posteriormente la señal por *Western blot* con su anticuerpo específico.

Para detectar de forma específica una proteína presente en la fracción extracelular, se sembraron 15 placas Petri de 150 mm de diámetro para cada condición. Se recogieron los céspedes crecidos o/n y se resuspendieron manualmente en 10 ml de un tampón 50 mM Tris-HCl pH 6,8 y 0,02 % NaNO₃ haciendo uso de un homogenizador y aplicando un *vortex*. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 minutos en un rotor JA-25.50. Se precipitó el sobrenadante resultante de la centrifugación con una solución saturada de sulfato amónico al 60 % o/n en frío y agitación suave. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 24.000 rpm en un rotor JA-25.50 durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió en 100 µl de tampón de carga 1X, se hirvió y se cargó en un gel SDS-PAGE al 15 % de acrilamida para detectar posteriormente la señal por *Western blot* con su anticuerpo específico. Se añadió IPTG (1 mM concentración final) a las placas en el caso de la construcción pSU4059 ya que posee la región PIL_w bajo el promotor lac.

3.6.4. Análisis de actividad

3.6.4.1. Ensayos de actividad ATPasa

<u>Ensavo acoplado:</u> la actividad ATPasa fue medida según ensavo descrito en (Kreuzer and Jongeneel, 1983) (Figura 3.1). TrwD (1 μ M) fue incubada durante 5 minutos a 37°C en 150 μ l de tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM acetato potásico y 10 % glicerol (p/v), 0,5 mM fosfoenolpiruvato, 0,25 mM NADH, 5 mM acetato magnésico y 5 mM ATP. Las reacciones se iniciaron añadiendo este último. La actividad se midió por el descenso de la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos a 37°C en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).



Figura 3.1. Esquema representativo del ensayo acoplado. El ensayo se basa en una reacción en el que la hidrólisis del ATP está acoplada a la oxidación del NADH. En este ensayo, el ATP hidrolizado es regenerado constantemente. Por cada ciclo de hidrólisis de ATP, el sistema de regeneración consistente en fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato quinasa, convierte una molécula de PEP en piruvato. Esta reacción está acoplada a la conversión de una molécula de ADP en ATP. El piruvato se convierte posteriormente en lactato en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa. Esta reacción está acoplada a la oxidación de una molécula de NADH que se convierte en NAD⁺. El ensayo mide la disminución de absorbancia a 340 nm por la desaparición del NADH, siendo ésta proporcional a la velocidad de hidrólisis de ATP en el estado estacionario. La regeneración constante de ATP permite medir la tasa de hidrólisis de ATP durante el ensayo sin que éste sea un limitante de la reacción.

<u>Ensayo EnzCheckTM</u>: debido a la dependencia de magnesio del enzima piruvato quinasa, este ensayo sustituyó al acoplado cuando las concentraciones de magnesio no eran saturantes. La actividad ATPasa fue medida usando el kit comercial EnzCheck^{TM "}phosphate assay kit" (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM acetato potásico, 10% glicerol (p/v), 0,15 U PNP (purina nucleósido fosforilasa), 0,2 mM MESG (2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribósido). Las concentraciones de ATP y magnesio fueron añadidas según los requerimientos de cada experimento específico y las reacciones se iniciaron añadiendo TrwD (1 μ M). La actividad se caracterizó midiendo la absorbancia a 360 nm durante 5 minutos a 30°C en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu). Previamente, se realizó una curva estándar utilizando KH₂PO₄ como fuente de P_i. Este ensayo se esquematiza en la figura 3.2.



El ensayo EnzCheck fue usado, además de cuando las condiciones de magnesio eran limitantes, en ensayos donde se testaba la actividad ATPasa de TrwD en presencia de distintos péptidos sintéticos (Peptide-2.0 Chantilly, VA). Los péptidos correspondientes a los últimos residuos de TrwK y TrwC fueron disueltos en 50 mM PIPES-NaOH pH 7.0 mientras que los correspondientes a los últimos residuos de los homólogos de la pilina, más hidrofóbicos, fueron disueltos en 100 % de DMSO. Todos fueron disueltos a una concentración final de 10 mM y almacenados a -20 °C.

Ensayo colorimétrico: Un tercer ensayo de actividad (Taussky and Shorr, 1953) fue usado para medir la actividad de las ATPasas del sistema en presencia de distintos ácidos grasos. La actividad se cuantificó a partir de la cantidad de P_i liberado, tomando como referencia, al igual que el ensayo anterior, una curva de calibrado utilizando KH₂PO₄. En este ensayo el fosforo inorgánico reacciona con el molibdato de amonio en solución ácida para formar ácido fosfomolíbdico. El molibdeno se reduce tras la adición de sulfato férrico provocando la aparición de coloración azul que se registra midiendo la absorbancia a 740 nm.

TrwD (10 μ M) fue pre-incubada con los diferentes ácidos grasos (0,5 mM) durante 10 minutos a 37°C en 100 μ l de tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM acetato potásico, 5mM acetato magnésico, 1mM DTT, 10 % glicerol (p/v). La reacción se inició al añadir 5 mM ATP y se mantuvo a 37°C durante 60 min. Pasado ese tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 400 μ l de 10 % SDS (p/v), seguido de una solución de sulfato ferroso-molibdato de amonio (500 μ l) para posteriormente estimar la cantidad de fosfato inorgánico midiendo la absorbancia a 740 nm. Se comprobó que la concentración final del disolvente de los ácidos grasos (DMSO) en el ensayo (2 %) apenas afectaba a la actividad ATPasa de TrwD. En todo caso, la actividad de la proteína a esa concentración de DMSO, sin ácidos grasos, se tomó como referencia. Para el resto de ATPasas se usó 1,5 % etanol como concentración final de disolvente en el ensayo.

El tampón empleado para medir la actividad de TrwK (10 μ M) fue 50 mM Pipes pH 6,45, 75 mM acetato potásico, 10 mM acetato magnésico, 1 mM DTT, 0,05 mM EDTA y 5 % glicerol (p/v).

TrwB Δ N70 (3 μ M) se midió con el tampón 50mM Pipes pH 6,2, 35 mM NaCl, 5 mM acetato magnésico 5 % glicerol (p/v). La concentración empleada de TrwC fue de 4,75 μ M y el tampón empleado fue el mismo que para TrwD.

3.6.4.2. Cálculo de parámetros cinéticos

<u>Análisis de las isotermas de respuesta</u>: las cinéticas de actividad (Resultados, Figura 4.9 panel A y panel B) se ajustaron de acuerdo a la ecuación de Hill, definida como:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^{nH}}{K_{0.5}^{nH} + [S]^{nH}}$$
Ecuación 1

Donde V es la velocidad observada, V_{max} es la velocidad máxima de la reacción, $K_{0.5}$ es la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la V_{max} , [S] es la concentración de sustrato y *nH* es el número de Hill.

<u>Cinéticas de inhibición por magnesio</u>: las cinéticas de inhibición por el magnesio para el cálculo de las $K_{i(app)}$ ^[Mg2+] (Resultados, Figura 4.10) se ajustaron usando una función hiperbólica de inhibición, definida como:

$$v = V_0 - \frac{V_{max}^* \cdot [Mg^{2+}]}{K_{iapp} + [Mg^{2+}]}$$
Ecuación 2

donde V es la velocidad observada, V_0 es la velocidad en ausencia de magnesio, V_{max} es el mínimo valor de velocidad en presencia de magnesio, $K_{i(app)}$ es la constante de inhibición aparente y $[Mg^{2^+}]$ es la concentración de magnesio.

<u>Cinéticas de inhibición por ADP</u>: las cinéticas de inhibición por el ADP para el cálculo de las $K_{i(app)}$ ^[ADP] y las K_d ^[ADP] (Resultados, Figura 4.11) se ajustaron usando una versión de la función de inhibición competitiva:

$$v = \frac{X}{K_{iapp} + [ADP]}$$
 Ecuación 3

 $K_{iapp} = K_i \cdot 1 + \frac{[S]}{K_{0.5}} \qquad X = V_{max}^* \cdot K_i \cdot \frac{[S]}{K_{0.5}}$

donde

La afinidad real por el ADP, $K_d^{[ADP]}$, fue calculada ajustando los datos a la siguiente ecuación:

$$v = \frac{[ATP] \cdot K_c}{K_{0.5}^{[ATP]} \cdot \left[1 + \frac{[ADP]}{K_d^{[ADP]}}\right] + [ATP]}$$
 Ecuación 4

donde V es la velocidad observada, K_c es la constante catalítica (*turnover*), [ATP] es la concentración de ATP, $K_{0.5}^{[ATP]}$ es la concentración de ATP a la que se alcanza el 50 % de la velocidad para cada concentración de magnesio, [ADP] es la concentración del inhibidor ADP y $K_d^{[ADP]}$ es la constante de disociación para el ADP.

Inhibición por ácido linoleico: las cinéticas de inhibición por ácido linoleico (Resultados, Figura 4.22 panel B) se ajustaron usando una ecuación de Hill para cualquier inhibidor, definida como:

$$v = \frac{V_{max}^{*}}{1 + \left[\frac{[I]}{K_{iapp}}\right]^{nH}}$$
 Ecuación 5

donde V es la velocidad observada, V_{max}^{*} es la máxima amplitud de inhibición, [I] es la concentración de ácido linoleico y $K_{i(app)}$ es la constante de inhibición aparente para el inhibidor.

3.6.4.3. Ensayos de movilidad electroforética (EMSA) con TrwC y TrwC (1-293)

Para comprobar un posible efecto de TrwD sobre el plegamiento/desplegamiento de la proteína TrwC, se procedió a estudiar la capacidad de unión de TrwC al ADN tras ser pre-incubada con TrwD, mediante ensayos de movilidad en geles de poliacrilamida (*EMSA*). TrwC entera, o su dominio relaxasa (TrwC 1-293), fueron incubadas a concentraciones crecientes (de 50 a 500 nM) con un oligonucleótido 25+0 (10 nM) (5'-G<u>CGCACCGAAAGGTGCG</u>TATTGTCT-3') marcado con fluoresceína en su extremo 5', en tampón 75 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 2,5 % glicerol (p/v) y 0,5 mM DTT. Se añadió tampón de carga (20 % glicerol (p/v) y 100 mM Tris pH 6,8) a las muestras en relación 1:1 y se cargaron en un gel nativo de acrilamida al 5 % (p/v) en TBE. Se aplicó al mismo una corriente de 100 V durante 45 minutos para posteriormente ser revelado usando un escáner Fujifilm Fla-5100 a una $\lambda_{emisión}$ 473 nm. Se ensayaron diferentes relaciones molares de TrwD con TrwC y/o TrwC (1-293), pre-incubando para ello durante 15 minutos ambas proteínas en presencia de 1 mM ATP y 2 mM o 10 µM de acetato magnésico.

3.6.4.4. Ensayo de la actividad de corte específico llevada a cabo por TrwC y TrwC (1-293)

Para los ensayos de corte (Figura 3.3) se utilizó una concentración de 2,5 μ M de un oligonucleótido 43nt (25+18) (5'-G<u>CGCACC</u>GAAA<u>GGTGCG</u>TATTGTCT/ATAGCCCAGATTTAAGGA-3') marcado con fluoresceína en su extremo 5' en un volumen final de reacción de 20 μ l. La concentración de proteína utilizada en los ensayos (TrwC o TrwC1-293) fue variable, entre 1 y 12 μ M. La proteína y el ADN se incubaron a 37 °C durante 1 hora en presencia de 5 mM de MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6. Posteriormente, se añadió 1 mg/ml proteinasa K (Roche) y 0.075 % (p/v) SDS y la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. Se añadieron 10 μ l de azul ADN: formamida (1:1) y se incubó durante 2 minutos a 95 °C para deshacer estructuras secundarias en el ADN. Las muestras se cargaron en geles al 20 % acrilamida 19:1 (p/v) con 8M urea en tampón TBE 1X y se corrieron durante 1 hora a 200 V. Previamente a la carga de la muestra, se aplicó a los geles un campo electroforético durante una hora para eliminar restos de acrilamida en los pocillos.

Para comprobar si TrwD era capaz de desplegar TrwC y/o TrwC (1-293) y por tanto impedir la reacción de corte del oligo, ambas proteínas se incubaron previamente durante 15 minutos a 37°C en presencia de 2 mM ATP y 50 μ M acetato magnésico. Como control se utilizó SDS como agente desnaturalizante, para comprobar que con TrwC y/o TrwC (1-293) desplegadas la reacción de corte no ocurre.



Figura 3.3. Ensayo de actividad de corte de TrwC. TrwC o su dominio relaxasa, TrwC 1-293, incubadas con un oligonucleótido marcado fluorescentemente en su extremo 5' (representado por una estrella), cortan el oligonucleótido a la altura que se representa por una barra azul, quedando la proteína covalentemente unida al extremo 5' de éste. Como resultado de dicha reacción, el oligonucleótido marcado presenta una longitud menor. La reacción se trata con SDS y proteinasa K para desnaturalizar y degradar la proteína.

3.6.5. Proteólisis limitada de TrwD

Para comprobar posibles cambios conformacionales en TrwD por efecto de la unión de magnesio y/o nucleótido se usó papaína (Sigma-Aldrich), una proteasa inespecífica útil para delimitar dominios estructurales en las proteínas, ya que presenta baja actividad en estructuras terciarias y secundarias estables (Karzai and McMacken, 1996).

La digestión se llevó a cabo a 25 °C en 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM acetato potásico y 10 % glicerol (p/v). La papaína se disolvió en el mismo tampón y se activó, previo uso, añadiendo 50 mM β -mercaptoetanol a 37 °C durante 30 min. TrwD (25 μ M) fue incubada durante 15 minutos a 25°C con la correspondiente concentración de nucleótido y magnesio. La reacción se inició añadiendo la papaína activada en una relación papaína:TrwD 1:100 molar. Después de 90 minutos la reacción se paró al añadir 100 μ M del inhibidor E-64 (Sigma-Aldrich). Los productos de la proteolisis fueron analizados mediante electroforesis en geles SDS-PAGE (15 % acrilamida (p/v)) y teñidos con azul de Coomassie.

3.6.6. Secuenciación N-terminal

Los fragmentos resultantes de la digestión por papaína se transfirieron a una membrana de PVDF inmobilon-P (Millipore) y se procedió a secuenciar sus extremos amino terminales mediante degradación secuencial de Edman durante 5 ciclos empleando un secuenciador automatizado Procise 494 (Applied Biosystems). Se requirió una cantidad de muestra pura de entre 50-100 pmol evitando la contaminación con tampones con aminas primarias y/o proteasas. Se cortó la membrana, se lavó con abundante agua élix y se envió al Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

3.7. Técnicas Biofísicas

3.7.1. Fluorímetría

La unión de nucleótidos a TrwD fue caracterizada usando un análogo de ATP fluorescente 2'(3')-0-(2,4,6-trinitrofenil)adenosina 5'- trifosfato) (TNP-ATP) (Molecular Probes, Inc.) (Hiratsuka and Uchida, 1973). El espectro de emisión fue registrado a 21°C usando un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-66 excitando a 407 nm y registrando el espectro de emisión entre 465 y 625 nm, usando unos filtros de excitación y emisión con una anchura de rendija de 5 y 8 nm, respectivamente. Se añadió 10 μ M TNP-ATP y 5 μ M TrwD en 20 mM Hepes pH 7,6, 0,2 M NaCl, 5% de glicerol (p/v), además de distintas concentraciones de magnesio según el experimento (10 μ M ó 2 mM acetato magnésico).

3.7.2. Dicroísmo circular

Para detectar posibles cambios conformacionales inducidos por el magnesio o los nucleótidos, se testó la estabilidad térmica de TrwD mediante análisis de dicroísmo circular. La elipticidad fue medida a 222 nm en un espectropolarímetro J-810 Jasco. La elipiticidad de TrwD fue registrada en una cubeta de 0,1 cm de paso de banda, siendo la muestra calentada desde 20°C hasta 80°C, incrementándose la temperatura a un ratio de 60°C/h. TrwD se diluyó hasta 5-10 μ M en 50mM Hepes pH 7,6, 200 mM NaCl, 5 % glicerol (p/v) o en 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM acetato potásico, 5 % glicerol (p/v). Se añadió 2 mM acetato magnésico o 2mM Mg.ADP según el experimento. A la señal registrada a 222 nm se le restó la señal del tampón correspondiente y la elipticidad θ (mdegs) se transformó a elipticidad molar [θ] (deg cm² dmol⁻¹).

Para la conversión de los valores a elipticidad molar [θ] (deg cm² dmol⁻¹) se usó la siguiente fórmula:

$$[\theta] = \frac{\theta \text{ (mdegrees)}}{10 \cdot \text{ C} \cdot \text{ n} \cdot \text{ I}}$$

donde C es la concentración de proteína, n es el índice de refracción del medio, l es el paso de longitud de onda de la cubeta y θ es la elipticidad medida en mdegs.

3.7.3. Ultracentrifugación analítica

Se analizó el estado de agregación de TrwD por ultracentrifugación analítica. Los análisis de la proteína fueron realizados a la concentración indicada en cada caso (10 o 30 μ M) en tampón (20 mM Hepes pH 7,6, 0,2 M NaCl, 5 % glicerol (p/v), 500 μ M ATP) incubando con 10 μ M o 2 mM de acetato magnésico. Las muestras fueron analizadas en el Servicio de Ultracentrifugación Analítica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Las muestras se corrieron a una velocidad de sedimentación de 43.000 rpm a 20°C en una ultracentrífuga analítica XL-I (Beckman-Coulter, Inc.) con un sistema de detección óptica de interferencia y de luz UV-visible, usando un rotor An50 con una óptica de 12-mm de paso de banda. Los perfiles de sedimentación fueron registrados cada cinco minutos a una longitud de onda de 280 nm. Las distribuciones del coeficiente de sedimentación fueron calculadas mediante el modelado de mínimos cuadrados de la velocidad de sedimentación usando el método de coeficiente de sedimentación (Schuck, 2000) que aplica el programa SEDFIT 11.8. El software utilizado para los experimentos de equilibrio de sedimentación fue HETEROANALYSIS 1.1.33.

3.8. Microscopía electrónica

Alícuotas de proteína purificada (0,1-0,5 mg/ml) fueron aplicadas sobre rejillas de cobre cubiertas de carbono previamente activado mediante radiación de plasma usando un aparato Glowdischarge (Emitech K100X). Las muestras fueron teñidas con 2 % acetato de uranilo (p/v). Una vez preparadas las muestras en nuestro laboratorio, se hizo uso de las infrastructuras del laboratorio de los Drs. José María Valpuesta y José López Carrascosa en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid. Las micrografías se tomaron a una magnificación de 60.000X en películas Kodak SO-163 usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200EX-II, operando a 100 kV. Posteriormente, se digitalizaron en un escáner Zeiss SCAI a 14 Å de resolución, resultando en un ratio final de muestreo de 4,66 Å/pixel. Las partículas seleccionadas fueron extraídas y normalizadas usando el programa de procesamiento de imágenes XMIPP (Marabini et al., 1996; Scheres et al., 2008). El alineamiento y clasificación de partículas se realizó mediante métodos de máxima verosimilitud (Scheres et al., 2005). Para calcular el espectro rotacional de imágenes individuales se utilizó una aproximación que disminuye las inestabilidades asociadas con el bajo ratio señal-ruido (Crowther and Amos, 1971). Para analizar la variabilidad de las imágenes y hacer medias de éstas, se usó un algoritmo basado en una red neuronal de auto-organización (SOM, del inglés self-organising map) (Kohonen, 1990; Marabini and Carazo, 1994).

3.9. Técnicas Bioinformáticas

3.9.1. Alineamiento de secuencias y predicción de estructura secundaria

Las secuencias correspondientes a los distintos homólogos representativos de la familia de proteínas VirB11 se alinearon usando el programa T-coffee (Notredame *et al.*, 2000) y se representaron usando el programa Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). Para la predicción de estructuras secundarias se utilizó el programa Psi-Pred (Buchan *et al.*, 2010).

3.9.2. Modelado molecular y predicción de estructura tridimensional

Se generaron los modelos atómicos de TrwD (R388), TraG (pKM101) y TrbB (RP4) mediante *molecular threading* usando el servidor de predicción de estructura terciaria Phyre 2 (Kelley et al, 2009). Las coordenadas atómicas de *B. suis* VirB11 (PDB ID: 2gza) (Hare et al,2006) se usaron como molde para TrwD y TraG, y las coordenadas de HP0525 de *H. pylori* (PDB ID: 1nlz) (Yeo et al, 2000) para TrbB. Los modelos hexaméricos, tanto de TrwD como de TraG, fueron generados mediante UCSF Chimera (Pettersen et al, 2004) basándonos en la estructura hexamérica de VirB11 de *B. suis*. El modelo hexamérico de TrbB, por el contrario, fue basado en la estructura de HP0525.



4.1. Purificación y caracterización bioquímica de TrwD

4.1.1. Purificación de TrwD

Previamente a la realización de esta tesis, estudios realizados en el laboratorio del Dr. de la Cruz habían demostrado que TrwD tenía capacidad para hidrolizar ATP (Rivas *et al.*, 1997). Sin embargo, en estos estudios la proteína, expresada como una quimera resultante de la fusión de TrwD con GST (del inglés *glutathione S- transferase*), presentaba unos niveles de actividad muy bajos (4,5 nmol ATP /min mg). Como el dominio GST puede interferir tanto en los ensayos de actividad y/o de interacción como en el estado oligomérico (Ji *et al.*, 1995; Maru *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1990), los autores procedieron a digerir dicho fragmento. Pero en el proceso de digestión del fragmento GST (Nagai and Thogersen, 1984) no se alcanzaba una eficiencia de corte del 100 % y la proteína resultante de dicho corte difería de la salvaje en cinco aminoácidos extras en su extremo N-terminal (GLPGN). Es por todo ello que se decidió desarrollar un nuevo protocolo de purificación de la proteína en su forma salvaje (ver apartado 3.6.2. de la sección Materiales y Métodos) con el que se obtiene gran cantidad de proteína pura y homogénea (figura 4.1).



Figura 4.1. Purificación de TrwD. El lisado celular, correspondiente a 2 litros de cultivo de C41 (*DE3*) sobre-expresando TrwD (*a*), se precipitó en sulfato amónico. El precipitado se resuspendió, dializó y se pasó por una columna Hi-Trap Q Sepharose (*b*). Para eliminar impurezas, la muestra fue pasada por una columna Resource-Q-Sepharose (*c*) y, finalmente, por una columna de tamizado molecular superdex S200 (d). (Ver apartado 3.6.2 de Materiales y Métodos para más detalles).

4.1.2 Caracterización del estado oligomérico de TrwD mediante cromatografía de tamizado molecular y ultracentrifugación analítica

Mediante la técnica de cromatografía de tamizado molecular o filtración en gel es posible estimar el estado oligomérico de una proteína. Esta estimación viene dada por el volumen al que la muestra eluye de una columna previamente calibrada con varias proteínas patrón. El volumen de elución depende tanto del tamaño de la muestra estimado en Da como de la forma, más o menos globular o compacta, de la muestra, por lo que los valores obtenidos son aproximados. Durante las distintas purificaciones de TrwD, llevadas a cabo a lo largo de esta tesis, se pudo observar como la concentración a la que se inyecta la muestra en la columna determina el volumen en el que eluye TrwD y, por tanto, su estado oligomérico. En la figura 4.2 se muestra el perfil de elución de TrwD a dos concentraciones distintas (0,8 mM, en azul y 1,5 mM, en rojo) en una columna HiLoad Superdex200 16/60 (120 ml). Tal y como se observa en el cromatograma, a estas concentraciones TrwD, muestra volúmenes de elución de 67 y 51 ml, respectivamente.





Para determinar el estado oligomérico de la proteína purificada, se cargó una muestra de TrwD (46 μ M) en una columna de gel filtración Superdex200 GL 3.2/30 previamente calibrada con varias proteínas patrón de peso molecular conocido. La mayor parte de la proteína eluyó en un volumen de elución de 1,36 ml, correspondiente a un peso molecular aproximado (MW_{app}) de 158 KDa, resultado que es compatible con un trímero de TrwD. El peso molecular correspondiente a un monómero de TrwD es de 40 KDa. En el cromatograma se observa un hombro que refleja la existencia de especies oligoméricas menores correspondientes a dímero y monómero de TrwD (figura 4.3). Se trató de favorecer la oligomerización de la proteína mediante la incubación de la



proteína con ATP-Mg²⁺, pero los cromatogramas obtenidos fueron similares al representado en la misma figura.

Figura 4.3. Cromatografía de tamizado molecular para determinar el estado oligomérico de TrwD. Cromatogramas correspondientes tras inyectar cuatro patrones de peso molecular conocido (negro) y una muestra de TrwD (46 μM) (rojo) en tampón Hepes pH 7,6, 200 mM NaCl y 5 % glicerol en una columna (Superdex200 GL 3.2/30). Los volúmenes de elución obtenidos para los marcadores empleados se reflejan en la tabla derecha de la figura.

Para determinar el estado oligomérico de una forma más precisa, se envió una muestra de TrwD (10 μ M) al servicio de ultracentrifugación analítica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

Los experimentos de velocidad de sedimentación mostraron la presencia de varias especies con los siguientes coeficientes de sedimentación (*S*): 2,5S (51,5%), 4,1S (31,3%), 5,2S (11,2%) y 6,8S (3,9%). El análisis hidrodinámico indicó un pico mayoritario a 2,5S (51,5%), compatible con un monómero de proteína (figura 4.4).



Figura 4.4.Experimento de velocidad de sedimentación de TrwD. Distribución de los coeficientes de sedimentación de TrwD (10 µM) en tampón Tris-HCl pH 7.6 0,2M NaCl. Los picos obtenidos son compatibles con monómero (a), dímero (b), trímero (c) y tetrámero (d).

Los experimentos de equilibrio de sedimentación también reflejaron la presencia de varias especies. La masa promedio fue de 60-70 KDa, dependiendo de la velocidad de sedimentación, compatible con monómero mayoritario. La diferencia observada entre la masa promedio aparente obtenida y la real (40 KDa) se debe a que a dicha masa contribuyen especies de distinto estado oligomérico que se encuentren en equilibrio. Además, en este tipo de experimentos hay que tener en cuenta otros factores como el coeficiente de fricción de la muestra, el volumen parcial específico, etc. En cualquier caso, teniendo en cuenta los resultados de los experimentos de velocidad, el resultado de los experimentos de sedimentación sería compatible con la presencia mayoritaria de TrwD como monómero a esa concentración de proteína.

4.1.3. Análisis de la actividad de TrwD.

Con la proteína purificada se procedió a caracterizar su actividad ATPasa mediante el ensayo acoplado (ver apartado 3.6.4.1 de Materiales y Métodos). Se usaron sales de acetato, puesto que se observó que éstas eran más adecuadas para registrar actividad en TrwK, otra de las ATPasas hexaméricas del sistema (Arechaga *et al.*, 2008). Se realizó un barrido de diferentes valores de pH para determinar el máximo de actividad, siendo pH 8,5 el valor óptimo (figura 4.5). Valores de pH óptimos similares fueron obtenidos en la caracterización de la actividad de GST-TrwD (Rivas *et al.*, 1997) o de TrbB de RP4 y HP0525 de *H. pylori* (Krause *et al.*, 2000), calculados mediante ensayos radioactivos en cromatografía de capa fina.



Figura 4.5. Efecto del pH en la actividad ATPasa de TrwD. La actividad ATPasa de TrwD (1 μ M) fue medida con un ensayo acoplado, a distintos valores de pH, en tampón 75 mM AcK, 1 mM DTT, 10 mM ATP y 5 mM acetato magnésico.

Seguidamente se tituló la actividad ATPasa de TrwD a pH 8,5 para distintas concentraciones de ATP. La isoterma de respuesta obtenida se ajustó a una ecuación de Hill obteniendo una V_{max} de 78,6 nmol ATP/ min mg y una $K_{0.5(app)}^{[ATP]}$ de 12 µM (figura 4.6). El mutante de TrwD en el motivo de unión a nucleótido Walker A TrwDK203A, en el que se sustituyó una lisina esencial para la unión del nucleótido por una alanina, no presentó actividad ATPasa. En un trabajo previo (Rivas *et al.*, 1997), mediante el mismo ensayo acoplado, se caracterizó la actividad de TrwD, posterior al corte con el factor X_a, obteniendo un valor de V_{max} de 4,5 nmol ATP/ min mg y una K_m de 500 µM. El mutante en el motivo Walker A TrwDK203Q tampoco presentó actividad ATPasa. Así pues, con este protocolo de purificación se registró un valor de V_{max} unas veinte veces superior al descrito anteriormente.



Figura 4.6. Isoterma de respuesta de TrwD. La actividad ATPasa de TrwD (1 μ M) fue medida con el ensayo acoplado, a distintas concentraciones de ATP en un tampón 50mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM AcK, 1 mM DTT, y 5 mM acetato magnésico. Se ajustó a una ecuación de Hill (apartado 3.6.4.2 de Materiales y Métodos; ecuación 1).

Para estudiar el efecto de los diferentes nucleótidos tri-fosfato sobre la actividad NTPasa de TrwD, se tuvo que sustituir el ensayo acoplado por un ensayo colorimétrico (ver apartado 3.6.4.1 de Materiales y Métodos) (figura 4.7). Para realizar los cálculos de actividad, se realizó una recta de calibrado que relaciona la cantidad de fosfato inorgánico (P_i) en el medio con la absorbancia registrada a 740nm. En la figura 4.7, se puede observar como TrwD presenta mayor activad NTPasa con ATP y CTP, siendo ésta de aproximadamente 85 nmol NTP/min mg. Los valores de actividad obtenidos con TTP o GTP fueron aproximadamente un 15 % del valor máximo observado.



Figura 4.7. Actividad de hidrólisis de TrwD para distintos nucleótidos. Se ensayó TrwD (10 μM) con 5mM del nucleótido correspondiente (ATP, TTP, CTP y GTP) en un tampón 50mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM AcK, 1 mM DTT, y 5 mM acetato magnésico.

4.2. Modelado molecular de TrwD y otros homólogos de VirB11

TrwD de R388 presenta una gran homología con el resto de proteínas que forman parte de la familia VirB11. Hasta la fecha se han resuelto las estructuras cristalográficas de dos homologos de TrwD, de sistemas patogénicos, como son HP0525 de *H. pylori* y VirB11 de *B. suis* (Hare *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2000). Estas estructuras mostraron una organización estructural común que consiste en dos dominios, un dominio N-terminal (NTD) de interacción con la membrana y un dominio C-terminal (CTD) catalítico, conectados por una región flexible flexible (*linker*) de longitud variable. Al comparar ambas estructuras entre sí, se observó que el NTD del monómero de VirB11 de *B. suis* se había desplazado respecto al CTD pivotando en torno al *linker*. A pesar de este gran cambio conformacional, la estructura hexamérica final permanecía estable (Hare *et al.*, 2006). La comparación de secuencias entre los distintos homólogos de VirB11 revela una gran variabilidad en la región del *linker*, siendo el de TrwD_R388 el más largo (Hare *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta las diferencias existentes en la región linker, así como el papel de este dominio sobre la organización conformacional de los dominios NTD y CTD, se decidió modelar la estructura de TrwD así como la de otros homólogos seleccionados en función de la longitud del *linker*, usando para ello el servidor Phyre 2 (ver apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos). El panel A de la figura 4.8 muestra un alineamiento donde se observan las diferencias en la longitud del *linker* entre los distintos homólogos seleccionados. Se observa cómo TrbB y HP0525 carecen de una secuencia correspondiente a la región *linker*-B, que sí está presente en VirB11 de *B. suis* y en TrwD de R388, así como en TrwD de *B. tribocorum* y TraG del plásmido pKM101, más relacionados filogenéticamente con TrwD. El panel B de la figura 4.8 muestra el modelado de los homólogos. Debido a la similitud en la región del *linker*, la estructura de VirB11 de *B. suis* resultó ser más apropiada en el modelado de TrwD y de TraG de pKM101. En cambio, TrbB de RP4 carece de la región del *linker*-B) por lo que en este caso se usó la estructura de HP025 como molde.





Figura 4.8. Diferencias en el plegamiento en diferentes homólogos de VirB11 en función de la longitud del linker. Panel A. Alineamiento entre distintos homólogos de VirB11. Se muestra en verde las regiones que comprenden parte del linker asi como dos α -hélices presentes sólo en algunos homólogos de VirB11. Panel B. Vista lateral y frontal de los hexámeros de distintos homólogos de VirB11. Los hexameros de TrwD y TraG se construyeron usando como molde la estructura de VirB11 de *B. suis* (2gza.pdb) mientras que el hexámero de TrbB se construyó usando HP0525 de *H. pylori* (1nlz.pdb). Se muestra en rosa, naranja y cian los dominios N-terminal y en morado, rojo y azul los dominios Cterminal de TrwD, TraG y TrbB, respectivamente. En verde se indican las secuencias destacadas en el alineamiento del panel A.

4.3. Efecto del magnesio en la actividad, oligomerización y estabilidad de TrwD

4.3.1. Regulación de la actividad ATPasa de TrwD por magnesio

Estudios en SecA, una ATPasa ubicua en el sistema de translocación Sec, revelaron que su actividad es regulada por magnesio, actuando éste como un inhibidor alostérico de la misma (Gold *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta el posible papel de TrwD como *traffic ATPase* en T4SS, nos planteamos la posibilidad de que TrwD estuviese siendo regulada por el magnesio del mismo modo.

Para poder estudiar el efecto del magnesio sobre la actividad ATPasa de TrwD, hubo que sustituir el ensayo acoplado por otro método, ya que en dicho ensayo existen componentes, como la piruvato quinasa que son sensibles al magnesio. Se eligió usar un método colorimétrico comercial *Enzchek* (Invitrogen), debido a su alta sensibilidad y rango de respuesta. En este ensayo se relaciona la actividad de *P_i* liberado en la reacción de hidrólisis con la actividad enzimática (ver apartado 3.6.4.1 de Materiales y Métodos) mediante una recta de calibrado que relaciona la cantidad de fosfato inorgánico presente en el medio con la absorbancia registrada a 360nm.

Se tituló la actividad ATPasa de TrwD para concentraciones crecientes de ATP en dos concentraciones de magnesio muy distintas: 10 μ M y 2mM Mg²⁺. Las isotermas de respuesta obtenidas para ambas concentraciones de magnesio (figura 4.9) se ajustaron a una ecuación de Hill obteniendo unas constantes cinéticas que se resumen en la tabla de la misma figura.

Los parámetros cinéticos observados en presencia de 2mM Mg²⁺ fueron 76 nmol ATP min⁻¹ mg⁻¹ (V_{max}) y 9,6µM ($K_{0.5(app)}^{[ATP]}$) (Figura 4.9, panel A); parámetros similares a los registrados con el ensayo acoplado. Sorprendentemente, a baja concentración de Mg²⁺ (10 µM), la V_{max} fue 3 veces superior (216 nmol ATP min⁻¹ mg⁻¹) que la observada a 2mM Mg²⁺ (figura 4.9, panel B) con un incremento significativo en el valor de la $K_{0.5(app)}^{[ATP]}$ (45 µM). Como era de esperar, la eliminación del Mg²⁺ del medio tras añadir EDTA resultó en una completa inhibición de la actividad ATPasa de TrwD.

Un análisis más detallado del efecto que el Mg²⁺ tiene en la actividad ATPasa de TrwD reveló que la inhibición por el Mg²⁺ no se ve afectada por la concentración de ATP (figura 4.10). Los valores de $K_{i(app)}^{[Mg^{2+}]}$ fueron 42 y 35 µM para 1mM y 100µM de ATP, respectivamente. Así pues, no parece que varíe significativamente la constante $K_{i(app)}^{[Mg^{2+}]}$ para las dos concentraciones de ATP testadas. Se realizó el mismo ensayo en presencia de otros cationes, tales como Mn²⁺ o Zn²⁺ pero en ningún caso se obtuvo un efecto similar al observado con Mg²⁺ sobre la actividad ATPasa de TrwD.



Figura 4.9. Efecto del magnesio en la actividad ATPasa de TrwD. Se tituló la actividad ATPasa de TrwD (1 μ M) en 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 75mM AcK, 1mM DTT y 10% glicerol a concentraciones crecientes de ATP en presencia de 2 mM Mg²⁺ (A) o 10 μ M Mg²⁺ (B). Las gráficas se ajustaron según la ecuación de Hill (apartado 3.6.4.2 de Materiales y Métodos).



Figura 4.10. Inhibición de la actividad ATPasa de TrwD por efecto del magnesio. La actividad ATPasa de TrwD (1,9 μ M) con 1 mM ATP (*puntos negros*) y 100 μ M ATP (*puntos blancos*) fue medida para concentraciones crecientes de Mg²⁺. Para la determinación de los valores de $K_{i(app)}^{[Mg2+]}$ se ajustó a una función hiperbólica de inhibición (apartado 3.6.4.2 de Materiales y Métodos; ecuación 2).

Por otro lado, se estudió la posible inhibición de la actividad ATPasa de TrwD por producto ([ADP]) en presencia de dos concentraciones diferentes de magnesio, 2mM Mg²⁺ and 10 μ M Mg²⁺. Como era de esperar, en ambas condiciones, el ADP mostró un claro efecto inhibitorio en la actividad ATPasa (figura 4.11). A la misma concentración de ATP (100 μ M), en presencia de magnesio se observó un descenso de 5 veces en el valor de la constante de inhibición aparente $K_{i[app]}^{[ADP]}$ y un aumento de 20 veces la afinidad por el ADP $K_d^{[ADP]}$ (tabla figura 4.11). Estos datos reflejan claramente que la afinidad por el ADP, producto de la reacción de hidrólisis, es mucho mayor en presencia de una mayor concentración de magnesio.



Figura 4.11. Inhibición de la actividad de TrwD por ADP. Para concentraciones crecientes de ADP, se registró la actividad ATPasa de TrwD (1,9 μ M) para 1 mM ATP y 10 μ M Mg²⁺ (*círculos*), 100 μ M ATP y 10 μ M Mg²⁺ (*diamantes*) y 100 μ M ATP y 2 mM Mg²⁺ (*triángulos*). Los valores de $K_{i(app)}$ ^[ADP] y K_d ^[ADP] reflejados en la tabla se calcularon utilizando la ecuación 3 y ecuación 4 del apartado 3.6.4.2. de Materiales y Métodos, respectivamente.

4.3.2. Efecto del magnesio sobre la unión de nucleótidos a TrwD

La unión de nucleótidos a TrwD se analizó usando TNP-ATP. El TNP-ATP es un análogo fluorescente no hidrolizable del ATP (Hiratsuka and Uchida, 1973). Este análogo se utiliza con frecuencia para caracterizar la unión del ATP a proteínas que unen nucleótidos (Jezewska *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 1998; Weber and Senior, 1996). En solución acuosa y, tras ser excitado a 407 nm, posee un espectro de emisión con un máximo a 560 nm y baja intensidad. Cuando se une a una proteína, la intensidad aumenta significativamente y el máximo se desplaza hacia el azul hasta los 540 nm.

Tras comprobar que el TNP-ATP no era hidrolizado por TrwD bajo las condiciones ensayadas, se realizaron curvas de titulación para estimar la unión de TNP-ATP a TrwD (5 μ M) a distintas concentraciones de Mg²⁺. Los valores de $K_d^{TNP-ATP}$ obtenidos fueron 11 μ M en 2 mM Mg²⁺ y 9,7 μ M cuando no se añade Mg²⁺, lo que muestra que la afinidad por el TNP-ATP no se ve significativamente

afectada por el magnesio (figura 4.12, panel B). Este dato sugiere la existencia de un centro de unión para el magnesio libre diferente al sitio de unión a nucleótidos.



Figura 4.12. Efecto del magnesio en la unión del TNP-ATP a TrwD. (A) Espectro de emisión de fluorescencia del TNP-ATP (10 μ M) en ausencia (*espectro a*) y en presencia de 5 μ M de TrwD (*espectro b*). Se añadió secuencialmente 2 mM de Mg²⁺ (*espectro c*) y 10 mM de EDTA (*espectro d*). Las líneas punteadas representan el valor de λ para el máximo de emisión en cada caso. (B) Curvas de titulación para la unión del TNP-ATP a 5 μ M de TrwD en ausencia de Mg²⁺ (*triángulos negros*) y en presencia de 10 μ M (*círculos blancos*) y 2 mM (*círculos negros*). Se normalizó cada curva para el valor máximo de la intensidad de emisión en cada caso (λ_{ex} = 407 nm).

Posteriormente se registraron los espectros de emisión de fluorescencia para el TNP-ATP (10 μ M), añadiendo secuencialmente TrwD (5 μ M), 2 mM Mg²⁺, y EDTA (figura 4.12, panel A). La adición de magnesio no sólo resulta en la reducción de la intensidad de fluorescencia de emisión sino también en un desplazamiento hacia el rojo (de 535 nm a 547 nm) en la longitud de onda a la que se registra la máxima intensidad de fluorescencia. Este efecto observado podría deberse a algún tipo de cambio conformacional en TrwD provocado por la unión del magnesio.

4.3.3. Efecto del magnesio en la estabilidad térmica de TrwD

Para investigar si el magnesio estaba ejerciendo su efecto inhibitorio induciendo un cambio conformacional en TrwD, se hicieron curvas de desnaturalización midiendo la elipticidad molar a 222 nm a temperaturas crecientes. Estos experimentos se realizaron inicialmente usando el tampón de purificación (50 mM Hepes pH 7,6, 200mM NaCl y 5 % glicerol). En estas condiciones, no se observaron diferencias en los perfiles obtenidos en ausencia y presencia de 2 mM Mg²⁺ (figura 4.13). Tanto el ADP como el ADP-Mg²⁺ son capaces de estabilizar la proteína aumentando de 2,5 a 5°C la temperatura de "*melting*" T_m.



Figura 4.13. Desnaturalización térmica de TrwD seguida por dicroísmo circular. Elipticidad molar $[\theta]_{222}$ de TrwD (10µM) a 222 nm en 50 mM Hepes pH 7,6, 200mM NaCl y 5 % glicerol sin añadir magnesio (*morada*), con 2mM Mg²⁺ (*morada punteada*) con 2 mM ADP (*azul*) y con 2 mM Mg.ADP (*verde*) calentando desde 20°C a 80°C a 60°C/hora.

Posteriormente se obtuvieron los perfiles de desnaturalización en el tampón ATPasa. En estas condiciones, los perfiles de desnaturalización térmicos obtenidos en ausencia o presencia de magnesio fueron significativamente diferentes (figura 4.14). En ausencia de Mg²⁺, se observa una transición grande entre 45°C y 75°C reflejando un proceso de desnaturalización poco cooperativo, compatible con un cierto grado de flexibilidad en la proteína. La unión del magnesio resultó en una transición de desnaturalización altamente coperativa centrada en 52°C. En presencia de Mg-ADP, se observó una estabilización en la proteína, siendo la transición cooperativa y centrada en 58°C.



4.14. Desnaturalización térmica de TrwD en tampón ATPasa seguida por dicroísmo circular. Elipticidad molar $[\theta]_{222}$ de TrwD 5 µM en tampón 50 mM Tris-HCl 8,5, 75 mM AcK, 5 % glicerol (p/v), sin magnesio (*gris oscuro*), con 2 mM acetato magnésico (*negra*) o 2 mM Mg.ADP (*gris claro*), calentando desde 20°C a 80°C a 60°C/hora.

4.3.4. Efecto del magnesio en la estructura de TrwD: estudios de proteólisis parcial

Con la idea de corroborar los resultados obtenidos por dicroísmo circular (sección 4.3.3), se decidió investigar si el magnesio y/o nucleótidos como el AMPPNP o el ADP estabilizan la conformación de TrwD. Para ello se llevó un ensayo de susceptibilidad a la digestión por papaína, tal y como se ha llevado a cabo en otras ATPasas (Hatori *et al.*, 2007). La figura 4.15 muestra cómo en presencia de Mg-ADP, TrwD está protegida de la proteólisis por papaína. En su ausencia, la digestión por papaína resultó en dos bandas principales, de un peso molecular aproximado de 25 KDa y 11 KDa.

Estas bandas fueron transferidas a una membrana Inmobilon-P y se procedió a determinar sus secuencias N-terminales (apartado 3.6.6 de Materiales y Métodos). La banda de 25 KDa con una secuencia N-terminal de ¹²SGNRV¹⁶ corresponde a una región N-terminal de TrwD sin los primeros 11 residuos (probablemente debido a la degradación por una proteasa inespecífica) y parte del dominio C-terminal (fragmento P1, colores amarillo y rosa en la figura 4.15). Justo por debajo de esta banda de 25 KDa, se observa otra banda de secuencia N-terminal ¹⁸KDQAV²² (fragmento P2). La banda de 11 KDa tiene una secuencia N-terminal ²⁵⁷MRQS²⁶⁰ correspondiente a los últimos 96 aminoácidos del C-terminal de la proteína (fragmento P3, en color verde). Este sitio de corte de la papaína se localiza en un *loop* que conecta el dominio que contiene el Walker A con el que contiene el Walker B. La unión del Mg-ADP a la proteína induce una reorganización del dominio C-terminal que impide el acceso de la papaína a esta región de la proteína. Esta observación concuerda con la cooperatividad y estabilización de la proteína observada en los experimentos de dicroísmo circular.



Figura 4.15. Proteólisis parcial de TrwD con Papaína. A. Gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de los productos de digestión de TrwD (25 μ M) en ausencia o presencia de nucleótidos y Mg²⁺. La digestión se llevó a cabo durante 90 min a 25 °C con una relación molar papaína: TrwD de 1:100. B. Posicionamiento de los sitios de corte por papaína que dan lugar a los fragmentos P1, P2 y P3, identificados por secuenciación N-terminal. Se puede apreciar un fragmento adicional en la condición con sólo magnesio (marcado con *). Este péptido, de baja señal, empieza 48 residuos por delante del fragmento P3. C. Representación de un monómero de TrwD (modelado como se indica en la apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos). El sitio de corte P3 separa los últimos 96 residuos de la proteína (en color verde), que contienen el motivo Walker B (E270), del resto del dominio C-terminal, que contiene el motivo Walker A (K203).

En ausencia de nucleótidos y en presencia de magnesio, se observa una señal débil de una banda de aproximadamente 14 KDa (marcada con *). La secuenciación N-terminal de esta banda, la cual no está presente en ninguna otra condición, determinó un fragmento que comienza en ²¹⁰LIEK²¹³, unos residuos por detrás del motivo Walker A (Lys 203). La papaína mostró baja actividad en este sitio, pero el experimento claramente refleja que este sitio no es accesible en ausencia de magnesio. Este resultado concuerda con los experimentos de dicroísmo circular en los que el magnesio induce un cambio conformacional en ausencia de nucleótidos.

A continuación se añade una figura donde se puede apreciar mejor la posición del sitio de corte P3 en la estructura de TrwD, así como la disposición que tiene el dominio resultante de este corte (96 últimos residuos) en el hexámero de TrwD.



Figura 4.16. Localización del sitio de corte por la papaína en el modelo de TrwD. A. Modelo hexamérico de TrwD con sólo uno de los monómeros en color. El patrón de colores utilizado es similar al indicado en la figura 4.15. La posición del ADP se asignó usando como referencia la estructura monomérica de HP0525 en presencia de ADP (1g6o.pdb). Al igual que en la estructura de HP0525 de *H. pylori*, los motivos de unión a nucleótidos en la estructura de VirB11 de *Brucella suis* se disponen en la interfaz entre dos monómeros adyacentes (Hare et al., 2006). B. Monómero de TrwD, mostrando el sitio de corte P3 en un loop entre los motivos Walker A (K203) y Walker B (E270). C. Vista lateral del hexaméro y del monómero. El sitio de corte de la papaína P3 se indica con una flecha.

Se determinó la disposición de la región de 11 KDa resultante de la digestión por papaína a través del modelado del hexámero de TrwD generado a partir de la estructura cristalográfica de VirB11 de *B. suis* (pdb 2GZA) (ver apartado 4.2). Dicho fragmento (en verde) corresponde a una región de la proteína que mira al interior del anillo. En los homólogos HP0525 de *H. pylori* y VirB11 de *B. suis*, cuyas estructuras están resueltas, esta región final del C-terminal muestra una disposición similar dentro del anillo hexamérico (figura 4.17).



Figura 4.17. Disposición de la región de 11 KDa resultante de la digestión por papaína dentro del hexámero en los homólogos de VirB11. Se muestran las estructuras hexaméricas de *H. pylori* HP0525 (1nlz.pdb), *B. suis* VirB11 (2gza.pdb) y R388 TrwD (ver Material y Métodos). Cada monómero consiste en un dominio N-terminal, NTD (*cian, naranja y dorado,* respectivamente) y la primera mitad del dominio C-terminal, CTD (*azul, magenta y rosa,* respectivamente), conectados por un *linker* flexible (*gris*). La región al final del dominio C-terminal identificada por digestión con papaína en TrwD (*verde*) y las posiciones equivalentes en *B. suis* VirB11 (*oliva*) y HP0525 (*lima*) está mirando hacia el interior de los anillos hexaméricos.

4.3.5. Efecto del magnesio sobre el estado oligomérico de TrwD

El análisis de TrwD por microscopía electrónica reveló que TrwD es capaz de formar anillos hexaméricos en ausencia de magnesio (figura 4.18, panel A). Una proporción similar de anillos se observó en presencia de magnesio (figura 4.18, panel B). El análisis rotacional de las partículas analizadas reflejó una simetría seis para ambas condiciones.



Figura 4.18. Microscopía electrónica de oligómeros de TrwD. *Panel izquierdo*; TrwD en tampón 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) fue teñida con acetato de uranilo y analizada por microscopía electrónica en ausencia de Mg²⁺ y en presencia de 2 mM Mg²⁺ (paneles A y B, respectivamente) (escala, 35 nm). *Panel derecho*; análisis rotacional de las medias de las clases (106 y 58 partículas en A y B, respectivamente) (ver apartado 3.8. de Material y Métodos).

Los datos obtenidos parecen indicar que el magnesio no afecta al estado oligomérico de la proteína. Sin embargo, el tamaño del poro del anillo hexamérico parece ligeramente distinto en ambas condiciones ensayadas, siendo de un diámetro menor en la condición de elevado magnesio en el medio. Estos datos sugieren que la región más susceptible a la digestión con papaína en ausencia de ADP-Mg y que mira hacia el interior del anillo (señalada en verde en la Fig. 4.17) sufre un cambio conformacional que afecta a las dimensiones del mismo.

Además del análisis por microscopía electrónica, se optó también por analizar por ultracentrifugación analítica dos muestras de TrwD (30 μ M) incubadas en tampón 20 mM Hepes pH 7,6, 200 mM NaCl, 5% glicerol, 500 μ M ATP y 2 mM Mg²⁺ (figura 4.19, panel A) o 10 μ M Mg²⁺ (figura 4.19, panel B), respectivamente. En ambas condiciones se encontraron varias especies oligoméricas. A continuación se detallan los resultados de los estudios de velocidad de sedimentación así como equilibrio de sedimentación para ambas condiciones.





Para la condición de 2 mM de magnesio, en velocidad de sedimentación, se obtuvieron picos correspondientes a 3,1S (14,9%), 5,4S (11,5%), 7,7S (35,3%), 11S (9,5%), 14,5S (14,3%), 18,2S (8,9%), 21S (6.9%). Para la condición de 10 μ M de magnesio, los picos que se obtuvieron en velocidad de sedimentación fueron: 5,8S (26,7%), 8,1S (41%), 11.1S (14,4%) y 13,8S (18%). A pesar del carácter polidisperso de las muestras en ambas condiciones, el análisis hidrodinámico indicó un pico mayoritario a 7,7S (2 mM magnesio)-8,1S (10 μ M de magnesio), compatible con el hexámero de la proteína.

Por otro lado, en los experimentos de equilibrio de sedimentación a 7 krpm, la masa promedio obtenida para 2 mM y 10 μ M de magnesio fue de 196460 Da y 195940 Da, respectivamente (datos no mostrados). Esto sugiere la existencia en equilibrio de una especie mayoritaria compatible con hexámero de TrwD para ambas condiciones.

La concentración de proteína a la que se encontraban las muestras en las dos condiciones de magnesio era de 30 μ M, mientras que, la muestra de TrwD inicial enviada al Centro de Investigaciones Biológicas para su estudio por ultracentrifugación analítica se encontraba a 10 μ M (apartado 4.1.2). A pesar del carácter polidisperso en todas las muestras analizadas, en la muestra a 10 μ M se obtuvo un resultado compatible con un monómero de proteína, mientras que en las muestras a 30 μ M se obtuvo, en ambos casos, un resultado más compatible con un hexámero de la proteína. Esto refleja, una vez más, cómo el estado oligomerico de TrwD depende directamente de la concentración a la que se encuentra la proteína.

4.3.6. Efecto del magnesio in vivo en la conjugación

La concentración fisiológica de magnesio en *E. coli* es de 1 mM (Froschauer *et al.*, 2004), concentración inhibitoria de la actividad ATPasa de TrwD. Precisamente, para conseguir alcanzar esa concentración intracelular, en *S. typhimurium* existen tres transportadores de magnesio. Sin estos transportadores, dicha bacteria requiere una concentración de 100 mM de magnesio en el medio para poder crecer. Sin embargo, mutantes en sólo alguno de estos transportadores son capaces de crecer en concentraciones de magnesio del orden de μ M. La mayoría del magnesio intracelular no se encuentra en forma libre sino que se encuentra unido como cofactor a diversas enzimas, al ADN o lípidos.

Para estudiar el posible efecto del magnesio *in vivo*, se realizaron conjugaciones del plásmido R388 en presencia de 10 μ M Mg²⁺ y 2 mM Mg²⁺. Para ello, previamente se realizaron curvas de crecimiento para saber si la concentración de magnesio podía estar afectando el crecimiento. Las curvas de crecimiento se hicieron en medio limitante con sales M9, 0,5% casaminoácidos, 0,4 % glucosa, 1 mM cloruro cálcico, 1 mM tiamina y una concentración de sulfato magnésico según el caso (apartado 3.5.2 de Materiales y Métodos).

Una vez que se observó que el magnesio no tenía efecto sobre las curvas de crecimiento de la cepa donadora (figura 4.20), se procedió a ensayar la conjugación de R388 usando como cepa donadora DH5 α y como receptora UB1637 (tabla 3.1 de Materiales y Métodos). La media de las frecuencias de conjugación obtenidas para cada una de las condiciones de magnesio ensayadas (2 mM Mg²⁺ y 10 μ M Mg²⁺) fue de 3,9x10⁻³ y de 1,9x10⁻³, respectivamente. Por lo tanto, podemos concluir que concentraciones de magnesio que *in vitro* afectan la actividad de la proteína no alteran de forma significativa las frecuencias de conjugación de la concentración. Es necesario añadir que en estos experimentos no podemos determinar si la variación de la concentración de magnesio en el medio externo se ve acompañada de una variación de dicha concentración de magnesio en el medio intracelular de *E. coli*.



Figura 4.20. Efecto del magnesio sobre el crecimiento de la cepa DH5 α (R388). Curva de crecimiento de la cepa DH5 α conteniendo el plásmido conjugativo R388 en medio con sales M9, trimetoprim 20 µg/ml, 0,5% casaminoácidos, 0,4 % glucosa, 1mM cloruro cálcico, 1mM tiamina y 10 µM (*curva negra*), 1 mM (*curva gris*) o 5 mM (*curva gris oscuro*) acetato magnésico. La DO₆₀₀ se registró cada 5 minutos durante aproximadamente 12 horas a 37°C, en agitación, en un fluorímetro automatizado Victor3 (Perkin-Elmer). Cada medida en las curvas ha sido obtenida a partir de 12 réplicas por experimento. Cada curva es la media de 2 experimentos independientes.

4.4. Efecto inhibitorio de los ácidos grasos insaturados en la actividad de TrwD

Como ya se comentó en el apartado 1.2.2 de la Introducción, estudios *high-throughput* para la detección de inhibidores de la conjugación bacteriana identificaron a los ácidos grasos insaturados como posibles inhibidores (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005). El análisis pormenorizado del efecto de los ácidos grasos insaturados sobre la conjugación bacteriana reveló que éstos inhiben de forma selectiva la conjugación de ciertos plásmidos, lo que sugería que estaban afectando directamente a alguno de los componentes de la maquinaria conjugativa. Además, el ácido linoleico es capaz de inhibir a R388 mientras que no afecta a la movilización de CloDF13 por parte de éste, lo que sugiere que estaría afectando concretamente a algún producto de la región Dtr del plásmido R388. Por otro lado, se observó cómo TrwD veía afectada su actividad ATPasa en presencia de éstos, en lo que parecía un mecanismo de inhibición no competitiva (Machon, 2004) (Tesis Doctoral).

Para profundizar en el efecto inhibitorio de los ácidos grasos sobre la actividad de TrwD, se amplió el rango de estudio a otros ácidos grasos, tanto saturados como insaturados. Como ejemplo de ácidos grasos saturados se eligieron el ácido laúrico y palmítico ya que, previamente, mediante un ensayo radiactivo, se observó que no tenían ningún efecto en la actividad ATPasa de TrwD (Machon, 2004) (Tesis Doctoral). Como ácidos grasos insaturados se ensayaron el ácido oleico y linoleico (figura 4.21).




Tal y como se osbserva en la figura 4.21, a una concentración de 0,5 mM, los ácidos grasos saturados inhiben la actividad ATPasa en torno a un 20 %, mientras que la inhibición por los ácidos grasos insaturados es prácticamente del 100 %, datos que están en concordancia con los observados anteriormente (Machon, 2004) (Tesis Doctoral).

4.4.1. Caracterización de la Inhibición de la actividad de TrwD por el ácido linoleico

Ante los datos obtenidos, decidimos investigar el tipo de inhibición que ejerce el ácido linoleico sobre la actividad ATPasa de TrwD. Para ello, se hicieron dos isotermas de respuesta a concentraciones crecientes de ATP: una sin añadir ácido linoleico y otra añadiendo 20 μ M del ácido graso insaturado (figura 4.22 panel A). Tras analizar los parámetros cinéticos se observó que el tipo de inhibición es no competitiva, ya que la V_{max} disminuye en presencia de linoleico sin verse afectada la $K_{0.5(app)}$ ^[ATP] (tabla figura 4.22).

Curiosamente, en presencia de 2 mM Mg²⁺, la tasa de inhibición de la actividad de TrwD por el ácido linoleico se redujo en comparación a la tasa obtenida en presencia de 10 μ M Mg²⁺ (figura 4.22 panel B). Las constantes de inhibición aparente para el linoleico $K_{i(app)}^{[linoleico]}$, calculadas utilizando una ecuación de Hill para represor (ver apartado 3.6.4.2 de Materiales y Métodos; ecuación 5), fueron 20 μ M y 28 μ M, en presencia de 10 μ M y 2 mM Mg²⁺, respectivamente. Analizando cuidadosamente ambas cinéticas se observó cómo la tasa de inhibición a bajas concentraciones de linoleico es mayor a 10 μ M que a 2 mM Mg²⁺, lo que indica que el magnesio, de algún modo, puede hacer que la inhibición por el linoleico sea menos efectiva.



Figura 4.22. Inhibición de la actividad ATPasa de TrwD por el ácido linoleico. Se midió la actividad de TrwD (1,9 μ M) en tampón 50 mM Hepes pH 8,5, 75mM AcK, 5 % glicerol (p/v). (A) Se tituló la actividad ATPasa para distintas concentraciones de ATP en presencia (*círculos blancos*) o ausencia (*círculos negros*) de 20 μ M de ácido linoleico. Los parámetros cinéticos se detallan en la tabla superior. (B) Actividad ATPasa titulando para distintas concentraciones de ácido linoleico, en presencia de 2 mM Mg²⁺ (*círculos negros*) y 10 μ M Mg²⁺ (*círculos blancos*). Los datos se ajustaron a una ecuación de Hill para represor (apartado 3.6.4.2 de Materiales y Métodos; ecuación 5) para determinar los valores de $K_{i(app)}[ácido linoleico]$ para cada caso.

Recientemente, mediante experimentos *high-throughtput* de conjugación llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Fernando de la Cruz, se ha observado que el compuesto ácido 2-HexaDecinoico (2-HDA) inhibe la conjugación de varios plásmidos conjugativos (entre ellos R388) con una efectividad 50 veces superior al ácido linoleico (Getino M. datos no publicados). Para comprobar si esta mayor capacidad inhibitoria del ácido 2-HDA con respecto al ácido linoleico ocurría también *in vitro*, se ensayó la actividad ATPasa de TrwD con ambos compuestos. Los valores de actividad obtenidos con el ácido 2-HDA fueron similares a los obtenidos con el ácido linoleico para la misma concentración (datos no mostrados). De este modo, no se pudo confirmar que el ácido 2-HDA tenga mayor capacidad inhibitoria *in vitro*.

4.5. Interacciones funcionales entre las tres ATPasas citoplasmáticas del T4SS

4.5.1. Caracterización de la interacción TrwD-TrwK

Como se ha comentado anteriormente, estudios recientes (Kerr and Christie, 2010) apuntan a una posible implicación de VirB4 en dislocar la pilina de la MI al espacio periplásmico. Esta actividad de VirB4 estaría modulada por VirB11. Además, mediante técnicas de doble híbrido y coinmunoprecipitación se ha observado una interacción entre ambos motores (Atmakuri et al., 2004; Draper et al., 2006). Así pues, nos propusimos analizar la interacción entre estas dos proteínas en nuestro sistema modelo R388. Para ello se diseñó un sistema experimental en el cual se coexpresaban ambas proteínas, con la peculiaridad de que una de ellas tuviese una extensión con una cola de histidinas para posteriormente poder llevar a cabo la separación de los posibles complejos mediante cromatografía de afinidad. Para mantener la segregación plasmídica, se usaron plásmidos con diferentes replicones. Con estas cosideraciones, TrwD y His-TrwK (TrwK con una cola de histidinas en el dominio N-terminal) fueron clonadas en los plásmidos pJR06 y pSAN2, respectivamente, y co-expresadas en células C41. Después de lisar las células, el sobrenadante se cargó en una columna de níquel His-Trap HP (1 ml). En dicha columna debería quedar retenida His-TrwK, así como cualquier proteína unida a ella. Mediante el uso de un anticuerpo específico anti-TrwD, se confirmó que TrwD también era retenida formando parte de un complejo junto con His-TrwK, ya que ambas proteínas co-eluían juntas en las mismas fracciones, en un gradiente de imidazol (figura 4.23, panel B). TrwD no fue retenida en la columna en ausencia de His-TrwK (figura 4.23, panel A). Como control y para descartar la posibilidad de que la interacción His-TrwK/TrwD fuese inespecífica, se probó a co-expresar TrwD con otras porteínas que no tuviesen relación con la conjugación bacteriana, tales como His-p27 y His-ERK, observando que éstas eran incapaces de retener a TrwD (datos no mostrados). Como segundo control se testó la co-expresión de TrwD con His-TrwA, la proteína accesoria del relaxosoma pero que no forma parte del T4SS, y posterior separación en la columna de Ni-NTA también mostró que His-TrwA era incapaz de retenerla (figura 4.23, panel F). Pero quizás el control más importante fue la co-expresión de His-TrwK con TrbB, el homólogo de TrwD en el plásmido RP4. Como se puede observar en la figura 4.24, panel B, His-TrwK era incapaz de retener a TrbB. Por otro lado, se pudo concluir que la interacción entre TrwK-TrwD no requiere la hidrólisis de ATP por parte de ninguna de las dos proteínas, ya que un mutante en la lisina conservada del motivo de unión WalkerA (TrwD K203A), retenía la capacidad de unirse a TrwK (figura 4.23, panel C) y viceversa, un mutante en el motivo Walker B de TrwK, TrwK(D654A) cuya actividad ATPasa es nula (Arechaga et al., 2008), siguió interaccionando con TrwD (figura 4.25 panel C). También se pudo observar la interacción ensayando ambos mutantes a la vez, HisTrwD(K203A) y TrwK(D654A) (figura 4.25 panel D).

Recientemente, nuestro grupo demostró que el extremo C-terminal de TrwK desempeña un papel regulador en la actividad ATPasa de la proteína, ya que la eliminación de las tres últimas α -hélices de TrwK induce un gran aumento de la actividad ATPasa con respecto a TrwK salvaje (Pena *et al.*, 2011). Esta región autoinhibidora evitaría así un gasto inútil de ATP. Se ha sugerido que la interacción, a través de esta región, con otras proteínas específicas de la maquinaria de transporte

Capítulo 4 Resultados

podría estimular la hidrólisis de ATP en TrwK. Esta región, sin embargo, no está involucrada en la interacción entre TrwK-TrwD, ya que mutantes que carecen de esta última α -hélice (TrwK 1-801) o de las dos últimas α -hélices (TrwK 1-787) se unen a TrwD con la misma eficiencia que la proteína salvaje (figura 4.23, paneles D y E, respectivamente).

Se probó también una construcción de TrwK que comprende el dominio motor junto con las últimas tres α -hélices (TrwK 413-823). Este mutante es capaz de interaccionar con TrwD (figura 4.23, panel G). Cabe destacar que dicha construcción, exceptuando las últimas α -hélices, presenta una alta homología estructural con el dominio motor de TrwB (Middleton *et al.*, 2005) (Pena *et al.*, 2011). Un mutante de TrwK que contiene sólo el dominio N-terminal (TrwK 1-375) y, por lo tanto, carece del dominio motor presente en la región C-terminal de TrwK también es capaz de interaccionar con TrwD (figura 4.23, panel H) pero de una manera más débil que las demás construcciones de TrwK probadas.

En el caso de TrwD, se probaron dos construcciones de esta proteína que comprenden solamente la región NTD o la región CTD (TrwD(1-121) y TrwD Δ N164, respectivamente), ambas carentes de la región *linker* que conecta los dominios N y C-terminal. No se detectó interacción de TrwK con ninguno de estos dos mutantes (figura 4.23, paneles I y J), sugiriendo que la región *linker* desempeñaba un papel esencial en la interacción TrwK/TrwD. Los bajos niveles de proteína detectados para ambos mutantes pueden deberse a que al sobre-expresar dichos mutantes, una parte de la proteína está formando cuerpos de inclusión. De hecho, un mutante TrwD Δ N160 realizado durante el desarrollo de una tesis previa (Machón, 2004), se demostró que formaba cuerpos de inclusión (tabla 4.2). A pesar de ello, la proporción de mutante soluble y, por tanto, susceptible de interaccionar con TrwK era suficientemente elevada, a juzgar por los niveles detectados en el lisado tras centrifugación a alta velocidad (100.000 g) (figura 4.23, paneles I y J).



Figura 4.23. Interacción TrwK-TrwD detectada por cromatografía de afinidad. La cepa C41 (*DE3*) se transformó con los vectores que coexpresan las distintas construcciones indicadas en la parte superior de cada panel. Los lisados se cargaron en una columna Ni-NTA y las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de imidazol como se indica en el apartado 3.7.2.4 de Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron mediante *Western-Blot* usando un anticuerpo específico antiTrwD. Los carriles L y W corresponden a la muestra cargada en la columna y a la muestra recogida tras lavar con el tampón de unión, respectivamente. El gradiente lineal de imidazol (70-500 mM) empleado para eluir las muestras se representa por un triángulo negro. Como controles se muestra la coexpresión de TrwD con el vector pET28a vacío, así como con TrwA (paneles A y F, respectivamente).

Para comprobar los niveles de TrwK en los complejos HisTrwK-TrwD se analizaron las mismas fracciones del panel B de la figura 4.23 usando un anticuerpo específico antiTrwK (figura 4.24)



Figura 4.24. Niveles de TrwK en la interacción TrwK-TrwD e interacción HisTrwK-TrbB. Las diferentes proteínas se coexpresaron, cargaron y eluyeron de una columna Ni-NTA, tal y como se describe en la figura 4.23. Los perfiles de elución obtenidos después de la coexpresión de HisTrwK con TrwD o TrbB se analizaron por Western-Blot con un anticuerpo específico antiTrwK o antiTrbB (panel A y B, respectivamente). Los carriles L y W corresponden a la muestra cargada en la columna y a la muestra recogida después de lavar con el tampón de unión, respectivamente. El gradiente lineal de imidazol (70-500 mM) empleado para eluir las muestras se representa por un triángulo negro.

4.5.2. Análisis de la interacción de TrwK con distintos homólogos de TrwD

El hecho de que las construcciones correspondientes al domino N-terminal y C-terminal de TrwD (TrwD₁₋₁₂₁ y TrwD Δ N160, respectivamente), ambas carentes de la región *linker*, no interaccionaran con TrwK, sumado a la gran variabilidad en la longitud del mismo entre los distintos homólogos, nos hizo preguntarnos si de algún modo el *linker* podría tener un papel en dicha interacción.

Como se ha explicado con anterioridad en el apartado 4.2, TrwD es el homólogo de VirB11 con el *linker* más largo. De los 3 homólogos seleccionados en función de la longitud del mismo (TrwD_*B.tribocorum*, TraG_pKM101 y TrbB_RP4) el que presenta el *linker* más corto y por ello le hace presentar una topología tipo HP0525 es TrbB_RP4 (ver figura 4.8). Por otro lado, TrwD de *B. tribocorum* y TraG_pKM101 presentan ambos una topología tipo VirB11 de *B.suis*. Además de las diferentes topologías entre los homólogos seleccionados, tanto TrwD de *B.tribocorum* como TraG_pKM101 presentan la región α C2 y la α J, ausentes en TrbB_RP4, las cuales se disponen en la base del hexámero (figura 4.8).

Así pues, se analizó la capacidad de interacción de estos cuatro homólogos de VirB11 con TrwK del plásmido R388 por cromatografía de afinidad. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo en el orden inverso, los homólogos de VirB11 se clonaron en un vector que introduce colas de His en el extremo N-terminal y se usó un anticuerpo específico de TrwK para confirmar la co-elución de las dos proteínas. Como era de esperar, TrwK no fue retenida en la columna en ausencia de His-TrwD (figura 4.25, panel A). Cabe destacar que la cola de His en el extremo N-terminal de TrwD no afecta a la unión con TrwK (figura 4.25, panel B). También se ensayó la interacción con la construcción que añade colas de His en el extremo C-terminal de TrwD, usando para ello el plásmido pET29c, obteniendo una interacción más debil en este caso (figura 4.25, panel H). TrwD de R388 y TrwD de *Bartonella tribocorum* comparten un 80% de identidad en su secuencia aminoacídica. Como era de esperar y debido a la capacidad de TrwD de *B. tribocorum* de complementar *in vivo* un mutante de TrwD_{R388} (Seubert *et al.*, 2003), TrwD de *B. tribocorum* se une a TrwK tan eficientemente como TrwD de R388 (figura 4.25, panel E). La conservación con TraG del plásmido pKM101 es menor. Ambas proteínas comparten un 37% de identidad. Se encontró que TraG de pKM101 se une a TrwK tan eficientemente como TrwD de R388 filogenéticamente más alejado que carece de la región *linker*-B no se une a TrwK (figura 4.25, panel G). Ambas proteínas comparten un 21% de identidad.



Figura 4.25. Interacción entre distintos homólogos de VirB11 con TrwK detectada por cromatografía de afinidad. Las diferentes proteínas se coexpresaron, cargaron y eluyeron de una columna Ni-NTA tal y como se muestra en la figura 4.23. Las muestras se analizaron por *Western-Blot* con un anticuerpo específico antiTrwK (paneles A-H). La figura muestra los patrones de elución obtenidos después de la coexpresion de TrwK con diferentes homólogos de VirB11. Como control se usó el vector pET28a vacío (panel A). Los carriles L and W corresponden a las muestras cargadas en la columna y las muestras recogidas después de lavar con el tampón de unión, respectivamente. El gradiente lineal de imidazol (70-500 mM) empleado para eluir las muestras se representa por un triángulo negro.

La figura 4.26 corresponde a un gel SDS-PAGE con las mismas fracciones que se muestran en en el panel B de la figura 4.25. Tal y como se observa en la figura, el complejo formado por ambas proteínas es de gran pureza.



Figura 4.26. Interacción HisTrwD-TrwK en gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Las proteínas se coexpresaron, cargaron y eluyeron de una columna Ni-NTA, tal y como se describe en la figura 4.24. Los perfiles de elución obtenidos después de la coexpresión de HisTrwD con TrwK se analizaron por gel SDS-PAGE al 10% teñido con Azul de Coomassie. Los carriles L, F y W corresponden a la muestra cargada en la columna, a la muestra que no se ha retenido en la columna (*flowthrough*) y a la muestra recogida después de lavar con el tampón de unión, respectivamente. El gradiente lineal de imidazol (70-500 mM) empleado para eluir las muestras se representa por un triángulo negro. Las fracciones mostradas en este gel son las mismas que las mostradas en la figura 4.25, panel B, en las que la proteína fue detectada por *westernblot* Las flechas negra y blanca indican la altura a la que migra TrwK y HisTrwD, respectivamente.

4.5.3. El homólogo de TrwD del plásmido pKM101 se une a TrwK pero no puede complementar a TrwD *in vivo*

Con el fin de comprobar si la capacidad de unión de TrwK a distintos homólogos de TrwD pudiera tener algún efecto en la conjugación, llevamos a cabo ensayos de complementación in vivo (Tabla 4.1). Sin el gen de TrwD funcional, no hay conjugación del plásmido pSU4039 (un mutante R388 con un transposón insertado dentro del gen trwD). La conjugación se restableció cuando el plásmido pSU4039 se complementó con un plásmido que contiene un gen funcional de TrwD, independientemente del vector de clonación usado (pET3a o pCDF-1b). La conjugación del mutante pSU4039 también pudo ser restaurada a frecuencias similares a las de R388 complementando con TrwD de *B. tribocorum*, tal y como ya se había observado en un trabajo previo (Seubert *et al.*, 2003). Sin embargo, el plásmido pJR24, que codifica para el homólogo TrbB del plásmido RP4 no complementaba la función de TrwD en la conjugación. Curiosamente, el homólogo del plásmido pKM101, TraG, a pesar de unirse a TrwK con la misma eficacia que TrwD de R388 (figura 4.25), no es capaz de complementar a un mutante de TrwD. Se comprobó que los niveles de expresión de los homólogos TraG y TrbB en la cepa C41 (DE3) eran similares a los que presenta TrwD (figura 4.27). De todos modos, para comprobar que la cantidad de proteína expresada en la cepa donadora D1210 no era un factor limitante en la complementación de TrwD, estos mismos ensayos de complementación también se realizaron clonando las distintas proteínas homólogas en un plásmido inducible por arabinosa (pBAD33), obteniendo los mismos resultados. Como también se puede ver en la tabla, no se observaron efectos de dominancia negativa para ninguno de los homólogos probados. Estos resultados sugieren que TrwD, además de interaccionar con TrwK, interacciona con otro/otros componentes del la maquinaria conjugativa. Esta interacción parece ser mucho más específica, ya que no permite el intercambio entre homólogos de sistemas conjugativos relacionados.

Plásmidos en el donador ^a	Homólogo VirB11 en el donador	Frecuencia de Coniugación
	TrwD	1.3×10^{-1}
pSU4039		< 10 ⁻⁷
R388 + pJR27 (pCDF- <i>traG</i>)	TrwD/TraG (pKM101)	1,1 x 10 ⁻¹
R388 + pJR24 (pCDF- <i>trbB</i>)	TrwD/TrbB (RP4)	2,3 x 10 ⁻¹
R388 + pJR33 (pET3a trwD B.tribocorum)	TrwD (B.tribocorum)	0,9 x 10 ⁻¹
pSU4039 + pJR01 (pET3a- <i>trwD</i>)	TrwD (R388)	7,6 x 10 ⁻²
pSU4039 + pJR06 (pCDF- <i>trwD</i>)	TrwD (R388)	1,2 x 10 ⁻²
pSU4039 + pJR27 (pCDF- <i>traG</i>)	TraG (pKM101)	< 10 ⁻⁷
pSU4039 + pJR24 (pCDF- <i>trbB</i>)	TrbB (RP4)	< 10 ⁻⁷
pSU4039 + pJR33 (pET3a trwD B.tribocorum)	TrwD (<i>B.tribocorum</i>)	1,1 x 10 ⁻²

Tabla 4.1. Frecuencias de conjugación de R388 y un mutante de *trwD* **complementado con distintos homólogos de VirB11.**^a Se usaron como células donadoras cepas derivadas de E.coli K12 D1210 que contenían los plásmidos mostrados en la primera columna y como receptoras la cepa DH5α. Las frecuencias de conjugación se calcularon como se indica en el apartado 3.5.3 de Materiales y Métodos.



Figura 4.27. Niveles de expresión de los distintos homólogos de TrwD. Se sobrexpresaron las distintas proteínas (TrwD, TraG o TrbB) clonadas en el vector de expresión pCDF-1b en la cepa C41. Se cargaron los lisados celulares en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Comassie. El signo (+) representa la sobre-expresión con 1 mM de IPTG mientras el (-) la misma cepa sin añadir IPTG. La flecha negra, transparente y la punta de flecha indican TrwD, TraG y TrbB, respectivamente.

4.5.4. Caracterización de la interacción de la proteína acopladora TrwB con TrwK y TrwD

En trabajos anteriores realizados por otros grupos de investigación se demostró, mediante ensayos de *Tranfer DNA Inmunoprecipitation* (TrIP), que VirD4, la proteína acopladora en *A. tumefaciens*, entra en contacto con el ADN antes que cualquier otra proteína del T4SS (Cascales and Christie, 2004). En el proceso de transferencia de este sustrato, VirB11 sería el siguiente componente en contactar con el sustrato nucleoproteico. La técnica no permitía discriminar una interacción directa de VirB11 con el DNA, pero sugiere que la precipitación TrI sea debida o bien a una unión de VirB11 a la relaxasa, o bien por la unión de VirB11 a VirD4, que a su vez está unida al DNA. Apoyando esta última hipótesis existen experimentos de co-inmunoprecipitación que evidencian la existencia de una interacción entre VirD4 y VirB11, independiente de la presencia de otras subunidades del T4SS (Atmakuri *et al.*, 2004).

Con el mismo método empleado para demostrar una interacción TrwD-TrwK, se decidió probar la posible interacción entre TrwD y TrwBΔN70. Las construcciones His-TrwBΔN70 (TrwBΔN70 con una cola de histidinas en el extremo N-terminal) y TrwD fueron co-expresadas en la cepa C41 (*DE3*) de *E. coli*. El lisado se pasó por una columna de níquel y las fracciones eluidas se analizaron por *Western blot*, tal y como se describe para los ensayos de interacción TrwK-TrwD. TrwD se retuvo en la columna en presencia de His-TrwBΔN70 (figura 4.28, panel A). A pesar de que los niveles de expresión de TrwD en la coexpresión HisTrwBΔN70/TrwD fueron similares a los obtenidos para HisTrwK/TrwD (carril L en las figuras 4.23 panel B y 4.28 panel A), la interacción de TrwD con TrwB parece ser más débil que la observada con TrwK, ya que se retuvo una fracción de proteína menor. Las construcciones en el orden inverso no se pudieron probar ya que TrwBΔN70, sin una cola de histidinas, presenta afinidad por la columna de níquel a concentraciones de Imidazol muy elevadas (datos no mostrados). Al igual que en la interacción TrwK/TrwD, la interacción entre TrwB/TrwD no requiere de la hidrólisis de ATP por parte de TrwD ya que el mutante TrwD (K203A) se retuvo en la columna con la misma eficiencia que la proteína salvaje (figura 4.28 paneles A y B).

Por otra parte, existen estudios previos que sugieren una interacción entre VirD4 y VirB4 en los respectivos homólogos del plásmido pCF10 de *E. faecalis* (Li *et al.*, 2012) y del plásmido R388 (Pena *et al.*, 2012). En este último caso, dicha interacción ha sido propuesta tras demostrar una inhibición de la actividad ATPasa de TrwK por TrwB y viceversa. Así pues, para demostrar la interacción entre TrwK y TrwBΔN70 se usó la misma aproximación que para demostrar la interacción TrwK-TrwD (figura 4.28, panel C). Como puede observarse al comparar los paneles A y C de la misma figura, la intensidad de la banda correspondiente a TrwK fue mayor que la obtenida para TrwD, lo que sugiere que TrwB interacciona con TrwK con mayor afinidad que con TrwD.

Por último se analizó si la presencia de TrwK podría afectar a la interacción entre TrwB y TrwD. Las tres ATPasas se co-expresaron al mismo tiempo en la cepa C41 (*DE3*). Como se muestra en el panel D de la figura 4.28, la construcción HisTrwBΔN70 retuvo a las otras dos ATPasas en la columna de afinidad, lo que sugiere que podrían formar complejos ternarios. La intensidad de la banda de TrwD resultó ser, de nuevo, menor que la observada para TrwK, siendo las intensidades observadas similares a las obtenidas al ensayar cada una de ellas por separado junto con HisTrwBΔN70.



Figura 4.28. Interacción entre las tres ATPasas del T4SS detectada por cromatografía de afinidad. Las diferentes proteínas se coexpresaron, cargaron y eluyeron de una columna Ni-NTA, tal y como se indica en la figura 4.23. Las muestras se analizaron por *Western-Blot* con anticuerpos específicos antiTrwD (paneles A, B y D), antiTrwK (paneles C y D) y antiTrwB (panel D). Los perfiles de elución obtenidos después de la coexpresión de HisTrwBΔN70 con TrwD o TrwK se muestran en los paneles A y C, respectivamente. El análisis de la interacción entre HisTrwBΔN70, TrwK y TrwD se muestra en el panel D. El panel B muestra la interacción entre HisTrwBΔN70 con el mutante en el motivo Walker A de TrwD (TrwDK203A). Los carriles L y W corresponden a la muestra cargada en la columna y a la muestra recogida después de lavar con el tampón de unión, respectivamente. El gradiente lineal de imidazol (70-500 mM) empleado para eluir las muestras se representa por un triángulo negro.

4.5.5. Efecto de mutaciones en TrwD sobre la interacción con TrwK

En una tesis previa, realizada en el laboratorio del Dr. de la Cruz, se abordó un análisis mutacional de TrwD con el fin de estudiar su capacidad de interacción con las membranas (Machon, 2004). Se caracterizaron los distintos mutantes construidos en conjugación en base a su solubilidad, actividad ATPasa, etc. Un resumen de los datos obtenidos se encuentra en la tabla 4.2. Un mutante interesante que podría ser útil en nuestro trabajo resultó ser TrwD V106G. Dicho mutante plegaba correctamente y se encontraba en forma soluble al sobre-expresarlo y purificarlo. La actividad ATPasa fue similar a la registrada para TrwD salvaje. Sin embargo, su capacidad de complementar un mutante en TrwD en conjugación fue de un 1% con respecto a la complementación observada para TrwD salvaje.

Mutación	Actividad in vivo	Dominancia	Plegamiento	Solubilidad	Hidrólisis de ATP
K203Q	<0.01 %	Dominante	+	S	Sin Actividad
Δ[M1-V22]	<0.01 %	Recesivo	-	-	n.d.
Δ[M1-F160]	<0.01 %	Recesivo	C.I.	I (C.I.)	n.d.
L65R	<0.01 %	Recesivo	C.I.	I (C.I.)	n.d.
V122I, K341R	<0.01 %	Recesivo	+	I (M.I.)	Normal
G99R	<0.01 %	Dominante	+	l (M.I.)	>>K _m (ATP)
L126P, H295Y	<0.01 %	Dominante	+	I (M.I.)	Normal
V106G	1 %	Dominante	+	S	Normal

Tabla 4.2. Resumen de las actividades desarrolladas por los diferentes mutantes de TrwD. Tabla tomada de la Tesis Doctoral (Machon, 2004).

Por este motivo, se decidió comprobar si el descenso de actividad *in vivo* en este mutante, se podía explicar por carecer de la capacidad para interaccionar con TrwK y/o TrwB. Como puede observarse en la figura 4.29 tanto TrwK como TrwB son capaces de interaccionar con TrwD V106G. Al igual que para la proteína salvaje, la interacción observada con TrwB parece ser más débil que para TrwK. Así pues, la mutación de dicho residuo no afecta a la interacción con las otras ATPasas.



Figura 4.29. Interacción del mutante TrwD V106G con TrwK y TrwB detectada por cromatografía de afinidad. Las diferentes proteínas se coexpresaron, cargaron y eluyeron de una columna Ni-NTA, tal y como se describe en la figura 4.23. Los perfiles de elución obtenidos después de la coexpresión de HisTrwK o HisTrwBΔN70 con el mutante TrwD(V106G) se analizaron por *Western-Blot* con un anticuerpo específico antiTrwD (panel A y B, respectivamente). Los carriles L y W corresponden con la muestra cargada en la columna y con la muestra recogida después de lavar con el tampón de unión, respectivamente. El gradiente lineal de imidazol (70-500 mM) empleado para eluir las muestras se representa por un triángulo negro.

Estudios de doble híbrido en *A. tumefaciens* sugerían que la región de interacción con VirB4 se encontraba entre los primeros 106 aminoácidos de VirB11 (Draper *et al.*, 2006). Por este motivo y, haciendo uso del modelo estructural, se diseñó un mutante dirigido en dicha región de TrwD que pudiese ver afectada su unión a TrwK. La lisina 86 se encontraba en dicha región y en el modelo hexamérico estos residuos adquirían una disposición bastante expuesta hacia el exterior de la estructura convirtiendo a este mutante en un candidato para ser analizado (figura 4.30). Este residuo está conservado en la estructura cristalina de VirB11 de *B. suis* pero no en HP0525. Este mutante TrwD(K86A) fue construido por el método del megaprimer (Sarkar and Sommer, 1990). Como se puede observar en la figura 4.30, este mutante no ve alterada su capacidad para interaccionar con TrwK.



Figura 4.30. Interacción entre el mutante TrwD K86A y TrwK. Panel Izquierdo. Ambas proteínas se coexpresaron, cargaron y eluyeron de una columna Ni-NTA como en la figura 4.23. Los perfiles de elución obtenidos después de la coexpresión de HisTrwK con el mutante TrwD(K86A) se analizaron por *Western-Blot* con un anticuerpo específico antiTrwD. Los carriles L y W corresponden con la muestra cargada en la columna y con la muestra recogida después de lavar con el tampón de unión, respectivamente. El gradiente lineal de imidazol (70-500 mM) empleado para eluir las muestras se representa por un triángulo negro. Panel derecho. Vista lateral del modelo hexamérico de TrwD con el residuo Lys86 de cada monómero representado en forma de esferas en color rojo.

4.5.6. Análisis del papel de TrwD en la biogénesis del pilus

Tal y como se ha mostrado en el apartado 4.5.3, TraG del plásmido pKM101 no es capaz de complementar *in vivo*, en la conjugación, a un mutante de R388 sin el gen *trwD* funcional. Sin embargo, este homólogo se une a TrwK de R388 con la misma eficiencia que TrwD. Recientemente, se ha postulado que VirB11, homólogo de TrwD, tiene un papel modulador de la actividad de VirB4, homólogo de TrwK (Kerr, 2010). VirB4 estaría implicada en la translocación de las subunidades de pilina de la MI al espacio periplásmico y VirB11 ayudaría a VirB4 modulando su actividad. Por ello, aprovechando los resultados anteriores en los que caracterizamos las interacciones de TrwK con TrwD y con los distintos homólogos de éste, decidimos estudiar el papel de las interacciones TrwK-TrwD durante la biogénesis del *pilus*.

Inicialmente se trató de detectar la pilina de R388 (TrwL) a partir de la fracción extracelular, como se describe en el apartado 3.6.3.3 de Materiales y Métodos, llevando a cabo un protocolo basado en un método descrito en la Tesis doctoral de la Dra. Bolland (1994). Debido al pequeño tamaño y al carácter hidrofóbico de la pilina, fue necesario utilizar geles SDS-PAGE con tricina en lugar de glicina y emplear tinción de plata para observar la pilina. Sólo se pudo detectar TrwL, de una manera engorrosa y no muy reproducible, en la fracción extracelular de la cepa D1210 con una construcción que contiene toda la región PIL_w de R388 clonada bajo un promotor lac (pSU4059) y tras sobrexpresar con 1 mM IPTG (figura 4.31). La cepa D1210 con el plásmido R388 no mostró niveles suficientes de TrwL para ser detectados con este protocolo (datos no mostrados).



Figura 4.31. Detección de la pilina en la fracción extracelular. Geles de poliacrilamida-SDS en tricina teñidos con plata. Se cargaron 25 µl de la fracción extracelular, obtenida como se indica en el apartado 3.7.3.3 de Materiales y Métodos, de la cepa D1210 (A) y de la misma cepa con el plásmido 4059 (B) ambas crecidas con 1 mM IPTG. La flecha indica la banda correspondiente a la pilina.

Como la manipulación de la pilina era muy dificultosa, se decidió estudiar el *pilus* de forma alternativa, focalizando los experimentos en el otro componente del *pilus*, la adhesina TrwJ, una proteína de carácter hidrofílico y, por tanto, más manipulable. Como se ha indicado en el apartado 1.2.3 de la Introducción la adhesina aparece asociada al ápice del *pilus* (Aly and Baron, 2007). La detección de este componente minoritario en el exterior de la bacteria está condicionada a la presencia del *pilus*, por lo que resulta ser un buen marcador para demostrar, de forma indirecta, que existe biogénesis del *pilus* (Lai and Kado, 1998). Para poner a punto la detección de TrwJ (componente minoritario del *pilus*) mediante *Western blot* así como para purificar el anticuerpo antiTrwJ, obtenido en el laboratorio del Dr. Fernando de la Cruz (Sastre, 1996) (Tesis Doctoral), lo primero que se realizó fue la sobre-expresión de TrwJ en la cepa C41 (*DE3*) haciendo uso de la construcción pET3a::*trwJ* (pSU5038) (figura 4.32). La purificación del anticuerpo se realizó como se describe en el apartado 3.6.3.2 de Materiales y Métodos.



Figura 4.32. Sobre-expresión de TrwJ y detección por *Western blot* **en extracto total.** Panel A, Comassie mostrando los niveles de TrwJ, clonado en un vector de expresión pET3a, a distitutos tiempos de inducción con 1 mM IPTG. Como control negativo se cargó una muestra de la cepa C41 sin la construcción de TrwJ (carril izquierdo). Panel B, *Western blot* con un anticuerpo primario purificado antiTrwJ de las mismas fracciones cargadas en el gel SDS-PAGE del panel A.

Posteriormente, se procedió a analizar los niveles de TrwJ y así tratar de estudiar la biogénesis del *pilus*. Se complementó el mutante de TrwD (pSU4039) con TrwD R388, con TrwD_*B.tribocorum*, TraG_pKM101 y TrbB_RP4 y se analizaron los niveles de TrwJ del extracto total mediante *Western blot* (figura 4.33). Como se observa en dicha figura, sólo se pudo detectar TrwJ en la cepa C41 (*DE3*) que contenía la construcción pET3a::*trwJ* inducida con IPTG. Los niveles de expresión de esta proteína a partir del plásmido R388 o del mutante pSU4039 (derivado de R388) no eran suficientes para poder detectar su presencia por *Western blot* (figura 4.33).



Figura 4.33. Niveles de TrwJ en el extracto total detectados por *Western blot.* Se lisaron 10 ml de cada uno de los cultivos como se describe en el apartado 3.6.3 de Materiales y Métodos. Todas las construcciones fueron probadas en la cepa D1210. Como control negativo se utilizó la cepa D1210 vacía y como control positivo se utilizó una muestra del extracto de la cepa C41 con la construcción pET3a::*trwJ* inducida con 1 mM IPTG durante 4 horas (última calle).

Posteriormente, se procedió a estudiar los niveles de TrwJ en la fracción extracelular como se indica en el apartado 3.6.3.3 de Materiales y Métodos. Como muestra la figura 4.34, en el medio extracelular, sólo se pudo detectar niveles de TrwJ en la fracción correspondiente a la construcción que contiene la región PIL_w inducible con IPTG (plásmido 4059) (tabla 3.2 de Materiales y Métodos). Al igual que en el caso del extracto total, no se pudo detectar TrwJ en la fracción extracelular de la cepa D1210 que contenía el plásmido R388.

Los resultados obtenidos parecen indicar que los bajos niveles de expresión de TrwJ en R388 y plásmidos derivados no son suficientes para poder detectar TrwJ en el medio extracelular, como parte del *pilus*. Sin embargo, estos resultados preliminares son prometedores y parecen indicar que la construcción pSU4059 es propicia para ser mutada en el gen *trwD* y comprobar los niveles de TrwJ tras complementar con los distintos homólogos.

Capítulo 4 Resultados



Figura 4.34. Niveles de TrwJ en la fracción extracelular detectados por *Western blot*. Para la obtención de la fracción extracelular se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.6.3.3 de Materiales y Métodos. Todas las construcciones fueron probadas en la cepa D1210. Como control negativo se utilizó la cepa D1210 vacía.

4.5.5. Estudio de la interacción de TrwD con las otras ATPasas del T4SS mediante proteólisis y cromatografía de tamizado molecular

Como método alternativo para analizar posibles interacciones de TrwD con alguna de las ATPasas del T4SS se procedió a incubar TrwD con TrwK y TrwBΔN70 para analizar posteriormente los patrones de digestión con papaína. El método utilizado es similar al empleado en el apartado 4.3.4. en el análisis de cambios conformacionales en TrwD asociados a la presencia/ausencia de magnesio.



Figura 4.35. Digestión parcial de TrwD-TrwK y TrwD-TrwBΔN70 con papaína. Panel A. Gel SDS-PAGE de los productos de digestión de TrwD (125 μM), TrwK (125 μM) y TrwD-TrwK (relación molar 1:1) en tampón 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM acetato potásico, 5 mM acetato magnésico, 5 mM ATP y 10 % glicerol (p/v). La digestión se hizo durante 90 min a 25 °C con una relación molar papaína:TrwD:TrwK de 1:100:100. Panel B. Gel SDS-PAGE de los productos de digestión de TrwD (100 μM), TrwBΔN70 (100 μM) y TrwD-TrwBΔN70 (relación molar 1:1). La digestión se realizó en el mismo tampón que el panel A pero en este caso con una relación molar papaína:TrwD:TrwBΔN70 de 1:50:50.

Los patrones de digestión obtenidos al incubar TrwD-TrwK y TrwD-TrwB Δ N70 fueron los resultantes de sumar los patrones de digestión de cada proteína por separado (figura 4.35). En el panel A de dicha figura se observa como el patrón de corte de TrwK no se ve afectado por la presencia de TrwD. Así pues, no parece que exista una interacción entre las dos proteínas que origine un cambio conformacional que pueda verse reflejado en estos ensayos con papaína.

Estos mismos ensayos fueron llevados a cabo con la construcción TrwK(413-823), correspondiente al dominio motor de TrwK y con un elevado grado de homología con TrwBΔN70 (Middleton *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2011). Los experimentos de cromatografía de afinidad mostraron que este dominio motor es capaz por sí solo de interaccionar con TrwD (figura 4.23 panel G). Al igual que en los casos anteriores, el experimento de digestión con papaína entre TrwD-TrwK(413-823) no sugiere la existencia de una interacción entre las dos proteínas que origine un cambio conformacional que afecte al patrón de corte (figura 4.36).

En este experimento, cabe resaltar la presencia de un núcleo de unos 28 KDa insensible al tratamiento con papaína que no aparece en la digestión de TrwK salvaje (figura 4.36). Curiosamente, TrwK(413-823) es completamente digerida con papaína mientras que el patrón de digestión de TrwK salvaje muestra dominios estables e insensibles a la digestión con un peso molecular mucho más grande que TrwK(413-823) lo que sugiere que la presencia de la mitad N-terminal de TrwK es esencial en la estabilidad de la proteína y que la interacción con TrwD no es suficiente para garantizar la estabilidad de TrwK(413-823).



Figura 4.36. Digestión parcial de TrwD-TrwK (413-823) con papaína. Gel SDS-PAGE de los productos de digestión de TrwD (125 μM), TrwK (413-823) (125 μM) y TrwD-TrwK(413-823) (relación molar 1:1) en tampón 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 75 mM acetato potásico, 5 mM acetato magnésico, 5 mM ATP y 10 % glicerol (p/v). La digestión se hizo durante 90 min a 25 °C con una relación molar papaína:TrwD:TrwK de 1:100:100.

Capítulo 4 Resultados

Estos mismos ensayos de proteólisis con papaína fueron realizados por un lado en presencia de ADP o AMPPNP en lugar de ATP y por otro lado en ausencia nucleótido, obteniendo en todos los casos los mismos patrones de digestión.

Como técnica complementaria a estos experimentos, se utilizó la cromatografía de tamizado molecular para analizar una posible interacción de TrwD con TrwK. En caso de existir una interacción estable entre ambas proteínas, el complejo formado tendría un mayor peso molecular y por lo tanto eluiría en un volumen menor en la columna. Como muestra la figura 4.37 TrwD eluyó en volumen aproximado de 1,58 ml mientras que TrwK lo hizo en un volumen de 1,41 ml (ambos volúmenes de elución corresponden a un monómero de cada una de las proteínas, según la calibración de la columna) (MW teóricas de 40 KDa y 94 KDa para TrwD y TrwK, respectivamente). Ambas proteínas fueron incubadas a diferentes relaciones molares, 1:1 y 1:5, sin observar en ningún caso la formación de un complejo estable. Esta interacción fue probada en diferentes condiciones de tiempo y temperatura de incubación, pH y distintas relaciones estequiométricas, obteniendo en todos los casos cromatogramas similares a los mostrados en la figura 4.37.



Figura 4.37. Ensayo de interacción TrwD-TrwK mediante tamizado molecular. Se inyectó por separado una muestra de TrwD (52 μ M) y otra de TrwK (25 μ M) en una columna Superdex200 PC 3.2/30 previamente equilibrada en tampón 50 mM TrisHCl pH 7,2, 200 mM NaCl y 5 % glicerol (*cromatograma azul y rojo*, respectivamente). TrwD:TrwK fueron incubadas en una relación equimolar de 1:1 y 5:1 en un tampón 50 mM TrisHCl pH 7,2 y 5 % glicerol durante 15 minutos a 30°C para ser porsteriormente cargadas en la columna (*cromatograma verde y celeste*, respectivamente).

4.6. Estudio del posible efecto de TrwD en las actividades *in vitro* de TrwC

Como se ha comentado en el apartado 1.2.5.1 de la Introducción, el sustrato a transportar durante el proceso conjugativo es un complejo nucleo-proteico. En el proceso, la proteína piloto TrwC es secretada a la célula receptora unida covalentemente al ADN que ha procesado previamente (de la Cruz *et al.*, 2010). El gran tamaño de TrwC (108kDa), sumado a las dimensiones que presenta el *core complex* evidencia que TrwC debe ser desplegada previamente a su transporte. Por este motivo, una de las hipótesis durante el desarrollo de esta tesis fue que TrwD, haciendo uso de la energía resultante de su actividad ATPasa, estuviese encargada de desplegar TrwC como paso previo a su translocación a través del canal de secreción. Con el fin de testar esta hipótesis, se trató de obtener un complejo entre TrwD y el dominio relaxasa de TrwC que demostrase la interacción entre ambas proteínas y por otro lado se llevaron a cabo distintos ensayos con TrwC en ausencia o presencia de TrwD en la reacción. Si TrwC fuese el sustrato de TrwD, ésta podría ser desplegada por TrwD perdiendo por tanto las distintas actividades que presenta *in vitro*.

Se procedió a obtener un complejo entre TrwD y el dominio relaxasa de TrwC (TrwC1-293) mediante cromatografía de tamizado molecular. Como muestra la figura 4.38, TrwC(1-293) eluyó a 1,71 ml (volumen correspondiente con monómero según la calibración) (MW teórica 33 KDa) mientras que TrwD lo hizo a 1,58 ml (correspondiente con monómero). Tras incubar ambas proteínas en una relación molar de 1:1 y 3:1 no se observó la formación de un complejo de mayor peso molecular que eluyese a un volumen menor. Variando las condiciones de tiempo y temperatura de incubación así como el pH, se obtuvieron siempre cromatogramas similares al mostrado en la figura 4.38.

Capítulo 4 Resultados



Figura 4.38. Ensayo de interacción TrwD-TrwC(1-293) mediante tamizado molecular. Se inyectó por separado una muestra de TrwD (20 μM) y otra de TrwC(1-293) (20 μM) en una columna Superdex200 PC 3.2/30 previamente equilibrada en tampón 50 mM TrisHCl pH 7,2, 200 mM NaCl y 5 % glicerol (*cromatograma azul y rojo*, respectivamente). TrwD:TrwC(1-293) fueron incubadas en una relación equimolar de 1:1 y 3:1 en un tampón 50 mM TrisHCl pH 7,2 y 5 % glicerol durante 15 minutos a 37°C para ser posteriormente cargadas en la columna (*cromatograma verde y celeste*, respectivamente).

Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con un oligonucleótido marcado en su extremo 5' con fluoresceína. El oligo elegido se denomina 25+0 porque posee una secuencia capaz de formar un *hairpin* que reconoce TrwC, pero sin poseer la secuencia de corte (ver apartado 3.6.4.3 de Materiales y Métodos). Se realizaron retardos tanto para el dominio relaxasa (TrwC 1-293) como para TrwC entera (figuras 4.39 y 4.40, respectivamente). Se comprobó que TrwD no era capaz de retardar el oligo utilizado (10nM) a la concentración máxima ensayada (4 µM).



Figura 4.39. Retardos en gel con TrwC (1-293) sola o en presencia de TrwD. A. Retardo en un gel nativo al 5% de TrwC (1-293) (50-500 nM) con un oligo 25+0 (10 nM) marcado con fluoresceína en un tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 5 % glicerol (p/v) y 1 mM DTT. B. Retardo de TrwC (1-293) (500 nM) previamente incubada con TrwD, a las distintas relaciones molares que se indican en la parte superior, durante 15 minutos con el mismo oligo 25+0 (10 nM), 1 mM ATP y 2 mM acetato magnésico.



Figura 4.40. Retardos en gel con TrwC entera sola o en presencia de TrwD. A. Retardo en un gel nativo al 5% de TrwC (50-500 nM) con un oligo 25+0 (10 nM) marcado con fluoresceína en un tampón 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 5 % glicerol (p/v) y 1 mM DTT. B. Retardo de TrwC (500 nM) previamente incubada con TrwD, a las distintas relaciones molares que se indican en la parte superior, durante 15 minutos con el mismo oligo 25+0 (10 nM), 1 mM ATP y 10 μM acetato magnésico.

Las figuras 4.39 y 4.40 muestran que TrwD no tiene ningún efecto en la capacidad de TrwC de retardar el oligo específico. Ambos ensayos fueron llevados a cabo con concentraciones diferentes de magnesio (10 μ M o 2 mM Mg²⁺), obteniendo siempre el mismo resultado.

Al no observar ningún efecto de TrwD sobre los retardos, se decidió llevar a cabo ensayos de actividad de corte. Para ello, se incubó tanto el dominio relaxasa (TrwC 1-293) como TrwC con un oligo que contenía la secuencia de corte y marcado también con fluoresceína en su extremo 5'. Los detalles de esta reacción se describen en la sección de Materiales y Métodos en el apartado 3.6.4.4.

Una vez que se comprobó que la reacción funcionaba correctamente y se determinó la concentración necesaria para visualizar el corte, tanto para el dominio relasaxa como para TrwC entera (figura 4.41), se procedió a ensayar si TrwD podía estar afectando dicho proceso (figura 4.42). Para ello se incubaron ambas proteínas durante 15 minutos a 37°C en presencia de ATP y magnesio y posteriormente se llevó a cabo la reacción. El oligonucleótido 25+18 (43 nt), marcado en su extremo 5' con fluorescenína, tras ser reconocido por TrwC o TrwC (1-293) es cortado apareciendo una banda correspondiente al oligonucleótido procesado de 25 nucleótidos. Si TrwD desplegase a TrwC y/o a TrwC (1-293) esta reacción de corte podría verse afectada disminuyéndose de este modo la banda correspondiente de 25 nucleótidos.

Como refleja la figura 4.42, en las condiciones ensayadas, TrwD no tiene ningún efecto en la reacción de corte del dominio relaxasa ni en el de TrwC. Como control, el dominio relaxasa y TrwC fueron tratadas con SDS para comprobar que al desnaturalizar ambas proteínas no se observa dicha actividad de corte (figura 4.42).



Figura 4.41. Ensayo de actividad de corte de TrwC (1-293) y TrwC. Se analizó la actividad de corte de TrwC (1-293) (2-12 μ M) y TrwC (1-6 μ M) con un oligo (2,5 μ M) de 43 (25+18) nucleótidos marcado en su extremo 5' con fluoresceína. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 1 hora en presencia de 5 mM de MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6. Las muestras fueron tratadas con SDS (0,075%) y proteinasa K (1 mg/ml) a 37°C, 30 minutos y se corrieron en un gel al 20 % acrilamida y 8 M urea en tampón TBE durante 1 hora a 200V. Como marcador, se cargó en los carriles centrales, un oligo de 25 nucleótidos y otro de 43.



Figura 4.42. Ensayo de actividad de corte de TrwC (1-293) y TrwC en presencia de TrwD. Se analizaron las actividades de corte, en las mismas condiciones descritas en la figura anterior, de TrwC (1-293) (6 μ M) (carril 1) y TrwC (3 μ M) (carril 5). Se preincubó TrwC (1-293) (6 μ M) con TrwD (12 μ M) (carril 4). TrwC (3 μ M) se preincubó con TrwD (3 μ M) (carril 8). Como controles se añadió al ensayo de TrwC (1-293) o TrwC el volumen correspondiente del tampón de purificación de TrwD (carriles 2 y 6, respectivamente) o SDS (2%) (carriles 3 y 7, respectivamente).

4.7. Ensayos de actividad ATPasa de TrwD en presencia de otros componentes del T4SS

<u>TrwC</u>

Puesto que no conseguimos observar ningún efecto de TrwD sobre la actividad *in vitro* de TrwC ni TrwC(1-293) en las condiciones ensayadas, se procedió a la aproximación inversa. Se estudió el posible efecto de TrwC sobre la actividad ATPasa de TrwD. Para ello, se purificó un mutante de TrwC en el motivo de unión a nucleótidos Walker A: TrwC(K502T). En las condiciones ensayadas este mutante no presenta actividad ATPasa. Se probó incubando TrwD con TrwC(K502T) en un ratio molar 1:1 y 1:3 (figura 4.43) sin verse afectada la actividad ATPasa de TrwD en ninguna de las condiciones.



Figura 4.43. Actividad ATPasa de TrwD en presencia de TrwC(K502T). La actividad ATPasa de TrwD (1 μ M) (*en rojo*) se midió por el ensayo acoplado en un tampón 50mM Hepes pH 8,5, 75 mM AcK, 1 mM DTT, 5 mM ATP y 5 mM acetato magnésico. TrwD se incubó 15 minutos a 37°C en presencia de 1 o 3 μ M de TrwC(K502T) (*en verde* y *azul*, respectivamente). Como control se analizó la actividad de TrwC(K502T) (3 μ M) (*en negro*) y la actividad de TrwD en presencia del mismo volumen del tampón en el que se encuentra TrwC(K502T) (*en gris*).

Un estudio sobre VirE2 de *A. tumefaciens*, uno de los efectores más abundantes que protege el T-DNA de su degradación y media la incorporación del mismo al núcleo de la célula de la planta (Ward and Zambryski, 2001), mostró que los últimos 30 residuos de este efector son esenciales para

el reconocimiento del sustrato durante la transferencia del mismo (Vergunst *et al.*, 2000). Otro estudio diferente en VirF de *A. tumefaciens*, factor de virulencia que parece estar implicado en el proceso degradativo de proteínas de la célula huésped (Schrammeijer *et al.*, 2001), reveló la presencia de un motivo consenso caracterizado por la presencia de cargas positivas y un cierto grado de hidrofobicidad (Vergunst *et al.*, 2005). Estas dos características también se ha descrito en los motivos de la relaxasa MobA del plásmido movilizable RSF1010 (Vergunst *et al.*, 2005) y en efectores VirB/D4 de *B. hensalae* (Schulein et al., 2005). Así pues, viendo la importancia del extremo C-terminal en los efectores y/o relasaxas para su reconocimiento y traslocación por la maquinaria de secreción, se decidió ensayar la actividad ATPasa de TrwD tras ser incubada con un péptido sintético que comprendía los últimos 20 residuos de TrwC (TrwC₉₄₇₋₉₆₆). Se añadió dicho péptido hasta una concentración de 50 µM llegando a probar una relación molar de 1:50 sin verse afectada la actividad de TrwD en ningún caso (figura 4.44).

Recientemente, un estudio sobre la relaxasa Tral del plásmido R1 ha demostrado la existencia de secuencias de traslocación específicas (TS) situadas en regiones internas encontrándose ampliamente distribuidas entre las relaxasas de la familia MOB(F) y MOB(Q) (Lang *et al.*, 2010). Por comparación, también se han identificado otras dos regiones de traslocación específicas (TS1 y TS2) en TrwC (Alperi *et al.*, 2013). La región TS1 comprende los residuos 796-802 de TrwC mientras que la región TS2 los residuos 813-819. Mientras que la mutación del TS1 en TrwC afecta drásticamente la conjugación, mutaciones en cualquiera de los dos motivos tienen sólo un efecto parcial en la transferencia de ADN a través del T4SS VirB/D4 de *B. henselae*.

Gracias a la colaboración con el Dr. Gabriel Moncalián, se dispuso de una variante truncada purificada de TrwC, TrwC(408-966), la cual se comprobó que no presentaba actividad ATPasa en las condiciones ensayadas. Se ensayó dicha construcción con TrwD en una relación molar de 1:1 sin observarse ningún efecto sobre la actividad ATPasa de TrwD (figura 4.44).



Figura 4.44. Actividad ATPasa de TrwD en presencia de TrwC(408-966) y el péptido TrwC₉₄₇₋₉₆₆. Se midió la actividad ATPasa de TrwD (1 μ M) en un tampón 50 mM Hepes pH 8,5, 75 mM AcK, 1 mM DTT, 5 mM ATP y 5 mM acetato magnésico por el método Enzcheck. Se incubó TrwD (1 μ M) con 50 μ M del péptido TrwC(947-966) disuelto en 50 mM Pipes pH 7,0 y con 1 μ M TrwC(408-966) durante 15 min a 37°C.

<u>TrwK</u>

Tal y como se ha mencionado en el apartado 1.2.4.3 de la Introducción, estudios previos han demostrado que la ausencia de VirB11 o distintas mutaciones en la misma, afectan a la formación del *pilus* y por tanto la detección de VirB2 (pilina) en la fracción exocelular (Sagulenko *et al.*, 2001). Un trabajo posterior sugiere que VirB4 actúa dislocando la pilina de la MI al espacio periplásmico y VirB11 es importante en este proceso modulando dicha actividad (Kerr and Christie, 2010). Así pues, se planteó la posibilidad de que o TrwK o bien la pilina pudiesen ser los sustratos de TrwD estimulando la actividad ATPasa de la misma.

Por lo tanto, se estudió si la actividad ATPasa de TrwD podría verse estimulada en presencia de TrwK para poder inferir, de este modo, que TrwK es el sustrato de TrwD. Se usó el ensayo enzimático EnzCheck (ver apartado 3.6.4.1 de la sección Materiales y Métodos) comprobando que bajo las condiciones del ensayo TrwK no presentaba actividad. Como se observa en la figura 4.45, TrwD no ve estimulada su actividad ATPasa en presencia de TrwK en un ratio molar TrwD:TrwK de 1:1 o 1:2.



Figura 4.45. Actividad de TrwD en presencia de TrwK. Se midió la actividad ATPasa de TrwD (2 μ M) (*en rojo*) por el método EnzCheck, en un tampón 50mM Hepes pH 8,5, 75 mM AcK, 1 mM DTT, y 5 mM acetato magnésico. TrwD se incubó 15 minutos a 37°C en presencia de 2 o 4 μ M de TrwK (*gris y azul*, respectivamente). Como control, se midió la actividad de TrwK (4 μ M) (*verde*) en el tampón de actividad de TrwD y la actividad de TrwD en presencia del mismo volumen del tampón en el que se encuentra TrwK (*negra*).

Posteriormente se estudió el efecto a la inversa, es decir, si TrwK ve estimulada su actividad en presencia de TrwD. En este caso el método empleado fue un ensayo acoplado (apartado 3.6.4.1 de la sección Materiales y Métodos). Se usó tanto TrwK como el mutante TrwK(1-801), ya que este

mutante presenta una V_{max} 10 veces superior a la obtenida con TrwK salvaje (Pena et al., 2011) y, según nuestros estudios de cromatografía de afinidad, es capaz de interaccionar con TrwD (figura 4.23 panel D). En estos ensayos de actividad ATPasa de TrwK no fue necesario utilizar un mutante TrwD ya que, en las condiciones del ensayo de TrwK (pH 6.4), TrwD no presenta actividad. Como se observa en la figura 4.46 tanto TrwK como el mutante TrwK(1-801) no ven estimulada su actividad ATPasa en presencia de TrwD en una relación molar ensayada con TrwD de 1:2 y 1:6, respectivamente.



Figura 4.46. Actividad de TrwK y TrwK(1-801) en presencia de TrwD. Se midió la actividad ATPasa de TrwK (1 μ M) y TrwK(1-801) (0,18 μ M) (*en color rojo y naranja*, respectivamente) por el ensayo acoplado, en un tampón 50mM Pipes pH 6,45, 75 mM AcK, 1 mM DTT, y 10 mM acetato magnésico. Se incubó TrwK con TrwD en una relación molar de 1:2 durante 15 minutos a 37°C (*azul* marino) y TrwK(1-801) con TrwD en una relación molar de 1:6 (*azul celeste*). Como control, se midió la actividad de TrwD (2 μ M) (*negra*) en el tampón de ensayo de TrwK y la actividad de TrwK en presencia del mismo volumen del tampón en el que se encuentra TrwD (*gris*).

Pilina (TrwL)

Por otro lado, se probó el posible efecto de la pilina sobre la actividad de TrwD mediante el ensayo enzimático EnzCheck. Debido a la dificultad de sobre-expresar y purificar la pilina, por su elevado carácter hidrofóbico, se decidió ensayar la actividad ATPasa de TrwD con un péptido sintético que contenía los 19 últimos aminoácidos de TrwL (TrwL₉₄₋₁₁₂). Como muestra la figura 4.47, TrwD ve inhibida su actividad en presencia de dicho péptido mientras que otras ATPasas del sistema, como TrwK y TrwC, no veían afectada su actividad en presencia del mismo péptido. Estos resultados sugieren que TrwD es capaz de interaccionar con la pilina de forma específica, y que esta interacción afecta a su actividad enzimática.



Figura 4.47. Inhibición de la actividad ATPasa de TrwD por los 19 últimos aminoácidos de TrwL. Se incubó el péptido a distintas concentraciones (0-50 μ M), disuelto en DMSO, con TrwD (1 μ M) (*curva azul*), TrwC (0,1 μ M) (*curva roja*) o TrwK (3 μ M) (*curva morada*). Se midió la actividad ATPasa en tampón 50 mM Hepes pH 8,5, 75 mM AcK, 5 mM ATP, 10 μ M Mg2+ y 5 % glicerol (p/v) en el caso de TrwD, en el mismo tampón con 5 mM Mg²⁺ y 2.5 μ M b de ADN de cadena sencilla del fago M13 en el caso de TrwC y 50 mM Pipes pH 6,45, 75 mM AcK, 1 mM DTT, 5 mM ATP, 5 mM Mg²⁺ y 5 % glicerol (p/v) en el caso de TrwC. Se comprobó que la concentración final de DMSO en el ensayo (2 %) apenas afectaba a la actividad de las tres proteínas. En cualquier caso, se tomó como referencia para cada una de ellas, el valor de actividad a dicha concentración.

Sin embargo, dado el carácter hidrofóbico del péptido TrwL₉₄₋₁₁₂, la inhibición observada en la actividad de TrwD podría no ser específica y deberse a un efecto de agregación de TrwD causado por el péptido u a otras causas. Se decidió, por tanto, analizar la actividad ATPasa de TrwD en presencia de varios péptidos correspondientes a los últimos residuos de distintos homólogos de VirB2 (ver tabla 4.3).

Péptido	Secuencia	Grand average of
		hydropathicity (GRAVY)
TrwL (R388)_94-112	SIGVIIAGSAVQITAMLFT	1,737
TrwL (R388)_84-112	FIEKDTFVRWSIGVIIAGSAVQITAMLFT	1,045
VirB2 A. tumefaciens_ 102-121	GGIVIMFGASFLGKTLTGGG	1,060
TraM (pKM101)_77-97	VISLIGIGSASYLVSLTGVGS	1,510
TrwL7 B. quintana_86-105	AVGVIIAGSATQIATMLFSG	1,495
TrwK (R388)_802-823	GDDPAVWLPIFLDRVKAERSDV	-0,209
TrwC (R388)_947-966	PAHDRQKAAREAERGMEAGR	-1,705

Tabla 4.3. Péptidos ensayados en actividad ATPasa de TrwD. El índice GRAVY nos da una referencia del grado de hidrofobicidad. Un índice positivo corresponde a una proteína hidrofóbica y uno negativo a una hidrofílica.

Todos los péptidos correspondientes a homólogos de VirB2 ensayados inhibieron la actividad ATPasa de TrwD (datos no mostrados). A pesar de las diferencias en el índice GRAVY (tabla 4.3) el hecho de que todos los péptidos inhiban de una manera similar la actividad de TrwD podría indicar que este efecto no se deba sólo a un efecto de agregación de la proteína. Además, el alineamiento de distintas secuencias de pilinas, revela que es precisamente la última región C-terminal la que presenta una homología de secuencia (figura 4.48). Por esta razón, no se puede descartar la posibilidad de que no sea un reconocimiento específico.

TraM_pKM101 TrwL1_Bartonella_henselae TrwL1_Bartonella_quintana TrwL_R388 VirB2_Agrobacterium_tumefaciens VirB2_Brucella_suis VirB2_Bitsbiella_pneumoniae VirB2_Yersinia_pestis	1 MTTLFKK 1 MKRFNML 1 MKRSNMI 1 MATSILT 1 MRCFERY 1 MKLFSKV 1 MKLFSKV	10 PA KI RKTNMKNLN: RVHLNRLSR KKSLSRILP KKELISRAS- KELISRAS-	20 - A VVM- I AHNK AVRNR YLRAKANGK SN AVRN H LLL - A YVL - A YIL	30 T I A T \ I T A T \ L A A I F MVSGYAPSV 	40 - GVLS IAL /AAFT - VFLM /TAMI - VFLI - GAIA - AMLT /GAMGWS IFS ALIVS IAA APAMS - VF - A APAMS - VF - A	50 PQIALAA ITHPVYAQAQ - THPIYTQAQ - AQPAA - AQ - SGPAAAQSAG IEPNLAHANG ASPAFA - D - TSPAFA - D	60 GT - DTGEST GL - KNAGDV DL - TRVKTA GL - EKARSV G - GTDPATM G - LDKVNTS GF - SRANT I GF - SRANT I	A 37 L 45 L 45 L 54 IV 60 M 47 M 43 M 43
TraM_pKM101 TrwL1_Bartonella_henselae TrwL1_Bartonella_quintana TrwL_R388 VirB2_Agrobacterium_tumefaciens VirB2_Brucella_suis VirB2_Klebsiella_pneumoniae VirB2_Yersinia_pestis	70 38 TSIQTWL 46 KKLQTEL 46 ETFRDQ 55 ETLQQEL 61 NNICTFI 48 QKVLDL 44 EKVSSG 44 EKVSSG	80 STWIPIG-C. KAIIPIA-A. KTIIPVA-A. TTIVPIA-A. LGPFGQSLA' SGV-SITIV' HGLAAIT-I HGLAAIT-I	AIAIMVSCF AVILLCLAI ALILLCLAI VIGIVAIGI TIAIIWSGY TVAVIWIGY TVAVIWIGY	90 MWMLHV - I PA GYAGRY - I EH GYAGRY - I EH AYAGRF - I EH SWMFGR - ASL KMAFRHA - RF KTLWKGES - L KTLWKGES - L	100 ASFIPRIVIS (DTFVRWSVG (DTFIRWAIG (DTFVRWSIG GLVAGVVGG MDVVPVLGG .SQCGYIIG .SQCGYIIG	110 I I G I G SASYL VI I AG SAAE L VV I AG SAYQI I I I AG SAYQI I V I MFGASFL AL VVGAAE I G I L I GGGSE I	120 VSLTGVGS ANMLFKAN ATILFKAG TAMLFT GKTLTGGG ASYLLR GALLMS GALLMS	97 105 105 112 121 105 101 101

Figura 4.48. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de distintas pilinas. Alineamiento realizado mediante T-Coffee y representado por grado de conservación con JalView.

También se analizó mediante tamizado molecular el comportamiento de TrwD tras incubar la proteína con TrwL₉₄₋₁₁₂. La escasa señal de absorbancia que se observa en los cromatogramas de la proteína incubada con el péptido (figura 4.49), refleja una agregación de la misma, quedando retenida en el filtro de la columna. Este efecto de agregación no se observó al incubar sólo con DMSO (reactivo utilizado para solubilizar el péptido) o con el péptido correspondiente a los últimos residuos de TrwC, el cual presenta un porcentaje de hidrofobicidad menor.



Figura 4.49. Análisis de un posible complejo TrwD-TrwL₉₄₋₁₁₂ mediante tamizado molecular. Se cargó TrwD (46 μ M) en una columna S200 PC 3.2/30 previamente incubando con el péptido TrwL en relación 1:10 (*cromatograma verde*) y en la misma relación con 5mM ATP y 5 mM Mg²⁺ (*cromatograma morado*). Como control, se incubó con la misma concentración final de DMSO (*cromatograma rojo*).

Los miembros de la familia de proteínas VirB11 tienen una región hidrofóbica en su dominio NTD que parece estar implicada en interaccionar con la membrana (Machon *et al.*, 2002; Yeo *et al.*, 2000). Una explicación posible a los datos observados es que el carácter hidrofóbico de los péptidos empleados haga que éstos interaccionen con esta región, induciendo un cambio conformacional en TrwD que afecta a su solubilidad y a su actividad enzimática.

5.1. Regulación de la actividad de TrwD por magnesio: implicaciones en el mecanismo catalítico de la superfamilia de *traffic ATPases*

Las proteínas de la familia VirB11 pertenecen a una superfamilia de proteínas compuesta por ATPasas implicadas en el tráfico proteico durante la secreción bacteriana. Esta superfamilia incluye miembros que participan en la secreción bacteriana mediada por sistemas de Tipo II denominadas GspE (del inglés *general secretion pathway*) así como por proteínas que participan en el ensamblaje de pilus de Tipo IV (PiIT, PiIB) o del flagelo en archaea (Planet *et al.*, 2001). Esta clasificación estaba basada en comparaciones de homología secuencial y similitud estructural. Sin embargo, antes de comenzar este trabajo, no existían evidencias bioquímicas que demostrasen que, en efecto, las proteínas VirB11 pudieran desempeñar una labor regulatoria en el tráfico de proteínas durante la secreción mediada por Sistemas de Tipo IV. Para poder aportar evidencias en este sentido, se tomaron como referencia trabajos donde se estudiaba el mecanismo de regulación enzimática de la proteína SecA, una proteína esencial en el tráfico proteico mediado por el sistema Sec. En el momento de comenzar esta Tesis acababa de ser publicado un trabajo en el que se observaba que la actividad ATPasa de SecA era regulada por magnesio (Gold *et al.*, 2007), por lo que se procedió a estudiar si este mecanismo también estaba presente en TrwD, el homólogo de VirB11 en el plásmido conjugativo R388.

Trabajos previos realizados en el grupo del Dr. de la Cruz, demostraron que TrwD era capaz de hidrolizar ATP (Rivas *et al.*, 1997). Sin embargo, estos estudios fueron realizados con una proteína fusión GST-TrwD y la actividad caracterizada resultó ser muy baja. Por otro lado, la presencia de una cola GST podría inducir efectos artefactuales, ya que el tratamiento con el factor X_a para eliminar la GST (Nagai and Thogersen, 1984) no es cien por cien eficiente y, además, la proteína resultante de dicho corte posee cinco aminoácidos extras en su extremo N-terminal (GLPGN) con respecto a la proteína nativa. Por estos motivos, como punto de partida de esta Tesis, se decidió desarrollar un nuevo protocolo de purificación de TrwD en su forma nativa. De este modo, se evitaría cualquier posible efecto artefactual derivado de la adición de la cola de GST.

Una vez puesto a punto el protocolo de purificación, se procedió a caracterizar la actividad ATPasa mediante un ensayo acoplado regenerador de ATP (Kreuzer and Jongeneel, 1983). Mediante este método se evita, por un lado, que el sustrato de la reacción sea limitante y, por otro, que no exista inhibición por producto, ya que el ADP es reciclado constantemte a ATP por la piruvato quinasa. Con este nuevo protocolo de purificación y mediante dicho ensayo se obtuvo un valor de V_{max} de 78 nmol ATP / min mg, unas 15 veces superior al publicado anteriormente (Rivas *et al.*, 1997). Esta actividad es compatible con un trabajo publicado, durante el desarrollo de esta Tesis, para el homólogo TraJ en el plásmido pAC3249A en *Aeromonas veronii* (Rangrez *et al.*, 2010). La variación en la actividad observada con respecto al trabajo previo con GST-TrwD bien puede deberse a las diferencias en el protocolo de purificación o bien a las condiciones del ensayo. Así pues, en dicho trabajo previo, el pH escogido para determinar la V_{max} fue de 7,4, el cual no es el pH óptimo para medir la actividad de TrwD. El pH óptimo de actividad resultó ser en torno a 8,5-9, datos acordes con los publicados previamente para los homólogos HP0525 y TrbB (homólogos de VirB11 en *H. pylori* y en el plásmido RP4 respectivamente) (Krause *et al.*, 2000; Rivas *et al.*, 1997). Por otro lado, al igual que se ha observado en TrwK (Arechaga *et al.*, 2008), las sales de cloruro podrían influir

negativamente en la actividad registrada previamente con respecto a las sales de acetato que se han empleado durante las mediciones de actividad en esta Tesis.

En cuanto a la preferencia por nucleótidos, TrwD presenta los máximos valores de actividad en presencia de ATP y CTP mientras que con GTP y TTP su actividad desciende un 85 %. En el mismo trabajo previo con GST-TrwD se observó que la actividad con GTP como sustrato descendía un 70 % en comparación a la que presentaba con ATP (Rivas *et al.*, 1997). Proteínas pertenecientes a la familia de las VirB11 como son TraJ y HP0525, al igual que TrwD, también presentan mayores valores de actividad con ATP y CTP como sustrato (Krause *et al.*, 2000; Rangrez *et al.*, 2010). Además, esta aparente ausencia de predilección por un sustrato también se ha observado en PiIT, un miembro perteneciente al *pilus* tipo IV y a la superfamilia de las *traffic ATPases* (Herdendorf *et al.*, 2002).

Es común que las ATPasas del T2SS, pertenencientes a dicha superfamilia, así como SecA, una *traffic ATPase* ubicua perteneciente al sistema universal de traslocación Sec, presenten un comportamiento dual entre la forma soluble citoplasmática y la forma de membrana (Ahn and Kim, 1998; Camberg *et al.*, 2007; Lill *et al.*, 1990; Sandkvist *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha descrito que el magnesio actúa como un regulador alostérico de SecA ya que el efecto inhibitorio es independiente de la concentración de ATP. Dicho efecto se ve aliviado en presencia de lípidos de membrana (Gold *et al.*, 2007). Trabajos previos con TrwD han revelado que es una proteína capaz de interaccionar con liposomas (Machon *et al.*, 2002) y que su actividad ATPasa se estimula en presencia de fosfolípidos de membrana (Rivas *et al.*, 1997). Con estos antecedentes se quiso investigar si nos encontrábamos frente a un mismo mecanismo de regulación por efecto del magnesio.

En esta Tesis se ha podido demostrar que el magnesio también es capaz de regular la actividad ATPasa de TrwD independientemente de la concentración de ATP. En presencia de concentraciones fisiológicas de magnesio (1 mM en bacterias (Froschauer *et al.*, 2004) parámetros cinéticos como la V_{max} y la $K_{0,5}^{[ATP]}$ descendieron del orden de 3 y 5 veces, respectivamente, al comparar con concentraciones bajas de magnesio (10 μ M). En condiciones fisiológicas de magnesio la afinidad de TrwD por el producto (ADP) se incrementa del orden de 20 veces. Por otro lado, la concentración de magnesio no parece afectar ni a la constante de unión a nucleótido (K_d) ni al estado oligomérico de la proteína. Por todo ello, es posible pensar en un escenario donde el magnesio podría estabilizar a la enzima en un estado conformacional Mg.ADP, disminuyendo los ratios de actividad ATPasa y siendo esto compatible con un descenso en la $K_{0,5}^{[ATP]}$. El magnesio podría estar ejerciendo dicho efecto bien uniéndose al propio centro activo de la enzima o a otro sitio diferente, ejerciendo como regulador alostérico. Para discernir entre ambas posibilidades se procedió a un estudio más pormenorizado del efecto del magnesio sobre la unión de nucleótidos a TrwD.

Tanto los experimentos de fluorescencia con TNP-ATP como los experimentos de velocidad de sedimentación para ambas condiciones de magnesio, sugieren que el magnesio podría inducir algún tipo de cambio conformacional en la enzima. Sin embargo, para profundizar en este aspecto y poder corroborarlo, nos propusimos estudiar mediante proteólisis y dicroísmo circular el efecto que el magnesio y los nucleótidos podían tener sobre la conformación de la proteína. El patrón de desnaturalización térmica derivado de la pérdida de elipticidad medida en el dicrógrafo sugería que el magnesio libre, a concentraciones fisiológicas (1-2 mM), es capaz de inducir de forma cooperativa una conformación más rígida en la proteína. La adición de nucleótidos mantuvo la cooperatividad en la desnaturalización, estabilizando la conformación proteica.

Para corroborar la hipótesis de que concentraciones fisiológicas de magnesio inducen una conformación más rígida de la proteína, la cual pudiera ser responsable de la disminución en la actividad ATPasa de la enzima, se llevó a cabo un estudio en el que se mide la sensibilidad de TrwD a la digestión por papaína. Estos estudios mostraron que en presencia de magnesio y nucleótido la proteína era menos susceptible de ser digerida, lo que sugiere que ambos factores inducen una conformación más estable de la proteína, tal y como se había observado en los experimentos de desnaturalización térmica. La determinación de la secuencia N-terminal de los fragmentos obtenidos en la digestión por papaína reveló que el dominio C-terminal era menos susceptible al corte por papaína. Así pues, en presencia de magnesio y nucleótidos este sitio de corte se encuentra menos accesible, lo que parece indicar que se induce un cambio conformacional en el C-terminal que promueve una conformación más cerrada.

Las proteínas de la familia VirB11 se caracterizan por tener un dominio N-terminal (NTD) que, supuestamente, interacciona con la membrana (Machon et al., 2002; Yeo et al., 2000) y un dominio C-terminal (CTD), que contiene los motivos Walker A y Walker B. Ambos dominios están conectados por una región linker de extensión variable. El análisis estructural de los homólogos de VirB11 en B. suis y H. pylori reveló la existencia de un movimiento de pivotación del NTD sobre el CTD a través del linker, de una manera dependiente de nucleótido. Este gran cambio conformacional probablemente forma parte del mecanismo catalítico de la enzima (Hare et al., 2006). Por otro lado, el análisis estructural de GspE, el ortólogo de VirB11 en el sistema de secreción de Tipo II de A. fulgidus, y su comparación con los datos estructurales de HP0525, han permitido discernir un modelo de mecanismo catalítico que podría ser extrapolable para el resto de los miembros de la superfamilia de las traffic ATPasas (Savvides et al., 2003; Yamagata and Tainer, 2007). Los estudios llevados a cabo en esta Tesis han permitido caracterizar de manera más precisa este mecanismo enzimático, proporcionando un mecanismo de regulación por magnesio. Es importante señalar que la concentración de magnesio libre en el citoplama de E. coli es 1 mM (Froschauer et al., 2004) y, por tanto, los datos obtenidos bien pueden reflejar el hecho de que, en ausencia del sustrato a ser translocado, todas estas proteínas estarían reguladas de tal manera que garantizase un ahorro en el gasto energético. Con los datos estructurales antes señalados y los datos enzimáticos aquí reflejados es posible sugerir el siguiente modelo (figura 5.1).



Figura 5.1. Modelo de regulación catalítica por el magnesio en las ATPasas de la familia VirB11. Se propone un mecanismo catalítico para las proteínas homólogas a VirB11, adaptado de (Savvides *et al.*, 2003) y extrapolado para la superfamilia de ATPasas de secreción (Yamagata and Tainer, 2007) teniendo en consideración el efecto del magnesio. La forma *apo*, libre de nucleótido, sería flexible con el NTD (naranja) y el CTD (magenta/verde) en equilibrio entre la conformación abierta y cerrada (paso 1). El sitio de corte de la papaína que limita el extremo final del dominio C-terminal (verde) se señala con una flecha. A una alta concentración de magnesio (concentración fisiológica) se induciría un cambio conformacional (paso 2) que podría ir seguido de la unión de Mg•ATP (paso 3), que a su vez podría promover un cambio en el CTD (el sitio de corte por la papaína deja de ser accesible). Tras la hidrólisis de ATP, un estado inhibido Mg•ADP (paso 4) podría volverse estable y en consecuencia, ocurriría una ralentización en el ciclo catalítico. A partir de una señal específica (por ejemplo, unión o liberación de sustrato), el estado inhibido Mg•ADP podría desbloquearse y reanudar el ciclo con la liberación del ADP, volviendo a la forma inicial apo.

De acuerdo con este modelo, la enzima en su estado *apo*, libre de nucleótido, presentaría una flexibilidad entre su dominio NTD y CTD a través del *linker*. A concentraciones bajas de magnesio, menores a la constante de unión del magnesio por el ATP K_d ^[MgATP] = 20 μ M (Pecoraro *et al.*, 1984), la enzima podría unir ATP y Mg²⁺. Tras la hidrólisis de ATP y liberación de ADP, la enzima volvería a su estado *apo* inicial. Sin embargo, a concentraciones de 1 mM, la enzima estaría en una conformación cerrada impidiendo la liberación de ADP, lo que promovería en la enzima un estado inhibido Mg.ADP. Esto implicaría que bajo concentraciones fisiológicas de magnesio (Froschauer *et al.*, 2004), la enzima estaría regulada y sólo bajo cierta señal específica se podría liberar el ADP, completando así el ciclo catalítico. Dicha señal podría ser la unión o liberación de su sustrato todavía desconocido.
5.2. Interacciones de TrwD con otros miembros del T4SS

Un objetivo importante de esta Tesis era discernir el papel biológico que desempeña TrwD en la conjugación bacteriana. Estudios previos habían sugerido que VirB11 estaba impicada en los primeros pasos de la transferencia del sustrato al canal de secreción (Cascales and Christie, 2004) y, por otro lado, también se había propuesto que VirB11 era esencial en la biogénesis del pilus (Rabel *et al.*, 2003). Además, teniendo en cuenta su similitud estructural con las *traffic ATPases*, se había sugerido que las proteínas VirB11 podían jugar un papel como chaperona en el transporte de efectores a través del T4SS, usando la energía liberada de la hidrólisis de ATP para el ensamblaje/desensamblaje de los distintos componentes del sistema durante la biogénesis y/o para la traslocación de sustratos a través de la membrana (Yeo and Waksman, 2004). Este papel se deduce principalmente a través de análisis estructural y genómica comparativa, careciendo de soporte bioquímico. Así pues, uno de los propósitos de esta Tesis fue proporcionar evidencias bioquímicas que permitiesen esclarecer la función biológica llevada a cabo por TrwD y, por tanto, extrapolable a los miembros de la familia VirB11.

Durante el proceso conjugativo, las relaxasas, unidas covalentemente al ADN procesado, son secretadas a través del T4SS de la célula donadora a la célula receptora. Gran parte de las relaxasas, incluida TrwC, presentan un dominio extra C-terminal con distintas actividades (helicasa, primasa, recombinasa, etc) (Garcillan-Barcia et al., 2009) lo que hace que sean proteínas de un gran tamaño. Este hecho, sumado a las dimensiones del canal, hace plausible la hipótesis de que estas proteínas tienen que ser desplegadas antes de ser secretadas, en un proceso que podría llevar a cabo TrwD. Esta hipótesis se basa en la similitud estructural presente entre el homólogo HP0525 de H. pylori (Yeo et al., 2000) y la familia de chaperonas moleculares ClpB/Hsp104 (Lee et al., 2003), las cuales despliegan proteínas parcialmente plegadas que han quedado atrapadas en agregados moleculares (Doyle and Wickner, 2009). Éste es el motivo de que una parte de esta Tesis se haya centrado en probar si TrwC es el sustrato de TrwD y es desplegada por ésta en un proceso que requiere la energía proveniente de la hidrólisis de ATP. Como aproximación para demostrar esta hipótesis se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. En primer lugar se ensayó la actividad ATPasa de TrwD en presencia de un mutante de TrwC o de distintas construcciones de la misma. Como segunda aproximación, se estudiaron distintas actividades de TrwC (o su dominio relaxasa) para ver si eran afectadas por la presencia de TrwD. De este modo, si TrwC fuese el sustrato, podría estimular la actividad ATPasa de TrwD o bien TrwC podría perder su actividad de corte o de unión a ADN si previamente fuese desplegada por TrwD. En ninguna de las aproximaciones mencionadas, bajo las condiciones ensayadas, se pudo observar un efecto de una proteína sobre la otra. Así pues, parece poco probable que TrwC sea el sustrato de TrwD o que, en el caso de que TrwD participase en el desplegamiento de TrwC, fuera necesaria la colaboración de otras proteínas bien del plásmido conjugativo o de la bacteria donadora.

Durante el desarrollo de esta Tesis fue publicado un trabajo en *A. tumefaciens* donde se describe que la pilina VirB2 es dislocada de la MI al espacio periplásmico, siendo VirB4 y VirB11 proteínas importantes para que este proceso tenga lugar (Kerr and Christie, 2010). Nos planteamos si en nuestro sistema la pilina (TrwL) podría ser el sustrato de TrwD. Debido a la dificultad de sobreexpresar y purificar la pilina, los experimentos se diseñaron con un péptido sintético que contenía los últimos residuos de la misma. Se analizó el efecto de este péptido sobre la actividad ATPasa de TrwD así como sobre TrwK y TrwC. El hecho de que sólo la actividad de TrwD, en las

condiciones ensayadas, se vea afectada por la presencia del péptido, sugiere que TrwD está interaccionando específicamente con el mismo. Podría existir por tanto, alguna región en TrwD implicada en la interacción con el péptido, no presente en TrwK o TrwC. Esta región podría encontrarse en el NTD, dominio hidrofóbico por el cual se ha sugerido que los miembros de la familia VirB11 interaccionan con la membrana interna (Machon et al., 2002; Yeo et al., 2000). El mecanismo por el cual este péptido inhibe la actividad de TrwD es un aspecto que no está claro. Cabe la posibilidad de que el péptido pudiese interaccionar con TrwD afectando a la conformación de la misma o bien deberse a un simple efecto de agregación en la proteína. Esto último sería compatible con la observación de que distintos péptidos correspondientes a los últimos residuos de distintos homólogos de la pilina (todos ellos con un elevado índice GRAVY), tienen un efecto similar sobre la actividad de TrwD. Sin embargo, analizando en detalle la secuencia C-terminal de los mismos, se observa la existencia de una cierta homología, por lo que no se puede descartar que no exista un reconocimiento específico a nivel de secuencia. Además, se ha demostrado que un mutante de TrwD de R388 puede ser complementado por la proteína TrwD de Bartonella en conjugación (Ripoll-Rozada et al., 2013; Seubert et al., 2003) y cabe la posibilidad de que TraG de pKM101 pudiese complementar a TrwD en la biogénesis del pilus, puesto que se ha visto que es capaz de interaccionar con TrwK (Ripoll-Rozada et al., 2013). El hecho de que TrwD pueda interaccionar con este péptido de la pilina de alguna manera contradice resultados anteriores en los que, mediante ensayos de coinmunoprecipitación, no se pudo detectar una interacción directa entre VirB11 y VirB2 pero sí entre VirB4 y VirB2 (Kerr and Christie, 2010). En estos estudios se observó que la presencia de VirB4 era suficiente para dislocar las subunidades de pilina de la membrana interna y que VirB11 simplemente modulaba esta actividad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el hecho de que un anticuerpo anti-VirB2 no sea capaz de co-inmunoprecipitar a VirB11 no implica necesariamente que VirB11 no pueda interaccionar con la pilina en algún momento del proceso conjugativo. Por otra parte, el hecho de que no se observe un efecto del péptido de la pilina en la actividad de TrwK no excluye la posibilidad de que la pilina se una a una región de TrwK no necesaria para la hidrólisis del ATP.

El posible papel de VirB11 como modulador de la actividad dislocadora de VirB4 sobre la pilina sugiere una interacción entre ambas ATPasas, refrendada por ensayos de doble híbrido y coinmunoprecipitación (Atmakuri et al., 2004; Draper et al., 2006). Esta interacción era independiente de la presencia de VirD4 o de otras subunidades VirB (Atmakuri et al., 2004). Sin embargo, no existía ninguna evidencia directa que demostrase de forma inequívoca dicha interacción, por lo que se procedió a caracterizarla en nuestro sistema modelo, el plásmido conjugativo R388. En una primera aproximación se intentó obtener complejos TrwD-TrwK usando proteínas purificadas que eran incubadas conjuntamente y analizadas posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular. No se observó en ninguna de las condiciones probadas la formación de un complejo de mayor peso molecular por lo que, de existir interacción entre estas proteínas, el complejo no parece ser lo suficientemente estable. Una explicación podría deberse a la propia naturaleza de TrwD como traffic ATPase lo que hace más probable una interacción débil y transitoria entre ambas proteínas. Otra posible explicación podría ser la necesidad de tener a ambas proteínas en un estado hexamérico estabilizado para que dicha interacción tenga lugar. A este respecto, como se ha mostrado a lo largo de esta Tesis, el estado oligomérico es dependiente de la concentración, resultando muy difícil la obtención de una muestra monodispersa. Una tercera explicación podría ser la necesidad de la presencia de algún otro componente del T4SS. No sólo no se pudo obtener un complejo estable analizando mediante cromatografía de tamizado molecular sino que los experimentos de proteólisis y los ensayos de actividad ATPasa tampoco mostraron evidencias de una interacción in vitro.

En vista de los resultados obtenidos, se intentó utilizar otro tipo de aproximación. La coexpresión de las proteínas en distintos vectores compatibles seguida de una cromatografía de afinidad, permitió demostrar la interacción de TrwD con los otros dos motores moleculares de R388, TrwK y TrwB. El hecho de poder observar la interacción mediante este método y no otros, pone de manifiesto que se trata de una interacción débil y que ésta tiene carácter transitorio como cabe esperar para una ATPasa perteneciente a la familia de las *traffic ATPases*.

En nuestro sistema, la interacción TrwK-TrwD es independiente de la actividad ATPasa de estas proteínas, ya que mutantes en los motivos Walker A de ambas proteínas interaccionan con la misma eficiencia. Con el fin de localizar las posibles regiones de interacción, usamos en primer lugar, un mutante de TrwK cuyo dominio C-terminal estaba truncado. En un trabajo previo, se había descrito que este dominio C-terminal de TrwK, formado por las tres últimas α -hélices, tiene un papel regulador en la actividad de la proteína y se ha propuesto que es por esta región por donde podría interaccionar con otras proteínas específicas del sistema estimulando su actividad (Pena et al., 2011). Sin embargo, los resultados presentados en esta Tesis muestran que los mutantes carentes de la última o de las dos últimas α -hélices (TrwK(1-801) y TrwK(1-787), respectivamente) siguen interaccionando con TrwD con la misma eficiencia, indicando que esta región reguladora no está implicada en la interacción. Ensayos de doble híbrido en A. tumefaciens previos a esta Tesis, delimitaron la región comprendida entre los residuos 443-564 de VirB4 como la zona implicada en la interacción entre ambas proteínas (Draper et al., 2006). Sin embargo, en nuestro sistema, el mutante TrwK(1-375) sigue teniendo la capacidad de interaccionar con TrwD, aunque sí es cierto que lo hace de una manera más débil. Así pues, estos datos sugieren que no sólo la región central de TrwK estaría implicada en dicha interacción.

En un intento de delimitar la región de TrwD que interacciona con TrwK se co-expresaron con ésta variantes truncadas de TrwD correspondientes a los dominios NTD (residuos 1-121) y CTD (residuos 164-358) por separado y se observó que ambos constructos eran incapaces de interaccionar con TrwK. Ambos mutantes carecen de la región *linker* (residuos 122-163), lo que indica que la presencia de esta región es esencial para la interacción entre ambas proteínas.

Para profundizar en este aspecto, se seleccionaron distintos homólogos de VirB11 en función de las diferencias en la longitud de su linker y de su relación filogenética con TrwD. El modelado de TrwD de B. tribocorum y TraG de pKM101 reveló una topología de tipo VirB11 de B. suis con la región linker-B y las hélices α C2 y α J dispuestas a lo largo de la base del hexámero. Sin embargo, el modelado de TrbB de RP4, homólogo filogenéticamente más alejado y carente de esta región, resultó ser de tipo HP0525. Al estudiar la interacción con estos homólogos, sólo TrbB no fue capaz de interaccionar con TrwK. Este dato sugería de nuevo un papel esencial del linker en esta interacción. Esta superficie situada a lo largo de toda la base del anillo formada por el linker-B y las hélices α C2 y α J podría estar implicada directamente en la interacción con TrwK. Sin embargo, los resultados no implican necesariamente que esta región linker sea la región de interacción, ya que es posible que, dado su papel de pivote en las fluctuaciones conformacionales NTD/CTD, la ausencia del linker pueda impedir que TrbB adopte la conformación necesaria para la interacción con TrwK. De hecho, la comparación estructural entre VirB11 de B. suis y HP0525 de H. pylori (Hare et al., 2006) reveló que, aunque la organización hexámerica final era la misma, la disposición de los monómeros era muy diferente, debido precisamente a la longitud del linker. Las interacciones NTD/CTD en el hexámero de Brucella se dan entre monómeros adyacentes, ésto es con el NTD de un monómero interaccionando con el CTD del monómero vecino, mientras que en HP0525 estas interacciones son NTD-NTD, CTD-CTD. La consecuencia directa de esta diferencia es que el sitio de unión a nucleótidos en HP0525 se encuentra dentro del mismo monómero, mientras que en *Brucella* se encuentra en una región compartida entre dos monómeros. Otra consecuencia es que el ensamblaje del hexámero y la estabilidad de éste tengan dinámicas diferentes, por lo que es posible que la ausencia de la región *linker* afecte a la formación del hexámero y, en consecuencia, a la interacción con TrwK.

Tras comprobar que TrwD de R388 podía ser reemplazada por algunos homólogos sin afectar a la interacción con TrwK *in vitro*, se decidió ver el efecto de estas sustituciones *in vivo*. Mediante experimentos de complementación se observó que TraG de pKM101 no es capaz de complementar a un mutante de TrwD de R388 en conjugación, a pesar de ser capaz de interaccionar con TrwK *in vitro*. Este resultado sugiere que no sólo es necesaria la interacción de TrwD con TrwK sino que para que la transferencia del sustrato tenga lugar, al menos es necesaria la interacción de TrwD con otro componente del T4SS. Además, para ninguno de los homólogos ensayados se observó un efecto de dominancia negativa siendo este resultado compatible con la idea de que existen regiones específicas en TrwD, no presentes en TraG, implicadas en la interacción con otras proteínas del sistema. Otra posible explicación al hecho de que TraG no complemente a TrwD podría ser que la interacción observada TrwK-TraG no sea funcional. Para ello se intentó demostrar que la sustitución de TrwD por TraG no afectaba a la formación del *pilus*. Las dificultades experimentales encontradas, tanto para sobre-expresar la pilina, como para detectarla en el exterior de *E. coli* formando parte del *pilus*, no nos han permitido responder a esta cuestión. Los resultados obtenidos reflejaron la necesidad de una mejor aproximación para poder abordar esta cuestión.

Como se ha comentado anteriormente, en esta Tesis también se ha podido observar una interacción entre TrwD y la proteína acopladora TrwB siendo ésta una interacción más transitoria y menos estable que en el caso de la interacción TrwD-TrwK. La necesidad de una interacción muy específica entre TrwD y TrwB, esencial para que exista transferencia de sustrato, podría explicar que TrwD no pueda ser sustituída por su homólogo TraG de pKM101 en el proceso conjugativo, a pesar de que esta proteína interacciona con TrwK con la misma eficiencia que TrwD. Los experimentos de interacción TrwD-TrwB por cromatografía de afinidad también nos permitieron concluir que la actividad ATPasa de TrwD no es necesaria en esta interacción. Este dato confirma la observación previa en A. tumefaciens de que el motivo Walker A de las tres ATPasas no es necesario para la interacción de VirD4 con las otras dos ATPasas del sistema (Atmakuri et al., 2004). En un elegante trabajo de Cascales y colaboradores, mediante ensayos de inmunoprecipitación de DNA en A. tumefaciens (TrIP, "Transfer DNA inmunoprecipitation"), se ha descrito la ruta de secreción que sigue el ADN a lo largo de los distintos componentes del T4SS durante la transferencia de sustrato (Cascales and Christie, 2004). En él se define a la proteína acopladora VirD4 como la primera proteína del T4SS en interaccionar con el ADN y a VirB11 como la segunda proteína en contactar con el ADN durante la transferencia del sustrato. Se ha demostrado que la interacción entre estas proteínas es independiente de la presencia del resto de componentes del T4SS (Atmakuri et al., 2004). Así pues, todo parece indicar que la interacción entre TrwD y la proteína acopladora sea un requisito necesario para la transferencia de sustrato.

Con este mismo tipo de experimentos, hemos podido demostrar tanto la interacción de un complejo ternario TrwB-TrwK-TrwD como una interacción TrwB-TrwK. Esta última interacción es compatible con un trabajo previo donde se observó un efecto inhibitorio de TrwK sobre la actividad ATPasa dependiente de ADN de TrwB (Pena *et al.*, 2012). Además, también se ha visto interacción de PcfC con PrgJ (homólogos de VirD4 y VirB4) en Gram-positivos, concretamente en el plásmido pCF10 de *E. faecalis* (Li *et al.*, 2012).

5.3. TrwD: un posible interruptor molecular que regula la localización de TrwB y TrwK en la base del T4SS

Con toda la información procedente de distintos trabajos previos así como con los datos aportados en esta Tesis, podemos proponer un modelo donde TrwD actuaría como una traffic ATPase, regulando tanto la biogénesis del pilus como el transporte de ADN en los T4SSs a través de una interacción con TrwK y TrwB, respectivamente. Este doble papel concuerda con la existencia de ciertos mutantes de VirB11 en A. tumefaciens que presentan un desacoplamiento entre la translocación de sustrato y la producción de pilus (Sagulenko et al., 2001). Durante la biogénesis del pilus, VirB4 actuaría como un motor que disloca las subunidades de pilina desde la MI hacia el espacio periplásmico, mientras que VirB11 actuaría modulando la actividad dislocasa de VirB4 (Kerr and Christie, 2010). Por otro lado, en la transferencia de sustrato, VirB11 interaccionaría con la proteína acopladora VirD4 ayudando a ésta en la transferencia del complejo nucleoproteico. Cabe destacar la alta homología estructural que presenta la proteína acopladora TrwB con el dominio Cterminal de las proteínas de la familia VirB4 (Middleton et al., 2005; Pena et al., 2011; Wallden et al., 2012). Este hecho, sumado a que se ha observado una interacción entre ambas tanto en esta Tesis como en trabajos previos (Li et al., 2012; Pena et al., 2012), apoyan la hipótesis de que la familia de traffic ATPases VirB11 podría ayudar a intercambiar la posición de VirB4 por VirD4 en la base del canal. Este papel de interruptor molecular para los miembros de la familia de proteínas VirB11 se representa en la figura 5.2.



Figure 5.2. VirB11 actuando como interruptor molecular entre la biogénesis del *pilus* **y el transporte de sustrato.** (A) Durante la biogénesis del *pilus*, VirB4/TrwK (amarillo) se asocia a la membrana interna (MI), en la base del *core complex* (gris). VirB11/TrwD (verde) interacciona con VirB4/TrwK, modulando su actividad dislocasa sobre la pilina. Sucesivas reacciones de polimerización de los monómeros de pilina promoverían el crecimiento del *pilus*. (B) En la transferencia de sustrato, VirB11/TrwD ayudaría a VirD4/TrwB para la transferencia del complejo nucleoproteico. VirD4/TrwB (*salmón*) desplazaría a VirB4 de la base del canal, como sugiere la interacción entre homólogos de VirD4 y VirB4 en distintos sistemas conjugativos (Li *et al.*, 2012; Pena *et al.*, 2012)

5.4. Efecto inhibitorio de los ácidos grasos sobre la actividad ATPasa de TrwD

Como se ha visto en la Introducción, la conjugación es uno de los principales mecanismos para la transferencia horizontal de genes y para la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. La importancia clínica que tiene este hecho es de gran relevancia en la aparición de cepas multirresistentes a antibióticos. La actividad de los T4SS no sólo se asocia con la aparición de este tipo de cepas, sino también con una gran variedad de patologías entre las cuales se encuentran la legionelosis, brucelosis, tos ferina, úlcera gástrica, etc.

Así pues, la búsqueda de inhibidores de los sistemas conjugativos y/o patogénicos resulta un campo de estudio de gran interés. A este respecto muchas son las aproximaciones empleadas para la búsqueda de compuestos, diferentes a los antibióticos convencionales, que inhiban estos sistemas de secreción así como las dianas moleculares sobre las que actuar. Entre estos trabajos destacan los estudios de compuestos que inhiben la proliferación intracelular de *B. abortus* actuando a nivel de la proteína VirB8 impidiendo su dimerización (Paschos *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012). Otros estudios se centran en la búsqueda de compuestos inhibidores a nivel de la relaxasa, como es el caso de los bifosfonatos, capaces de inhibir la relaxasa del plásmido F (Lujan *et al.*, 2007). Por último, también existen trabajos donde se emplea el propio mecanismo de la conjugación para diseminar plásmidos diseñados con ciertas propiedades para ser letales en las células recipientes (lo que se conoce en inglés como *Bacterial Conjugation-Based Technologies* (BCBT)) (Filutowicz *et al.*, 2008).

Experimentos previos de nuestro laboratorio identificaron, dentro de una gran librería de compuestos, a los ácidos grasos insaturados como potenciales inhibidores de la conjugación (Fernandez-Lopez et al., 2005). In vivo, el ácido linoleico llegó a inhibir la conjugación de R388 del orden de unas 200 veces mientras que el ácido oleico la redujo del orden de unas 20 veces, 10 veces menos que el ácido linoleico. El ácido linoleico era capaz de inhibir plásmidos como R388 o F mientras que no afectaba a pKM101, R6K o RP4. Debido a esto, es muy probable que los ácidos grasos actúen a nivel de algún/os componentes de la maquinaria de conjugación. Además, la ausencia de efecto inhibitorio sobre la movilización del plásmido CloDF13 por parte del plásmido R388 sugiere que la principal diana/s de este compuesto pertenece a la maquinaria de transferencia y replicación de ADN (Dtr). Sin embargo, no se puede descartar que el ácido linoleico tuviera efecto sobre alguna ATPasa del T4SS. Las ATPasas asociadas a membrana que serían susceptibles de ser afectadas por estos ácidos grasos insaturados en el T4SS serían TrwB, TrwK y TrwD. La actividad ATPasa del dominio helicasa de TrwC también podría verse afectada. A este respecto, en una tesis previa a esta, se observó que la actividad de TrwD se veía inhibida por efecto estos ácidos grasos insaturados en lo que parecía ser una inhibición de tipo no competitivo (Machon, 2004). Puesto que en esta Tesis se ha puesto a punto un método de purificación que permite obtener unas actividades enzimáticas mayores, nos propusimos caracterizar la inhibición de TrwD con mayor detalle. Es más, teniendo en cuenta el efecto regulatorio del magnesio quisimos comprobar si la inhibición por ácido graso era dependiente de la presencia de este catión divalente.

En primer lugar comprobamos que los ácidos grasos saturados no afectan a la actividad ATPasa de TrwD a concentraciones donde el ácido linoleico y oleico inhiben completamente la actividad de TrwD. Estos datos concuerdan con los observados anteriormente (Machon, 2004). La

constante de inhibición aparente calculada para el ácido linoleico en el caso de TrwD fue en torno a 20-28 μ M dependiendo de si se hizo en presencia de 10 μ M o 1 mM de magnesio en el medio, respectivamente. Sorprendentemente, las cinéticas de inhibición en presencia de magnesio reflejaban un comportamiento diferente. A bajas concentraciones de magnesio la inhibición parece ser no competitiva, tal y como se había observado previamente (Machon, 2004). Sin embargo, a concentraciones fisiológicas de magnesio la inhibición parece presentar un comportamiento bimodal, reflejando que el cambio conformacional inducido por el magnesio, que favorece un estado Mg.ADP, afecta a la unión del ácido graso a la proteína.

En un ensayo *high-throughput* puesto a punto en el laboratorio del Dr. de la Cruz se ha detectado un compuesto que *in vivo* es mucho más efectivo inhibiendo la conjugación de diferentes plásmidos (entre ellos R388) (Getino M. datos no publicados). Este compuesto es también un ácido graso (ácido 2-Hexadecinoico, o 2-HDA) cuya característica principal es que contiene un triple enlace. Por tanto, nos propusimos ver si el 2-HDA inhibía también la actividad ATPasa de TrwD. En efecto, el 2-HDA es capaz de inhibir la actividad de TrwD. Sin embargo, no parece que existan diferencias *in vitro* entre el potencial inhibitorio del ácido linoleico y el 2-HDA, ya que a la misma concentración de compuesto la inhibición de la actividad fue la misma. Es posible que el 2-HDA presente unas mejores características que el ácido linoleico para atravesar la pared bacteriana y por ello, a la misma concentración externa, el efecto inhibitorio sea mayor, pero que una vez dentro de la célula la capacidad de inhibir a TrwD sea la misma.

Debido al gran problema presentado por los mecanismos de resistencia a antibióticos, en los últimos tiempos se han realizado grandes esfuerzos en encontrar alternativas a los antibióticos (Heuer *et al.*, 2006; Teuber, 2001). De hecho en los últimos 40 años apenas se han desarrollado tres nuevas clases antibióticos (lipopéptidos, oxalidinonas y estreptograminas), todos ellos dirigidos contra bacterias G+. Entre las alternativas a antibióticos desarrolladas últimamente (fagos, hidrolasas, etc.), el uso de péptidos, muchos de ellos producidos de forma natural en eucariotas como mecanismo de defensa a las infecciones (Boman, 2000; Lai and Gallo, 2009) ha adquirido un papel preponderante. Curiosamente, existen bacterias que producen péptidos (bacteriocinas) capaces de matar a otras bacterias (Klaenhammer, 1988), generalmente muy relacionadas filogenéticamente (Kirkup, 2006). En este sentido los datos obtenidos con los péptidos correspondientes a la región C-terminal de distintas pilinas son muy esperanzadores. El hecho de que estos péptidos sean capaces de inhibir de forma específica la actividad ATPasa de TrwD abre una nueva puerta para el desarrollo de inhibidores específicos de la conjugación.



6. Conclusiones

- 6.1. Concentraciones fisiológicas de magnesio inhiben la actividad enzimática de TrwD, sugiriendo que en ausencia de sustrato o de otros componentes del sistema, TrwD se encuentra en un estado reprimido Mg.ADP.
- 6.2. La caracterización enzimática ha permitido establecer un modelo catalítico que es extrapolable al resto de los miembros de la superfamilia de *traffic ATPases* implicados en secreción. Esta regulación enzimática inducida por magnesio es similar a la observada en otras *traffic ATPases*, tales como SecA.
- 6.3. TrwD interacciona con TrwK, una ATPasa implicada en la biogénesis del pilus en T4SS. La sustitución de TrwD por otros homólogos cercanos, tales como TrwD de *Bartonella* o TraG de pKM101 no afecta a la interacción con TrwK. Sin embargo, en dicha interacción, TrwD no puede ser reemplazada por TrbB de RP4, un ortólogo carente de la región *linker* que conecta los dominios N- y C-terminal.
- 6.4. TraG de pKM101, a pesar de unirse a TrwK con la misma eficiencia que TrwD, no es capaz de sustituir a TrwD en el proceso conjugativo, lo que sugiere que TrwD interacciona, además, de forma específica con otro componente del sistema.
- 6.5. TrwD también interacciona con TrwB, la proteína acopladora del sistema implicada en el transporte del sustrato. El hecho de que TrwD sea capaz de interaccionar tanto con TrwK como con TrwB corrobora que TrwD desempeña una función esencial en la biogénesis del *pilus* y en el transporte de sustrato.
- 6.6. TrwD es capaz de formar un complejo ternario con TrwK y TrwB. Este resultado, unido a los anteriores, sugiere que TrwD podría actuar como un interruptor molecular regulando la biogénesis del *pilus* y la transferencia de sustrato.
- 6.7. La actividad de TrwD es inhibida tanto por ácidos grasos insaturados como por péptidos de secuencia conservada correspondientes a la pilina y homólogos filogenéticamente relacionados. Estos resultados abren una nueva puerta para el desarrollo de inhibidores específicos de la conjugación.

BIBLIOGRAFÍA

<text><text><text><text><text>

- Abendroth, J., Murphy, P., Sandkvist, M., Bagdasarian, M., and Hol, W.G. (2005) The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of Vibrio cholerae. *J Mol Biol* **348**: 845-855.
- Achtman, M., Morelli, G., and Schwuchow, S. (1978) Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: role of F pili and fate of mating aggregates. *J Bacteriol* **135**: 1053-1061.
- Ahn, T., and Kim, H. (1998) Effects of nonlamellar-prone lipids on the ATPase activity of SecA bound to model membranes. *J Biol Chem* **273**: 21692-21698.
- Akeda, Y., and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.
- Alperi, A., Larrea, D., Fernandez-Gonzalez, E., Dehio, C., Zechner, E.L., and Llosa, M. (2013) A translocation motif in relaxase TrwC specifically affects recruitment by its conjugative Type IV Secretion System. *J Bacteriol*.
- Alvarez-Martinez, C.E., and Christie, P.J. (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808.
- Aly, K.A., and Baron, C. (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in Agrobacterium tumefaciens. *Microbiology* **153**: 3766-3775.
- Anderson, L.B., Hertzel, A.V., and Das, A. (1996) Agrobacterium tumefaciens VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8889-8894.
- Arechaga, I., Pena, A., Zunzunegui, S., del Carmen Fernandez-Alonso, M., Rivas, G., and de la Cruz, F.
 (2008) ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid
 R388 type IV secretion system. J Bacteriol 190: 5472-5479.
- Atmakuri, K., Cascales, E., and Christie, P.J. (2004) Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* **54**: 1199-1211.
- Aukema, K.G., Kron, E.M., Herdendorf, T.J., and Forest, K.T. (2005) Functional dissection of a conserved motif within the pilus retraction protein PilT. *J Bacteriol* **187**: 611-618.
- Avila, P., and de la Cruz, F. (1988) Physical and genetic map of the IncW plasmid R388. *Plasmid* **20**: 155-157.
- Backert, S., and Meyer, T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**: 207-217.
- Balakrishnan, L., Hughes, C., and Koronakis, V. (2001) Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by Escherichia coli. *J Mol Biol* **313**: 501-510.
- Ball, G., Chapon-Herve, V., Bleves, S., Michel, G., and Bally, M. (1999) Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **181**: 382-388.
- Batchelor, R.A., Pearson, B.M., Friis, L.M., Guerry, P., and Wells, J.M. (2004) Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different Campylobacter species. *Microbiology* **150**: 3507-3517.
- Bitter, W. (2003) Secretins of Pseudomonas aeruginosa: large holes in the outer membrane. Arch Microbiol **179**: 307-314.
- Bolland, S. (1991) Genes involved in production of plasmid R388 conjugative pilus. PhD Thesis, University of Cantabria, Spain.
- Boman, H.G. (2000) Innate immunity and the normal microflora. *Immunological Reviews* 173: 5-16.
- 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.

Bradley, D.E., and Cohen, D.R. (1976) Basic characterization of W-pili. J Gen Microbiol 97: 91-103.

Bradley, D.E., Taylor, D.E., and Cohen, D.R. (1980) Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **143**: 1466-1470.

- Brandon, L.D., Goehring, N., Janakiraman, A., Yan, A.W., Wu, T., Beckwith, J., and Goldberg, M.B. (2003) IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Mol Microbiol* **50**: 45-60.
- Buchan, D.W., Ward, S.M., Lobley, A.E., Nugent, T.C., Bryson, K., and Jones, D.T. (2010) Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Res* **38**: W563-568.
- Burns, D.L. (2003) Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 29-34.
- Burrows, L.L. (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* 57: 878-888.
- Cabezon, E., Sastre, J.I., and de la Cruz, F. (1997) Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet* **254**: 400-406.
- Cabezon, E., and de la Cruz, F. (2006) TrwB: an F(1)-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Res Microbiol* **157**: 299-305.
- Camberg, J.L., Johnson, T.L., Patrick, M., Abendroth, J., Hol, W.G., and Sandkvist, M. (2007) Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *Embo J* 26: 19-27.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**: 137-149.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2004a) Agrobacterium VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17228-17233.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2004b) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**: 1170-1173.
- Cascales, E., Atmakuri, K., Sarkar, M.K., and Christie, P.J. (2013) DNA Substrate-Induced Activation of the Agrobacterium VirB/VirD4 Type IV Secretion System. *J Bacteriol*.
- Cianciotto, N.P. (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**: 581-588.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. Nat Rev Microbiol 4: 811-825.
- Crowther, R.A., and Amos, L.A. (1971) Harmonic analysis of electron microscope images with rotational symmetry. *J Mol Biol* **60**: 123-130.
- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., and Waksman, G. (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* **462**: 1011-1015.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**: 451-485.
- de la Cruz, F., and Grinsted, J. (1982) Genetic and molecular characterization of Tn21, a multiple resistance transposon from R100.1. *J Bacteriol* **151**: 222-228.
- de la Cruz, F., Frost, L.S., Meyer, R.J., and Zechner, E.L. (2010) Conjugative DNA metabolism in Gramnegative bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **34**: 18-40.
- de Paz, H.D., Larrea, D., Zunzunegui, S., Dehio, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2010) Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. *J Bacteriol* **192**: 2655-2669.
- Deane, J.E., Abrusci, P., Johnson, S., and Lea, S.M. (2010) Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol Life Sci* 67: 1065-1075.
- Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1694**: 149-161.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., and Cornelis, G.R. Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *Embo J* **29**: 1928-1940.

- Doyle, S.M., and Wickner, S. (2009) Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci* **34**: 40-48.
- Draper, O., Cesar, C.E., Machon, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16385-16390.
- Draper, O., Middleton, R., Doucleff, M., and Zambryski, P.C. (2006) Topology of the VirB4 C terminus in the Agrobacterium tumefaciens VirB/D4 type IV secretion system. *J Biol Chem* **281**: 37628-37635.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J.N., and Filloux, A. (2003) Type II protein secretion in Pseudomonas aeruginosa: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* **185**: 2749-2758.
- Durand, E., Waksman, G., and Receveur-Brechot, V. (2011) Structural insights into the membraneextracted dimeric form of the ATPase TraB from the Escherichia coli pKM101 conjugation system. *BMC Struct Biol* **11**: 4.
- Economou, A., Christie, P.J., Fernandez, R.C., Palmer, T., Plano, G.V., and Pugsley, A.P. (2006) Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* **62**: 308-319.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E.M., Lurz, R., Kado, C.I., and Lanka, E. (1999) Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem* **274**: 22548-22555.
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lurz, R., and Lanka, E. (2000) Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic Dyad-like mechanism of leader peptidases. *J Bacteriol* **182**: 6751-6761.
- Fernandez-Lopez, R., Machon, C., Longshaw, C.M., Martin, S., Molin, S., Zechner, E.L., Espinosa, M., Lanka, E., and de la Cruz, F. (2005) Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation. *Microbiology* **151**: 3517-3526.
- Fernandez-Lopez, R., Garcillan-Barcia, M.P., Revilla, C., Lazaro, M., Vielva, L., and de la Cruz, F. (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942-966.
- Filutowicz, M., Burgess, R., Gamelli, R.L., Heinemann, J.A., Kurenbach, B., Rakowski, S.A., and Shankar, R. (2008) Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid* **60**: 38-44.
- Filloux, A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 163-179.
- Frank, A.C., Alsmark, C.M., Thollesson, M., and Andersson, S.G. (2005) Functional divergence and horizontal transfer of type IV secretion systems. *Mol Biol Evol* **22**: 1325-1336.
- Fronzes, R., Christie, P.J., and Waksman, G. (2009a) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**: 703-714.
- Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H.R., Orlova, E.V., and Waksman, G. (2009b) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**: 266-268.
- Froschauer, E.M., Kolisek, M., Dieterich, F., Schweigel, M., and Schweyen, R.J. (2004) Fluorescence measurements of free [Mg2+] by use of mag-fura 2 in Salmonella enterica. *FEMS Microbiol Lett* **237**: 49-55.
- Galan, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.
- Garcillan-Barcia, M.P., Francia, M.V., and de la Cruz, F. (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 657-687.
- Gold, V.A., Robson, A., Clarke, A.R., and Collinson, I. (2007) Allosteric regulation of SecA: magnesiummediated control of conformation and activity. *J Biol Chem* **282**: 17424-17432.

- Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., and Coll,
 M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase.
 Nature 409: 637-641.
- Gophna, U., Ron, E.Z., and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- Grahn, A.M., Haase, J., Bamford, D.H., and Lanka, E. (2000) Components of the RP4 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., Avila, P., Cayon, A., Hernando, M.A., Llosa, M., and de la Cruz, F. (2000) Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **295**: 1163-1172.
- 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.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425-449.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and highlevel expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J Bacteriol 177: 4121-4130.
- Haag, M., Vermeulen, F., Magada, O., and Kruger, M.C. (1999) Polyunsaturated fatty acids inhibit Mg2+ -ATPase in basolateral membranes from rat enterocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **61**: 25-27.
- Haase, J., and Lanka, E. (1997) A specific protease encoded by the conjugative DNA transfer systems of IncP and Ti plasmids is essential for pilus synthesis. *J Bacteriol* **179**: 5728-5735.
- Hall, R.M. (1987) Pkm101 Is an Is46-Promoted Deletion of R46. *Nucleic Acids Research* **15**: 5479-5479.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hare, S., Bayliss, R., Baron, C., and Waksman, G. (2006) A large domain swap in the VirB11 ATPase of Brucella suis leaves the hexameric assembly intact. *J Mol Biol* **360**: 56-66.
- Hatori, Y., Majima, E., Tsuda, T., and Toyoshima, C. (2007) Domain organization and movements in heavy metal ion pumps: papain digestion of CopA, a Cu+-transporting ATPase. *J Biol Chem* **282**: 25213-25221.
- Henderson, I.R., and Nataro, J.P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**: 1231-1243.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Herdendorf, T.J., McCaslin, D.R., and Forest, K.T. (2002) Aquifex aeolicus PilT, homologue of a surface motility protein, is a thermostable oligomeric NTPase. *J Bacteriol* **184**: 6465-6471.
- Heuer, O.E., Hammerum, A.M., Collignon, P., and Wegener, H.C. (2006) Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clinical Infectious Diseases* **43**: 911-916.
- Hiratsuka, T., and Uchida, K. (1973) Preparation and properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate, an analog of adenosine triphosphate. *Biochim Biophys Acta* **320**: 635-647.
- Holland, I.B., Schmitt, L., and Young, J. (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**: 29-39.

- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**: 306-313.
- Jakovljevic, V., Leonardy, S., Hoppert, M., and Sogaard-Andersen, L. (2008) PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in Myxococcus xanthus. *J Bacteriol* **190**: 2411-2421.
- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V., and Christie, P.J. (2003) Agrobacterium tumefaciens VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J Bacteriol* **185**: 2867-2878.
- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E., and Christie, P.J. (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.
- Jakubowski, S.J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V., and Christie, P.J. (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.
- Jezewska, M.J., Lucius, A.L., and Bujalowski, W. (2005) Binding of six nucleotide cofactors to the hexameric helicase RepA protein of plasmid RSF1010. 2. Base specificity, nucleotide structure, magnesium, and salt effect on the cooperative binding of the cofactors. *Biochemistry* **44**: 3877-3890.
- Ji, X., von Rosenvinge, E.C., Johnson, W.W., Tomarev, S.I., Piatigorsky, J., Armstrong, R.N., and Gilliland, G.L. (1995) Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry* **34**: 5317-5328.
- Jin, Y.M., Lin, J.J., Zhang, L., Fu, Z.Q., Wu, X.F., Zhou, Y.C., and Cai, Y.M. (2002) [Cloning and expression of 21.7 kD protein gene of Schistosoma japonicum (Chinese strain)]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **18**: 698-702.
- Judd, P.K., Kumar, R.B., and Das, A. (2005) Spatial location and requirements for the assembly of the Agrobacterium tumefaciens type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11498-11503.
- Kalkum, M., Eisenbrandt, R., Lurz, R., and Lanka, E. (2002) Tying rings for sex. *Trends Microbiol* **10**: 382-387.
- Karzai, A.W., and McMacken, R. (1996) A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *J Biol Chem* **271**: 11236-11246.
- Kerr, J.E. (2010) Characterization of the Agrobacterium tumefaciens VirB2 pilin of the VirB/D4 Type IV Secretion System.
- Kerr, J.E., and Christie, P.J. (2010) Evidence for VirB4-mediated dislocation of membrane-integrated VirB2 pilin during biogenesis of the Agrobacterium VirB/VirD4 type IV secretion system. J Bacteriol 192: 4923-4934.
- Kirkup, B.C. (2006) Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: Theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Current Medicinal Chemistry* **13**: 3335-3350.
- Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of Lactic-Acid Bacteria. *Biochimie* **70**: 337-349.
- Kohonen, T. (1990) Cortical maps. Nature 346: 24.
- Koronakis, V., Hughes, C., and Koronakis, E. (1991) Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both Escherichia coli membranes. *Embo J* **10**: 3263-3272.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein ToIC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**: 914-919.

- Korotkov, K.V., Sandkvist, M., and Hol, W.G. (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* **10**: 336-351.
- Krause, S., Barcena, M., Pansegrau, W., Lurz, R., Carazo, J.M., and Lanka, E. (2000a) Sequencerelated 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., Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F., and Lanka, E. (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.
- Kreuzer, K.N., and Jongeneel, C.V. (1983) Escherichia coli phage T4 topoisomerase. *Methods Enzymol* **100**: 144-160.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., and Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Lai, E.M., and Kado, C.I. (1998) Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* **180**: 2711-2717.
- Lai, E.M., Chesnokova, O., Banta, L.M., and Kado, C.I. (2000) Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol* **182**: 3705-3716.
- Lai, Y.P., and Gallo, R.L. (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* **30**: 131-141.
- Lang, S., Gruber, K., Mihajlovic, S., Arnold, R., Gruber, C.J., Steinlechner, S., Jehl, M.A., Rattei, T., Frohlich, K.U., and Zechner, E.L. (2010) Molecular recognition determinants for type IV secretion of diverse families of conjugative relaxases. *Mol Microbiol* **78**: 1539-1555.
- Lee, S., Sowa, M.E., Watanabe, Y.H., Sigler, P.B., Chiu, W., Yoshida, M., and Tsai, F.T. (2003) The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **115**: 229-240.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., and Mekalanos, J.J. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4154-4159.
- Letoffe, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1996) Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *Embo J* **15**: 5804-5811.
- Li, F., Alvarez-Martinez, C., Chen, Y., Choi, K.J., Yeo, H.J., and Christie, P.J. (2012) Enterococcus faecalis PrgJ, a VirB4-like ATPase, mediates pCF10 conjugative transfer through substrate binding. *J Bacteriol* **194**: 4041-4051.
- Lill, R., Dowhan, W., and Wickner, W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60**: 271-280.
- Lu, J., and Frost, L.S. (2005) Mutations in the C-terminal region of TraM provide evidence for in vivo TraM-TraD interactions during F-plasmid conjugation. *J Bacteriol* **187**: 4767-4773.
- Lu, J., Wong, J.J., Edwards, R.A., Manchak, J., Frost, L.S., and Glover, J.N. (2008) Structural basis of specific TraD-TraM recognition during F plasmid-mediated bacterial conjugation. *Mol Microbiol* **70**: 89-99.

- Lujan, S.A., Guogas, L.M., Ragonese, H., Matson, S.W., and Redinbo, M.R. (2007) Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12282-12287.
- 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.
- Machon, C., Rivas, S., Albert, A., Goni, F.M., and de la Cruz, F. (2002) TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by plasmid R388, induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles. *J Bacteriol* **184**: 1661-1668.
- Machon, C. (2004) Caracterización genética y bioquímica de la proteína TrwD.
- Majdalani, N., and Ippen-Ihler, K. (1996) Membrane insertion of the F-pilin subunit is Sec independent but requires leader peptidase B and the proton motive force. *J Bacteriol* **178**: 3742-3747.
- Marabini, R., and Carazo, J.M. (1994) Pattern recognition and classification of images of biological macromolecules using artificial neural networks. *Biophys J* **66**: 1804-1814.
- Marabini, R., Masegosa, I.M., San Martin, M.C., Marco, S., Fernandez, J.J., de la Fraga, L.G., Vaquerizo, C., and Carazo, J.M. (1996) Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol* **116**: 237-240.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galan, J.E., and Unger, V.M. (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**: 1040-1042.
- Maru, Y., Afar, D.E., Witte, O.N., and Shibuya, M. (1996) The dimerization property of glutathione Stransferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain. *J Biol Chem* **271**: 15353-15357.
- Matilla, I., Alfonso, C., Rivas, G., Bolt, E.L., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (2010) The conjugative DNA translocase TrwB is a structure-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem* **285**: 17537-17544.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. (2007) New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends in Microbiology* **15**: 508-515.
- Middleton, R., Sjolander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J., and Zambryski, P. (2005) Predicted hexameric structure of the Agrobacterium VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1685-1690.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (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.
- Misic, A.M., Satyshur, K.A., and Forest, K.T. (2010) P. aeruginosa PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor. *J Mol Biol* **400**: 1011-1021.
- Moncalian, G., and de la Cruz, F. (2004) DNA binding properties of protein TrwA, a possible structural variant of the Arc repressor superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1701**: 15-23.
- Moore, D., Hamilton, C.M., Maneewannakul, K., Mintz, Y., Frost, L.S., and Ippen-Ihler, K. (1993) The Escherichia coli K-12 F plasmid gene traX is required for acetylation of F pilin. *J Bacteriol* **175**: 1375-1383.
- Mota, L.J., and Cornelis, G.R. (2005) The bacterial injection kit: Type III secretion systems. *Annals of Medicine* **37**: 234-249.
- Nagai, K., and Thogersen, H.C. (1984) Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in Escherichia coli. *Nature* **309**: 810-812.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**: 205-217.

- Nunn, D.N., and Lory, S. (1991) Product of the Pseudomonas-Aeruginosa Gene Pild Is a Prepilin Leader Peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 3281-3285.
- Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R., and Henderson, I.R. (2003) Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**: 519-527.
- Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., Helinski, D.R., Schwab, H.,
 Stanisich, V.A., and Thomas, C.M. (1994) Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J Mol Biol* 239: 623-663.
- Parker, M.W., Lo Bello, M., and Federici, G. (1990) Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. *J Mol Biol* **213**: 221-222.
- Paschos, A., den Hartigh, A., Smith, M.A., Atluri, V.L., Sivanesan, D., Tsolis, R.M., and Baron, C. (2011) An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of Brucella abortus 2308 proliferation. *Infect Immun* **79**: 1033-1043.
- Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D.F., and Hughes, K.T. (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**: 489-492.
- Pecoraro, V.L., Hermes, J.D., and Cleland, W.W. (1984) Stability constants of Mg2+ and Cd2+ complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of MgATP and MgADP. *Biochemistry* **23**: 5262-5271.
- Pena, A., Ripoll-Rozada, J., Zunzunegui, S., Cabezon, E., de la Cruz, F., and Arechaga, I. (2011) Autoinhibitory regulation of TrwK, an essential VirB4 ATPase in type IV secretion systems. *J Biol Chem* **286**: 17376-17382.
- Pena, A. (2012) Caracterización bioquímica y estructural de TrwK, un motor molecular implicado en la secreción bacteriana.
- Pena, A., Matilla, I., Martin-Benito, J., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., de la Cruz, F., Cabezon, E., and Arechaga, I. (2012) The hexameric structure of a conjugative VirB4 protein ATPase provides new insights for a functional and phylogenetic relationship with DNA translocases. *J Biol Chem* **287**: 39925-39932.
- Planet, P.J., Kachlany, S.C., DeSalle, R., and Figurski, D.H. (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.
- Pugsley, A.P., Kornacker, M.G., and Poquet, I. (1991) The general protein-export pathway is directly required for extracellular pullulanase secretion in Escherichia coli K12. *Mol Microbiol* **5**: 343-352.
- Pugsley, A.P., and Dupuy, B. (1992) An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of Klebsiella oxytoca. *Mol Microbiol* **6**: 751-760.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15508-15513.
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001) An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep* **2**: 244-248.
- Rabel, C., Grahn, A.M., Lurz, R., and Lanka, E. (2003) The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *J Bacteriol* **185**: 1045-1058.
- Rangrez, A.Y., Abajy, M.Y., Keller, W., Shouche, Y., and Grohmann, E. (2010) Biochemical characterization of three putative ATPases from a new type IV secretion system of Aeromonas veronii plasmid pAC3249A. *BMC Biochem* **11**: 10.

- Rashkova, S., Spudich, G.M., and Christie, P.J. (1997) Characterization of membrane and protein interaction determinants of the Agrobacterium tumefaciens VirB11 ATPase. *J Bacteriol* **179**: 583-591.
- Rashkova, S., Zhou, X.R., Chen, J., and Christie, P.J. (2000) Self-assembly of the Agrobacterium tumefaciens VirB11 traffic ATPase. *J Bacteriol* **182**: 4137-4145.
- Records, A.R. (2011) The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 751-757.
- Rego, A.T., Chandran, V., and Waksman, G. (2010) Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J* **425**: 475-488.
- Reichow, S.L., Korotkov, K.V., Hol, W.G., and Gonen, T. (2010) Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1226-1232.
- Ripoll-Rozada, J., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., Arechaga, I., and Cabezon, E. (2013) Functional Interactions of VirB11 Traffic ATPases with VirB4 and VirD4 Molecular Motors in Type IV Secretion Systems. *J Bacteriol* **195**: 4195-4201.
- Rivas, S., Bolland, S., Cabezon, E., Goni, F.M., and de la Cruz, F. (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.
- Rivera-Calzada, A., Fronzes, R., Savva, C.G., Chandran, V., Lian, P.W., Laeremans, T., Pardon, E., Steyaert, J., Remaut, H., Waksman, G., and Orlova, E.V. (2013) Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *Embo J*.
- Robien, M.A., Krumm, B.E., Sandkvist, M., and Hol, W.G. (2003) Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of Vibrio cholerae. *J Mol Biol* **333**: 657-674.
- Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H., and Goldberg,
 A.L. (1996) HsIV-HsIU: A novel ATP-dependent protease complex in Escherichia coli related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5808-5813.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., and Christie, P.J. (2001) Role of Agrobacterium VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol* **183**: 5813-5825.
- Saier, M.H., Jr. (2004) Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol* **12**: 113-115.
- Sakai, D., Horiuchi, T., and Komano, T. (2001) Atpase activity and multimer formation of Pilq protein are required for thin pilus biogenesis in plasmid R64. *J Biol Chem* **276**: 17968-17975.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis (1989) Molecular Clonning: a Laboratory Manual, 2nd Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S.P., and DiRita, V.J. (1995) Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in Vibrio cholerae. *Embo J* **14**: 1664-1673.
- Sandkvist, M. (2001) Type II secretion and pathogenesis. Infection and Immunity 69: 3523-3535.
- Sandler, S.J., and Clark, A.J. (1990) Factors affecting expression of the recF gene of Escherichia coli K-12. *Gene* **86**: 35-43.
- Sarkar, G., and Sommer, S.S. (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

- Satyshur, K.A., Worzalla, G.A., Meyer, L.S., Heiniger, E.K., Aukema, K.G., Misic, A.M., and Forest, K.T. (2007) Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Structure* **15**: 363-376.
- Savvides, S.N., Yeo, H.J., Beck, M.R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R., and Waksman, G. (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *Embo J* 22: 1969-1980.
- Savvides, S.N. (2007) Secretion superfamily ATPases swing big. *Structure* **15**: 255-257.
- Scheres, S.H., Valle, M., Nunez, R., Sorzano, C.O., Marabini, R., Herman, G.T., and Carazo, J.M. (2005) Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. *J Mol Biol* **348**: 139-149.
- Scheres, S.H., Nunez-Ramirez, R., Sorzano, C.O., Carazo, J.M., and Marabini, R. (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat Protoc* **3**: 977-990.
- Schraidt, O., and Marlovits, T.C. (2011) Three-dimensional model of Salmonella's needle complex at subnanometer resolution. *Science* **331**: 1192-1195.
- Schrammeijer, B., Risseeuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J., Crosby, W.L., and Hooykaas,
 P.J. (2001) Interaction of the virulence protein VirF of Agrobacterium tumefaciens with plant
 homologs of the yeast Skp1 protein. *Curr Biol* **11**: 258-262.
- Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**: 1606-1619.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C., Carena, I., and Dehio, C. (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.
- Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F., and Dehio, C. (2003) A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**: 1253-1266.
- Shiue, S.J., Kao, K.M., Leu, W.M., Chen, L.Y., Chan, N.L., and Hu, N.T. (2006) XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL. *Embo J* **25**: 1426-1435.
- Silverman, J.M., Brunet, Y.R., Cascales, E., and Mougous, J.D. (2012) Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu Rev Microbiol* **66**: 453-472.
- Sivanesan, D., Hancock, M.A., Villamil Giraldo, A.M., and Baron, C. (2010) Quantitative analysis of VirB8-VirB9-VirB10 interactions provides a dynamic model of type IV secretion system core complex assembly. *Biochemistry* 49: 4483-4493.
- Skerker, J.M., and Berg, H.C. (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6901-6904.
- Smith, M.A., Coincon, M., Paschos, A., Jolicoeur, B., Lavallee, P., Sygusch, J., and Baron, C. (2012) Identification of the binding site of Brucella VirB8 interaction inhibitors. *Chem Biol* **19**: 1041-1048.
- Sorg, I., Wagner, S., Amstutz, M., Muller, S.A., Broz, P., Lussi, Y., Engel, A., and Cornelis, G.R. (2007) YscU recognizes translocators as export substrates of the Yersinia injectisome. *Embo J* 26: 3015-3024.
- Spudich, G.M., Fernandez, D., Zhou, X.R., and Christie, P.J. (1996) Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the Agrobacterium tumefaciens T-complex transport apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7512-7517.
- Stephens, K.M., Roush, C., and Nester, E. (1995) Agrobacterium tumefaciens VirB11 protein requires a consensus nucleotide-binding site for function in virulence. *J Bacteriol* **177**: 27-36.

- Stewart, R.C., VanBruggen, R., Ellefson, D.D., and Wolfe, A.J. (1998) TNP-ATP and TNP-ADP as probes of the nucleotide binding site of CheA, the histidine protein kinase in the chemotaxis signal transduction pathway of Escherichia coli. *Biochemistry* **37**: 12269-12279.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Surana, N.K., Cutter, D., Barenkamp, S.J., and St Geme, J.W., 3rd (2004) The Haemophilus influenzae Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **279**: 14679-14685.
- Surana, N.K., Buscher, A.Z., Hardy, G.G., Grass, S., Kehl-Fie, T., and St Geme, J.W., 3rd (2006) Translocator proteins in the two-partner secretion family have multiple domains. *J Biol Chem* **281**: 18051-18058.
- Swarts, H.G., Schuurmans Stekhoven, F.M., and De Pont, J.J. (1990) Binding of unsaturated fatty acids to Na+, K(+)-ATPase leading to inhibition and inactivation. *Biochim Biophys Acta* **1024**: 32-40.
- Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2003) Structural definition on the surface of Helicobacter pylori type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* **5**: 395-404.
- Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (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., Matilla, I., Arechaga, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (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.
- Taussky, H.H., and Shorr, E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* **202**: 675-685.
- Terradot, L., Bayliss, R., Oomen, C., Leonard, G.A., Baron, C., and Waksman, G. (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.
- Teuber, M. (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **4**: 493-499.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (1998) Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J* **17**: 6487-6496.
- Thanassi, D.G., and Hultgren, S.J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 420-430.
- Vecino, A.J., Segura, R.L., Ugarte-Uribe, B., Aguila, S., Hormaeche, I., de la Cruz, F., Goni, F.M., and Alkorta, I. (2010) Reconstitution in liposome bilayers enhances nucleotide binding affinity and ATP-specificity of TrwB conjugative coupling protein. *Biochim Biophys Acta* **1798**: 2160-2169.
- Vecino, A.J., de la Arada, I., Segura, R.L., Goni, F.M., de la Cruz, F., Arrondo, J.L., and Alkorta, I. (2011) Membrane insertion stabilizes the structure of TrwB, the R388 conjugative plasmid coupling protein. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 1032-1039.
- Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J., and Hooykaas, P.J. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from Agrobacterium into plant cells. *Science* **290**: 979-982.
- Vergunst, A.C., van Lier, M.C., den Dulk-Ras, A., Stuve, T.A., Ouwehand, A., and Hooykaas, P.J. (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4translocated proteins of Agrobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 832-837.

- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A. (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* 20: 6735-6741.
- Waksman, G., and Fronzes, R. (2010) Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends Biochem Sci* **35**: 691-698.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., and Waksman, G. (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* **12**: 1203-1212.
- Wallden, K., Williams, R., Yan, J., Lian, P.W., Wang, L., Thalassinos, K., Orlova, E.V., and Waksman, G.
 (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.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology* **58**: 611-647.
- Wang, J. (2004) Nucleotide-dependent domain motions within rings of the RecA/AAA(+) superfamily. *J Struct Biol* **148**: 259-267.
- Ward, D.V., and Zambryski, P.C. (2001) The six functions of Agrobacterium VirE2. *Proc Natl Acad Sci* USA 98: 385-386.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189-1191.
- Waters, V.L. (1999) Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci* **4**: D433-456.
- Weber, J., and Senior, A.E. (1996) Binding and hydrolysis of TNP-ATP by Escherichia coli F1-ATPase. *J Biol Chem* **271**: 3474-3477.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J., and Trulzsch, K. (2004) Yersinia enterocolitica type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun* 72: 4004-4009.
- Yamagata, A., and Tainer, J.A. (2007) Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism. *Embo J* **26**: 878-890.
- Yen, M.R., Tseng, Y.H., Simic, P., Sahm, H., Eggeling, L., and Saier, M.H., Jr. (2002) The ubiquitous ThrE family of putative transmembrane amino acid efflux transporters. *Res Microbiol* 153: 19-25.
- Yeo, H.J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E., and Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Mol Cell* 6: 1461-1472.
- Yeo, H.J., Yuan, Q., Beck, M.R., Baron, C., and Waksman, G. (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., and Waksman, G. (2004) Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. J Bacteriol **186**: 1919-1926.
- Yip, C.K., Kimbrough, T.G., Felise, H.B., Vuckovic, M., Thomas, N.A., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Finlay, B.B., Miller, S.I., and Strynadka, N.C. (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* 435: 702-707.
- Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K.A., Hoppner, C., Krall, L., Domke, N., and Baron, C. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. J Biol Chem 280: 26349-26359.

- Yung, B.Y., and Kornberg, A. (1988) Membrane attachment activates dnaA protein, the initiation protein of chromosome replication in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7202-7205.
- Zechner, E.L., Lang, S., and Schildbach, J.F. (2012) Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 1073-1087.



Autoinhibitory Regulation of TrwK, an Essential VirB4 ATPase in Type IV Secretion System Alejandro Peña, Jorge Ripoll-Rozada, Sandra Zunzunegui, Elena Cabezón, Fernando de la Cruz, and Ignacio Arechaga

The Journal of Biological Chemistry Vol. 286, NO. 19, pp. 17376–17382, May 13, 2011

DOI 10.1074/jbc.M110.208942

Regulation of the Type IV Secretion ATPase TrwD by Magnesium IMPLICATIONS FOR CATALYTIC MECHANISM OF THE SECRETION ATPase SUPERFAMILY Jorge Ripoll-Rozada, Alejandro Peña, Susana Rivas, Fernando Moro, Fernando de la Cruz, Elena Cabezón, and Ignacio Arechaga

The Journal of Biological Chemistry Vol 287, NO. 21, pp. 17408–17414, May 18, 2012

DOI 10.1074/jbc.M112.357905

Functional Interactions of VirB11 Traffic ATPases with VirB4 and VirD4 Molecular Motors in Type IV Secretion Systems Jorge Ripoll-Rozada, Sandra Zunzunegui, Fernando de la Cruz, Ignacio Arechaga and Elena Cabezón

Journal of Bacteriology. September 2013 vol. 195 no. 18 4195-4201

DOI: 10.1128/JB.00437-13