

Universidad
de Cantabria

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Molecular



Caracterización bioquímica y estructural de TrwK, un motor molecular implicado en la secreción bacteriana

Alejandro Peña

Diciembre 2012

Ignacio Arechaga y Fernando de la Cruz, Profesores Titulares de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, certifican que:

Alejandro Peña ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que lleva por título: "Caracterización bioquímica y estructural de TrwK, un motor molecular implicado 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, Diciembre de 2012

Fdo. Ignacio Arechaga y Fernando de la Cruz

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria bajo la dirección de los Doctores Ignacio Arechaga y Fernando de la Cruz, gracias a la beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario concedida por el Ministerio de economía y competitividad.

Durante este periodo se ha realizado una estancia de tres meses en el laboratorio de los Doctores José María Valpuesta y José López Carrascosa en el Centro Nacional de Biotecnología.

Emprendo una obra de la que no hay ejemplo y que no tendrá imitadores... No será como ninguna de cuantas he visto, y me atrevo a creer que no será como ninguna de cuantas existen. Si no será mejor, por lo menos será distinta. Si la Naturaleza ha obrado bien o mal rompiendo el molde en que la he vaciado, sólo podrá juzgarse después de haberla leído.

“He aquí lo que hice, lo que pensé y lo que fui. Con igual franqueza dije lo bueno y lo malo. Nada malo me callé ni me atribuí nada bueno; si me ha sucedido emplear algún adorno insignificante, lo hice sólo para llenar un vacío de mi memoria. Pude haber supuesto cierto lo que pudo haberlo sido, mas nunca lo que sabía que era falso”.

Modificado de “Las Confesiones” de Jean Jacques Rousseau

AGRADECIMIENTOS

De bien nacidos es ser agradecidos

Quisiera agradecer a Iñaki Arechaga y Fernando de la Cruz por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar mi tesis doctoral en su laboratorio y bajo su dirección.

Jefes:

Especialmente a Iñaki Arechaga. Muchas gracias por tu enorme paciencia, realmente necesaria al tratar conmigo. Gracias también por enseñarme tanto: purificación, microscopía, proteínología variada, análisis cinético, Photoshop, Sigmaplot, Chimera, Pymol, criterio científico, a ser exhaustivo en el trabajo, a ser más limpio y ordenado de lo que era, a “parar el balón y mirar” y no ofusarme con ensayos sin sentido... Gracias también por escuchar mis ideas, tenerlas en cuenta y por pararme los pies cuando me embalo con mil a la vez. Gracias por ofrecerme muchas de tus figuras, han contribuido en los artículos y en esta tesis y le han dado a ambas más calidad. Gracias por las publicaciones, no nos ha salido mal la cosa (aunque nos queda pendiente publicar en “Science” la recta patrón). Gracias también por ser un miembro más de los Biopaketes (UCP). Resumiendo, muchas gracias por ser mi director, por tener tanta paciencia con mi elevada entropía y ante todo por haberme enseñado tanto.

A Fernando de la Cruz. Por elegirme para hacer una tesis en su laboratorio pese a presentarme como un “Biofrikky”. Muchas gracias por tus ideas y aportaciones a mi trabajo, por esa increíble capacidad para tener buenas ideas, gracias también por salvarnos a tanta gente del abismo que existe más allá de las becas.

A Elena Cabezón. Gracias por dejarme ser un “Motor Molecular” y por enseñarme todos los trucos de la unión ADN-proteína (retardos, actividad ATPasa...) y de esa amiga en común llamada TrwB. Gracias también por ser el contrapunto de Iñaki, el ying que equilibra su yang y por generar también ideas y discusión. Gracias también por las figuras, por tu empeño en la dolorosa lucha contra referees y editores y las “cover letters” que tanto éxito nos han dado.

A Mapi, la enviada de Fernando en la Tierra. Haces analogía con tu nombre siendo el pilar de este laboratorio, evitando que se caiga, haciéndolo funcionar, haciéndolo como es. Eres la madre-hermana-amiga de todos nosotros. Acoges a todo el que llega, dándole consejo, alojamiento, comida, eres simplemente fantástica. No sólo eso. Científicamente eres increíble, conociendo

cada dato, cada artículo, cada figura de cada artículo y ofreciendo siempre una respuesta, una buena respuesta. Eres a por la que todos acudimos con cada duda, no importa si es plasmídica, genética o proteica. Simplemente eres la más grande.

A Gabi, siempre generando discusión, haciendo que la gente no dé nada por hecho, por muchas veces que haya repetido un experimento, haciendo que se miren los resultados desde otro ángulo, eso da mucha perspectiva y ayuda a mejorar.

Mis genéticos:

A la Lobera (el despacho de los becarios), es sólo una habitación, pero tiene personalidad propia; es capaz de acoger, de ayudar, de dar el respiro necesario tras horas de poyata, de enseñar... y la hemos fabricado entre todos.

A Inma y a Yera, que me acogisteis como hermanas mayores y me integrasteis. Inma, por las fiestas, los congresos, el baloncesto, por enseñarme a hacer retardos de ADN (por supuesto también por tu tiramisú). A Yerutxi, por los bailes, los diez-miles que nos hacíamos corriendo, tu ayuda, consejos, ideas y conocimientos. Muchas gracias a las dos por estar siempre a mi lado apoyándome siempre.

A Juan txo, por todo lo que he aprendido contigo, tanto científicamente como en muchos otros aspectos de la vida. Por nuestras carreras, siempre haciendo que me superase, por el parque de la vaca, las noches de lude, el baloncesto, todas las fiestas (Sancho y Quijote), por acogernos en tu casa y los guitarreos.

A Jorge, mi motor molecular. Gracias por ser mi primer *referee*, por aguantar tanto mi velocidad y todas mis malas pulgas. He aprendido muchísimo de ti, tu criterio, tu vista global de la ciencia y a ser algo más político (aunque no lo parezca). Por trabajar a mi lado, es un honor estar juntos en pubmed.

A Lillo, por hacer que trate de ser más inteligente cada día para igualarte, por pillar siempre mis bromas, por aguantar cada una de mis chorradas, mis secretos, por las fiestas, por darme siempre buenas ideas, por la matemática, por ser mi amigo, mi hermano gemelo guapo y por estar siempre a mi lado, sea cual sea el holocausto que nos rodee.

A David, por las bromas, por hacer más divertida la existencia en la Lobera, sobre todo por tus ideas, siempre son buenas, siempre ayudan, aunque no estés centrado en el campo de los demás, siempre aportas algo bueno, muchas gracias por ello.

A Carlos, por dejarnos tus clones, por tener siempre un buen consejo y hacerme ver cuando hago las cosas mal, siempre sincero. Por tus fotos y por el fabuloso finde viendo a Rossi y compañía y por ser uno de nosotros.

A María, por compartir tu silencio con nosotros y darle un aire más acondicionado a la Lobera, por las fiestas, por Lisboa, por ser mi referee ortográfica y de formato en la tesis y por las aventuras (Sella, barrancos, paracaidismo). Cualquier día nos matamos!!!

A Ruli por su ingente ayuda cinética, matemática y bibliográfica en general.

A Carola por ayudarme con las conjugaciones y a integrarme en mi estancia en Madrid.

A Sheila por sus chistes, sonrisas, terrenos en el infierno, Kittys y ayuda en general.

A Ana, por “controlar” el descontrol del laboratorio, el pastel de galleta y los barrancos.

A Mati, por enseñarme tanto, por aguantar todo el jaleo que montamos en el labo, los consejos, las risas y las secuencias.

A Athanasia, Maris, Javi, Irene, VaLinux, Blanca, Bea, Eric, Andrés, Raquel, Silvia (potrilla) y algun@s que se me olvidarán por las risas, consejos genéticos y ayudarme en el labo.

A Sandrita, por ser mi Dora la clonadora, conjugadora, ayudadora, sonreidora, arregladora, endulzadora, “duquesa”, por ayudarme y enseñarme tantísimo desde que llegué, por escucharme siempre y aconsejarme bien. Por ser mi amiga, gran parte de esta tesis tiene tu nombre (Cuá-Cuá).

Other Labs:

A *los Zabalas*. Muchas gracias por dejarme siempre cualquier reactivo que necesite, a Bego, su cámara de fotos y su simpatía. A Gerardo y Javi, por desentrañarme los secretos de los ÄKTA y sacarme de más de un apuro.

A *las Matxalénicas*. Por las fiestas, los congresos, el autoclave, el electroporador y donarnos toda enzima necesaria. A Leti por tanto viaje desde Castro y tanta sonrisa, a Esther por ser nuestra hermana mayor, con consejos y broncas inclusive. A Héctor, por tanta inteligencia, sabiduría, consejos y discusiones (quiero ser como tú). Anabel, Coral... En general a todo bicho viviente que ha pasado por ese labo, porque os unís a nuestra “comuna” Loberil.

A Matxalen y a Félix por sus ideas y discusiones (a Jon, por su cordura).

A *Bioquímica*. A sus jefes porque siempre nos dejan usar sus aparatos sin problema. A Manu, por ser como eres, por los conciertos (give-me fire... my desire!), por ayudarme con lo radiactivo, por las risas, la fiesta, las carreras, porque conocerte me hace ser mejor persona y

porque te quiero un huevo. A Juan, por las frikadas, el cine, por ser mi co-autor y referee literario, por ayudarme con el "Odyssey", por el Voley-playa y por tus consejos. A ambos dos por ofrecer vuestra casa para el fútbol y los ludes, por las dos eurocopas y el mundial que ganamos ahí (Iniestaaaaajiii). A Gabi, eres único y genial, tendría que existir más gente como tú, muchas gracias por los consejos con los *Western blot* y con cosas de la vida y familia, una figura de paper es gracias a ti, eres la mejor definición de Científico. A Alfonso, por las discusiones científicas, tu inteligencia, siempre con buenas ideas, por las timbas y los "homínidos" en tu casa y por ser mi colega, gracias por estar ahí siempre. A Javi (poker-face), Maña (vales más que la fuerza), Lucía (mi "monstruo" karateka), Sandra, Pablo, Laura, Ana(s), María, Marina, Pilar (gracias por ayudarme con la rodilla) y demás que se me olvidarán, muchas gracias a todos por darme siempre un reactivo, un gel, lo que fuese... Y en general a todos porque me hacéis sentir un "Bioquímico de adopción".

A los "*Pieros*" por su tremenda ayuda con el mundo del *Western* y el revelado en nitrato de plata. Lore y el chocolate, Javi y sus camisetas (gracias por regalarme una), Adán, los conciertos y las bicis, Anuska y Paula enseñándome a poner la membrana por el lado correcto. A Chipi por sus chistes y sus postres.

A los "*Inmunos*" por dejarme reactivos, fiesta y sonrisas, Marcos, Jorge, Ferchu, MªWii y demás.

A los *Berciano-Lafarga*. A ambos jefes por dejarme y ayudarme a usar su microscopio, por supuesto a Fidel, por dejarme manejarlo sin problemas, una figura de paper también es vuestra. A Rocío, por ser como eres, quererme tanto y ayudarme siempre, por la fiesta, por las carreras, por nuestra SMN y tus postres. A Anita, cada sonrisa y frikismo te acercan más a la Lobera, a Olga y Risoto por acogerme ahí arriba.

A los "*Developers*", Nacho, nuestras fiestas, timbas y conciertos (Du Hast), a Lolo, su simpatía, casa y sintonía, a Endika, los ludes y la final que perdimos (algún día levantaremos alguna copa rojiblanca), A Patri y sus eternas sonrisas (no dejes de sonreír jamás), a Lucía por nuestras confidencias, el monstruo de la toalla y tu simpatía.

A las *Fisios*. A VirB4 y sus reportajes fotográficos, por entender mis chistes freaks (hay que estar mal de la cabeza). A Andrea, ¿dos Castreños doctores?, lo nunca visto. A Alicia, por los viajes y sus consejos, espero que siempre recordemos que fuimos terneras.

A *Farma* por dejarme usar la ultra pequeña. A Begoña, por haber vivido y compartido tanto conmigo, aguantar mi mala leche, a mí en general (harto complicado) y los días eternos de laboratorio y por quererme tantísimo.

A Consuelo, por el parte meteorológico, los chistes y los caramelos.

A los Biopaquetes, el equipo de fútbol-sala que formamos en el departamento (y todo aquel que se ha sumado a jugar con nosotros) por ayudarnos a divertirnos, a mantenernos en forma y a liberar la furia de días aciagos de experimentos fallidos.

Madrid:

Gracias a José María Valpuesta y José López Carrascosa por dejarme hacer una estancia en su laboratorio. A Jaime Martín Benito, por ser tan didáctico, simpático y por enseñarme tanto de microscopía (con la física y el Linux que tienen detrás), gracias a ti tenemos este precioso volumen de TrwK. A Rocío Arranz por guiarme en el labo, revelado, escaneado, y manejo del microscopio. A Michelle, Daniele, Lucía, Jorge, Marina, Hugo, Ana, Javi... y el resto de los miembros de los dos laboratorios por ayudarme con cada duda y dejar que os invadiese. A los equipos de fútbol-sala del CNB y CBM. A Alberto (Maño), David, Dimitris, Nacho y toda la gente que hizo que me sintiese en Madrid como en mi casa.

A científicos externos: Txabas, Leire, María... por hacerme ver la ciencia desde un prisma un poco más alejado, desde vesículas del retículo hasta oligoquetos, sobretodo gracias por ser mis amigos y compartir mis quejas de becario. A Juampa, Endika, Germán y Ander, por ser mis biohoolligans. A todos vosotros por hacer una carrera tan divertida y por tener la suerte de haberos conocido.

A mi familia: a mi abuela Ana María por fardar de nieto y a mis hermanos, por su inocencia, dulzura, juegos, cariño incondicional y sinceridad; a veces la coherencia e inteligencia de un niño le da mil vueltas a cualquier adulto.

A mi Aitite, al Pete y a Jonathan.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
1. Introducción.....	7
1.1. Sistemas de secreción bacteriana	7
1.1.1. Sistema de secreción tipo I (T1SS)	9
1.1.2. Sistema de secreción tipo II (T2SS)	10
1.1.3. Sistema de secreción tipo III (T3SS)	11
1.1.4. Sistema de secreción tipo V (T5SS)	12
1.1.5. Sistema de secreción tipo VI (T6SS)	13
1.2. Sistema de secreción tipo IV (T4SS)	14
1.2.1. Esquema del T4SS	16
1.2.1.1. <i>Pilus</i>	18
1.2.1.2. Canal Periplásmico	20
1.2.1.3. Motores del sistema	22
1.3. VirB11	23
1.4. VirD4	25
1.5. VirB4	29
1.5.1. Introducción	29
1.5.2. Topología y estado oligomérico	31
1.5.3. Actividad/función	32
1.5.4. Interacción de VirB4 con otros miembros del T4SS	33
1.5.5. Estructura	35
2. Objetivos.....	41

3. Materiales y métodos	45
3.1. Cepas y plásmidos usados en este estudio	45
3.2. Técnicas de clonaje y crecimiento celular	47
3.2.1. Medio de crecimiento y agentes de selección	47
3.2.2. Extracción y purificación de ADN ..	47
3.2.3. Preparación de células competentes	47
3.2.4. Construcción de mutantes	48
3.2.4.1. Digestión	48
3.2.4.2. PCR	48
3.2.4.3. Doble PCR	48
3.2.5. Ensayos de conjugación	50
3.3. Técnicas bioquímicas	51
3.3.1. <i>Western blot</i>	51
3.3.2. Purificación de anticuerpos a partir de suero de conejo	51
3.3.3. Tinción de plata	52
3.3.4. Purificación de proteínas .	52
3.3.4.1. Proteínas solubles	52
3.3.4.2. Proteínas con colas de histidinas.	53
3.3.4.3. Proteínas que forman cuerpos de inclusión	54
3.3.5. Fraccionamiento de membranas .	54
3.3.6. Ensayos de retardos de ADN	55
3.3.7. Ensayos de hidrólisis de ATP .	56
3.3.8. Péptidos sintéticos	56
3.3.9. Análisis de espectrometría de masas	57
3.3.10. Análisis de interacciones TrwK-TrwB mediante <i>cross-linking</i>	57
3.4. Microscopía electrónica	58
3.5. Modelado estructural	59
3.6. Análisis bioinformáticos	59

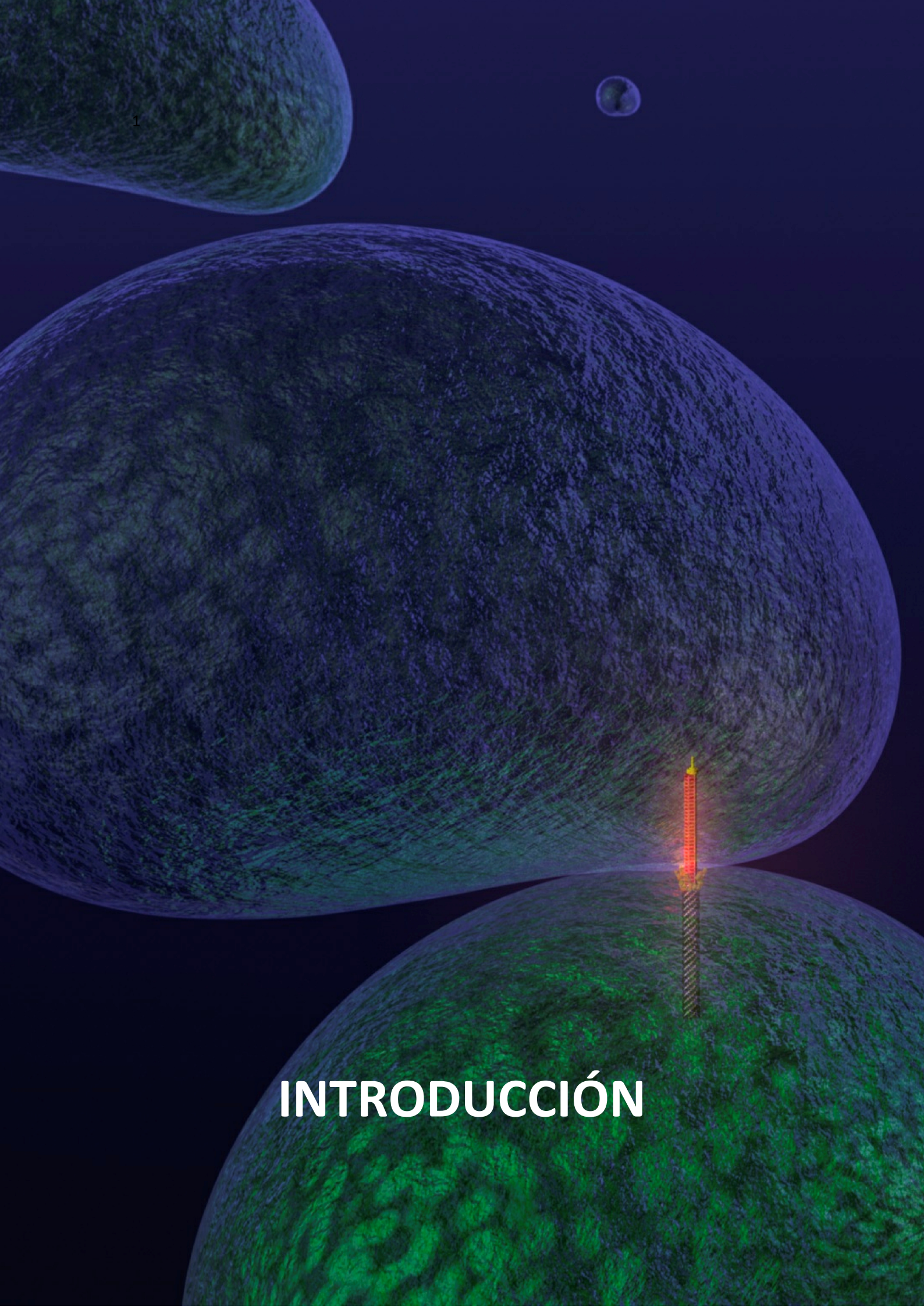
4. Resultados	63
4.1. Purificación y caracterización bioquímica de TrwK	63
4.1.1. Análisis por espectrometría de masas	66
4.1.2. Análisis de la mutación en los motivos Walker A y B	67
4.2. Caracterización del estado oligomérico y topología de TrwK	68
4.2.1. Estudios sobre el estado oligomérico de TrwK por ultracentrifugación analítica	68
4.2.2. TrwK es una proteína soluble, sin segmentos transmembrana	69
4.2.3. TrwK se une a la membrana interna mediante la interacción con TrwM	71
4.3. Modelado molecular de TrwK	73
4.3.1. Obtención de modelos de VirB4	73
4.3.2. Análisis de la región C-terminal de TrwK	75
4.4. Regulación de la actividad ATPasa de TrwK	76
4.4.1. La eliminación de las α -hélices del extremo C-terminal de TrwK incrementa la actividad ATPasa <i>in vitro</i>	76
4.4.2. La adición de péptidos sintéticos que complementan las α -hélices eliminadas, revierten el incremento de actividad ATPasa de los mutantes del extremo C-terminal	78
4.4.3. Los mutantes en el extremo C-terminal de TrwK no son capaces de complementar la función <i>in vivo</i> del R388: $\Delta trwK$	81
4.5. Análisis estructural de TrwK	83
4.5.1. Reconstrucción tridimensional de TrwK	83
4.5.2. Relación filogenética entre TrwK y las translocasas de ADN TrwB y FtsK	87
4.5.3. Ajuste de las coordenadas atómicas de translocasas de ADN en el mapa de microscopía electrónica de TrwK	89
4.6. Unión de TrwK al ADN	91
4.6.1. TrwK une ADN presentando mayor afinidad por <i>G-quadruplex</i> que por cadena sencilla	91
4.6.2. Creación de mutantes de TrwK con características similares a un translocador de ADN	93
4.6.3. Diferentes variables mutantes de TrwK son capaces de unir ADN	96
4.6.4. TrwK inhibe la actividad ATPasa ADN dependiente de TrwB	97
4.6.5. TrwK no compite con TrwB por la unión al ADN	102
4.6.6. Estudios de interacción de TrwK y TrwB	104

5. Discusión	109
6. Conclusiones	127
7. Bibliografía	131
8. Publicaciones	147

Abreviaturas

Å	Amstrong
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ADNcd	ADN de cadena doble
ADNcs	ADN de cadena sencilla
Ap	Ampicilina
<i>At</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
Cm	Cloranfenicol
CTD	Dominio C-terminal
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
<i>Dtr</i>	Replicación y transferencia de ADN
DWE	Agua destilada estéril.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Microscopía electrónica
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1- ácido piperazina etano sulfónico)
His-tag	Cola de 6 Histidinas
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
MPF	Formación del par conjugativo (Mating pair formation)
NADH ²⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NBD	Región de unión a nucleótidos
Ni-NTA	Ni ²⁺ -Ácido nitriloacético
NTD	Dominio N-terminal
NTP	Nucleótido 5'-trifosfato
Nx	Ácido nalidíxico
o/n	Toda la noche
<i>oriT</i>	Origen de transferencia
P	Periplasma
p/v	Relación peso : volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenglicol
PG	Peptidoglicano
PIPES	Piperazina-N,N-bis(2- ácido etanosulfónico)
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i>

SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Sm	Estreptomicina
T1SS	Sistema de secreción tipo 1
T2SS	Sistema de secreción tipo 2
T3SS	Sistema de secreción tipo 3
T4SS	Sistema de secreción tipo 4
T5SS	Sistema de secreción tipo 5
T6SS	Sistema de secreción tipo 6
Tc	Tetraciclina
Tp	Trimetoprim
Tris	Trihidroximetil-amino-metano



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas de secreción bacteriana

Los microorganismos patógenos tienen que enfrentarse a condiciones adversas cuando colonizan o infectan sus células huésped. Para ello, han desarrollado sistemas de secreción que son capaces de exportar diferentes efectores patógenos a su membrana externa, al medio extracelular o al citoplasma de sus células diana. Todos estos sistemas están dedicados a la secreción de proteínas y/o ADN que, una vez dentro de la célula huésped, promoverían la inducción de mecanismos que podrían comprender desde la adaptación de la célula al ambiente, así como el desencadenamiento de respuestas patológicas [1].

Las bacterias Gram-negativas han desarrollado diversos mecanismos para exportar dichos sustratos desde el citoplasma de la célula donadora a la célula diana, para lo que han de atravesar la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa. Se han descrito seis clases de sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas identificados como sistema de secreción tipo I (T1SS) hasta el sistema tipo VI (T6SS) (Fig. 1.1) [2].

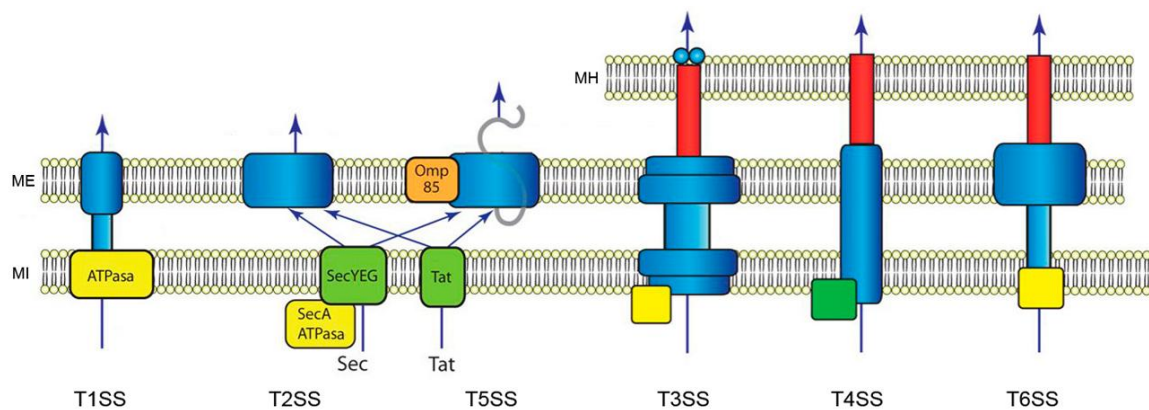


Figura 1.1. Representación esquemática de los diferentes sistemas de secreción bacterianos en Gram-negativas. Los transportadores de proteínas pueden clasificarse en dos tipos: Sec/Tat dependientes y Sec independientes. ME (Membrana externa), MI (Membrana interna). Modificada de [3].

La secreción a través de los sistemas II y V se produce mediante un proceso de dos pasos. Los sustratos proteicos, sintetizados como precursores, poseen en su extremo N-terminal un péptido señal necesario para el reconocimiento por los sistemas Sec y Tat [4]. Estos complejos macromoleculares, también llamados translocones, están involucrados en el paso de proteínas a través de la membrana interna. El sistema Sec promueve la exportación de proteínas desplegadas, mientras que la vía de Tat promueve la exportación de proteínas plegadas, generalmente unidas a un cofactor [5]. Tras este primer paso, la translocación continúa a través de la membrana externa por sus sistemas de secreción correspondientes, T2SS o T5SS. Las proteínas secretadas, utilizando cualquiera de estos dos sistemas, son liberadas al medio extracelular o bien permanecen unidas a la superficie de la célula bacteriana, en la membrana externa [5].

Por otro lado, en los sistemas I, III, IV y VI, no se han descrito estos translocones por lo que podrían utilizar un mecanismo de un solo paso, liberando directamente los sustratos al medio extracelular (T1SS) o a la célula huésped (T3SS, T4SS y T6SS). En todos estos casos, los efectores proteicos no se sintetizan con un péptido señal, aunque pueden llevar una señal de secreción específica de cada sistema [1].

1.1.1. Sistema de secreción tipo I (T1SS)

Los sistemas de secreción tipo I están compuestos por una proteína de membrana externa, un transportador de membrana interna ABC (ATP-binding cassette), que provee la energía para el proceso de transporte y una proteína adaptadora que conecta estos dos componentes (Fig. 1.2). Este sistema está relacionado con la secreción de citotoxinas, proteínas de superficie, lipasas, proteasas o citoquinas y con la α -hemolisina [6].

Los sustratos del T1SS son reconocidos por la maquinaria mediante una señal de secreción, no escindible, localizada en su dominio C-terminal (CTD) [6]. A través de esta señal interactúan con el sistema ABC y la proteína adaptadora para ser secretados en una conformación desplegada. La unión de la señal de secreción con el dominio de unión a nucleótidos del transportador ABC induce un cambio conformacional debido a la unión e hidrólisis del ATP que impulsan el sustrato a través del sistema de secreción [7].

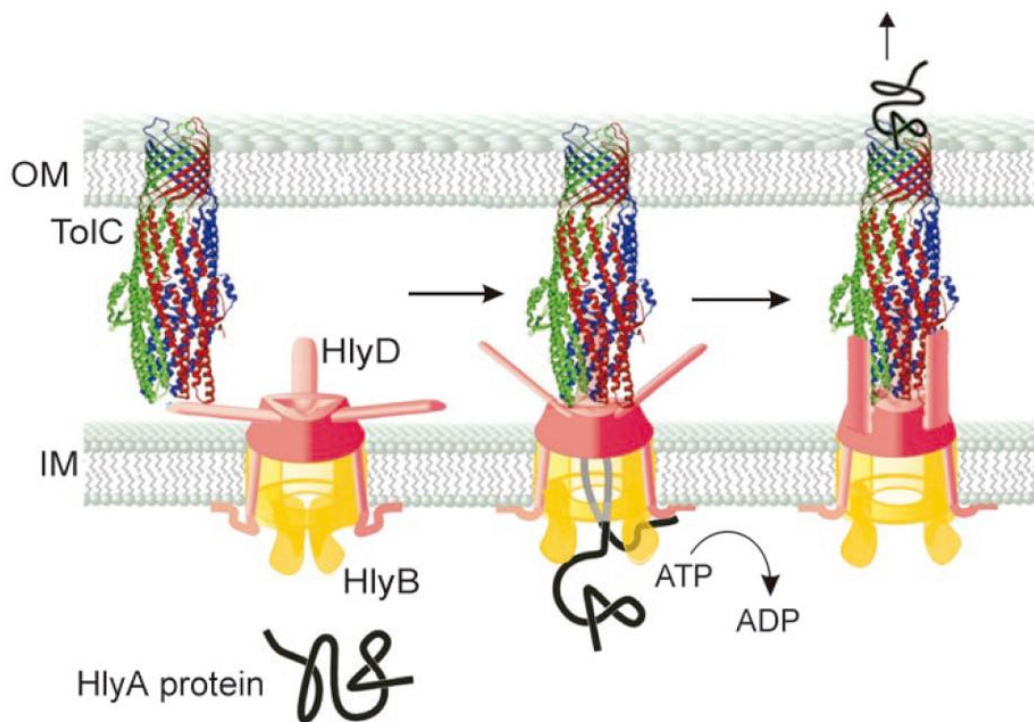


Figura 1.2. Esquema del T1SS secretor de α -hemolisina en *Escherichia coli* liberando el efector HlyA.

Sistema formado por un transportador ABC (HlyB), una proteína adaptadora que sirve como puente de las membranas interna y la membrana externa (HlyD) y una proteína formadora de un poro en la membrana externa (TolC). Modificada de [8].

1.1.2. Sistema de secreción tipo II (T2SS)

Los sistemas de secreción tipo II son máquinas formadas por varios componentes macromoleculares. Se trata de uno de los sistemas mas versátiles usados por las bacterias Gram-negativas para secretar efectores extracelulares [4, 9]. El sistema II consta de entre doce y dieciséis proteínas, genéricamente denominadas Gsp (General secretory pathway) situadas en las dos membranas, el citoplasma y el periplasma.

Puede dividirse en tres partes: una plataforma proteica situada en la membrana interna (componentes GspCEFLM) que contiene la ATPasa GspE, un canal multimérico embebido en la membrana interna (GspD) y una estructura fimbriar denominada pseudopilina (formada principalmente por GspG y GspI-K) (Fig. 1.3). El mecanismo de translocación consta de dos etapas: translocación al periplasma del precursor del efector a través de la membrana interna mediante el translocón Sec o la ruta Tat y transporte al exterior a través de la membrana externa.

Son sistemas relacionados evolutivamente con la biogénesis del *pilus* de tipo cuatro (T4S *pilus*), que usa un T2SS para su ensamblaje [10].

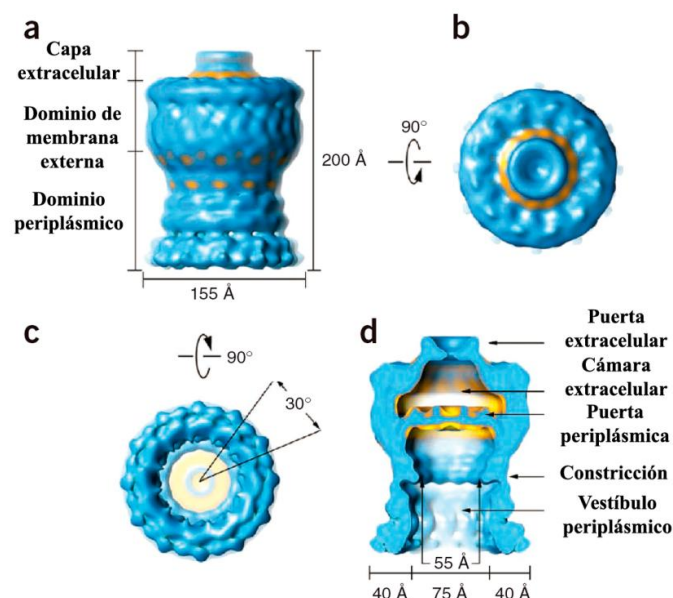


Figura 1.3. Reconstrucción tridimensional por criomicroscopía de GspD de *Vibrio cholerae*.

Vistas laterales (a, d), superior (b) e inferior (c) de la reconstrucción de VcGspD a 19 Å de resolución. En las vistas laterales están identificados tres dominios, de la zona inferior a la superior: el dominio periplásmico, el de membrana externa y la puerta extracelular. A su vez, pueden diferenciarse cuatro partes en su estructura: un vestíbulo periplásmico, una constricción, una puerta periplásmica, y una cámara y puerta extracelular. Tomada de [10].

1.1.3. Sistema de secreción tipo III (T3SS)

Los sistemas de secreción tipo III, también llamados inyectosomas, son usados por patógenos animales y vegetales, como *Salmonella* spp, *Shigella* spp. *Yersinia* spp. *E. coli* enteropatógenas y enterohemorrágicas y *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Los sistemas de secreción tipo III inyectan proteínas efectoras al citoplasma de células eucariotas mediante un mecanismo independiente de Sec [11]. La actividad de dichos efectores, que a menudo son similares a proteínas eucariotas, puede modificar la respuesta del hospedador al imitar la actividad de las proteínas endógenas, lo que resulta en una desestabilización del hospedador.

Genética y estructuralmente están relacionados con el flagelo de bacterias [11]. El T3SS está compuesto por más de veinte proteínas diferentes, las cuales forman una estructura macromolecular que atraviesa la envuelta celular. El núcleo central es el complejo inyector, requerido para establecer contacto con la célula hospedadora. Se trata de una gran estructura macromolecular con forma cilíndrica, que está incrustada en las membranas interna y externa de la bacteria y que se extiende por el espacio periplásmico y el medio extracelular como un filamento en forma de aguja (Fig. 1.4).

Reconstrucciones tridimensionales de dicho complejo por tinción negativa y criomicroscopía en *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. han proporcionado una visión de la arquitectura general de todo el complejo [12, 13]. En ambos organismos, el núcleo central está organizado como una serie de estructuras con forma de anillo, lo que sugiere una estrecha relación estructural y evolutiva entre diferentes T3SS [12] [13].

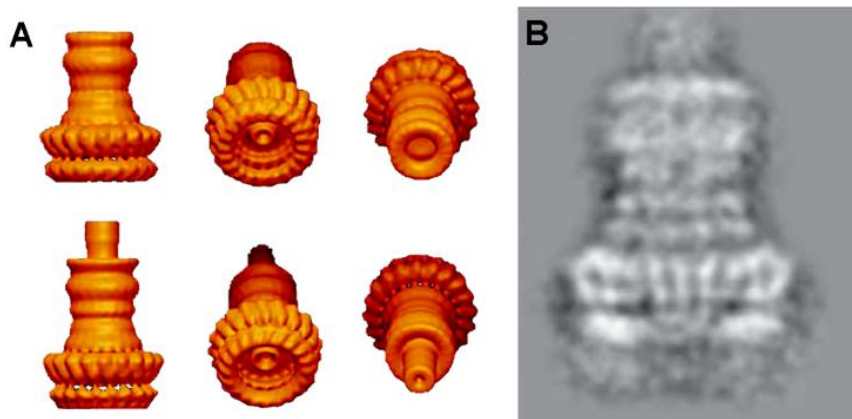


Figura 1.4. Representación del volumen del inyectosoma.

(A) Representaciones de la estructura tridimensional del T3SS de *Salmonella* spp. resuelto a 17 Å de resolución [12]. (B) Media de clases de vistas laterales en tinción negativa del complejo. Modificada de [12] y [13].

1.1.4. Sistema de secreción tipo V (T5SS)

El T5SS es la vía más simple de secreción descrita hasta ahora y está ampliamente representada en bacterias Gram-negativas [1]. Permite la secreción a través de la envoltura bacteriana de proteínas asociadas con la adherencia y virulencia microbiana [1]. Los T5SS secretan sus sustratos en dos pasos: a través de la membrana interna mediante el sistema Sec y a través de la membrana externa mediante un canal en forma de barril beta, para luego permanecer asociados a la parte externa de la membrana o bien ser liberados al medio tras un proceso de corte proteolítico [14].

Existen dos tipos de T5SS en bacterias Gram-negativas: los auto-transportadores (T5SSa y T5SSc) y los sistemas de secreción asociados (T5SSb) [14]. En los auto-transportadores, las proteínas secretadas contienen péptidos señal en ambos dominios, N y C-terminal conteniendo un dominio catalítico entre ellas. El péptido señal del dominio N-terminal (NTD) permite la exportación a través de la membrana interna y se separa a continuación. Una vez en el periplasma, el CTD se inserta en la membrana externa, lo que conduce tanto a la exposición del dominio catalítico en la superficie de la bacteria, como a su liberación al medio extracelular después de la escisión por auto-proteólisis [14] (Fig. 1.5).

En contraste con los auto-transportadores, en los sistemas de secreción asociados (T5SSb), la proteína con el dominio catalítico y la que tiene la secuencia señal en el CTD son dos proteínas distintas. Ambas serían transportadas al periplasma vía el sistema Sec [14, 15].

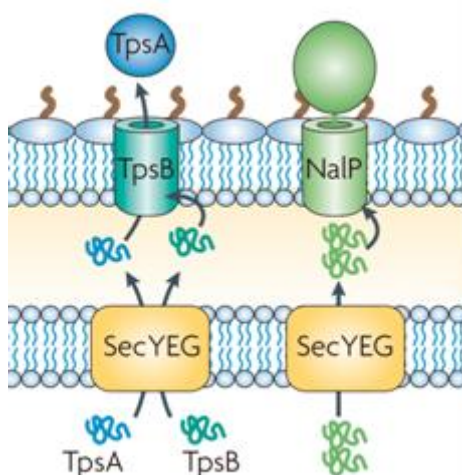


Figura 1.5. Esquema del T5SS.

En proteínas auto-transportadas, como NalP, el dominio translocador se inserta en la membrana externa y facilita la localización de la proteína en la superficie de la membrana.

En los sistemas asociados, una proteína translocadora (TpsB) media en la secreción de efectores (TpsA) a través de la membrana externa. Tomada de [16].

1.1.5. Sistema de secreción tipo VI (T6SS)

El sistema de secreción tipo VI se ha descubierto y ha comenzado a ser estudiado recientemente [17]. Se ha encontrado en patógenos como *P. aeruginosa*, *E. coli* enteroagregativas, *Salmonella typhimurium*, *V. cholerae* y *Yersinia pestis*. En un principio, atendiendo a su organización génica, fue descrito como una variante del sistema de secreción tipo IV [18]. Se ha sido definido como un nuevo tipo de complejo multiproteico especializado en secreción, de entre doce y veinticinco subunidades, que, atendiendo a su modo de acción, podría estar relacionado evolutivamente con los componentes de los tallos de bacteriófagos [19].

Estudios de microscopía de fluorescencia indican que las vainas del sistema de secreción siguen un ciclo de ensamblaje/desensamblaje alargando y retrayendo su *pilus* [20]. Análisis de crio-tomografía electrónica muestran que las vainas aparecen como estructuras tubulares, en conformaciones extendidas o contraídas, que están conectadas con la membrana interna mediante una estructura basal [20] (Fig. 1.6).

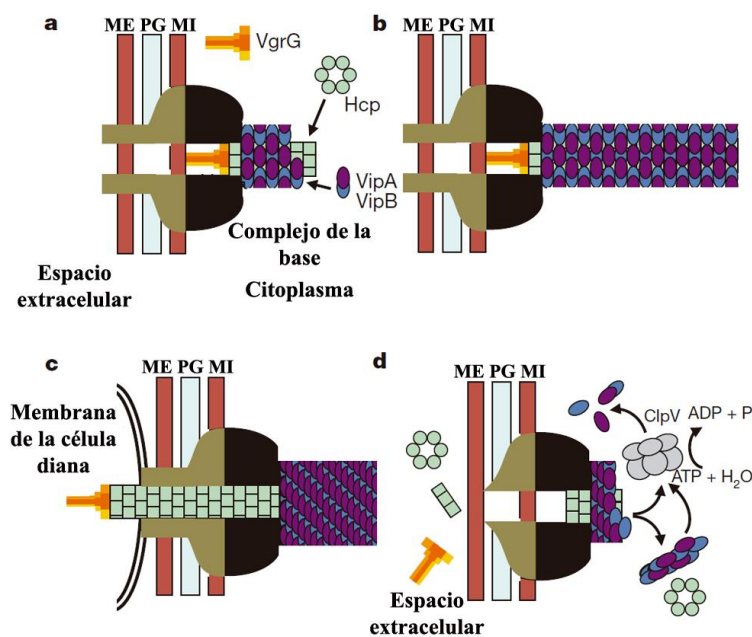


Figura 6. Modelo del mecanismo de acción del T6SS de *Vibrio cholerae*.

(A) Ensamblado. Inicio de la formación del complejo de la base e inicio de polimerización de la vaina.

(B) Polimerización de los monómeros de la vaina (VipA y VipB) alrededor de Hcp y extensión de ésta.

(C) Contracción. Cambios en el complejo de la base promueven la contracción y translocación de la vaina hacia la membrana de la célula diana. Penetra en la membrana y transloca las proteínas efectoras usando el tubo formado por el hexámero Hcp como conducto.

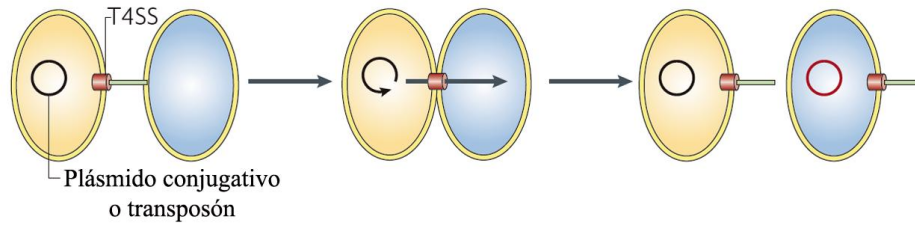
(D) Desensamblado. La vaina se separa y se desmonta mediante la acción de la ATPasa ClpV. Los dímeros de VipA y VipB liberados se reciclan en un nuevo T6SS de la misma placa o de otra de nueva formación. Tomada de [20].

1.2. Sistema de secreción tipo IV (T4SS)

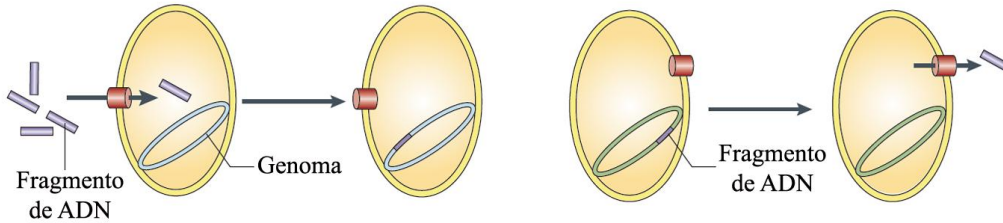
Las bacterias Gram-negativas usan los sistemas de secreción tipo IV para transportar sustratos proteicos y ADN a células diana. Estas células comprenden un amplio rango filogenético, desde procariotas a eucariotas. Dicho transporte está asociado a muchos procesos patogénicos tanto en células eucariotas animales y vegetales, como en eventos de conjugación en células procariotas [21, 22, 23]. Una subfamilia de este sistema, usada por varios patógenos humanos y de plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* o *Brucella suis*, exporta solamente efectores proteicos a células eucariotas provocando diversas enfermedades como úlceras gástricas, brucelosis, tos ferina o legionelosis [24]. Determinados T4SS (*Legionella pneumophila* y *A. tumefaciens*) son capaces de transportar tanto ADN como proteínas y podrían considerarse tanto patogénicos como conjugativos, ya que son usados para la transferencia de efectores proteicos y de ADN de la bacteria a la planta. Otro tipo de sistemas de secreción tipo IV, como el usado por *Neisseria gonorrhoeae*, está relacionado con el proceso de captación o liberación de ADN, en el cual los sustratos de ADN se intercambian con el medio extracelular [25, 26] (Fig. 1.7).

Basadas en sus relaciones filogenéticas, los T4SS se han clasificado en 8 tipos MPF, que difieren en cuanto a los genes específicos que contienen [164, 165, 166, 167]. Nuestro sistema modelo de estudio, el T4SS del plásmido R388, pertenece al grupo MPF_T, cuyo prototipo es el T4SS Vir del plásmido pTi de *A. tumefaciens*. Los sistemas T4SS pertenecientes al grupo MPF_T se encuentran diseminados en distintas clases taxonómicas del *phylum* Proteobacteria y guardan una alta relación entre sí, en términos de sintenia, homología, topología, localización celular e interacciones entre sus proteínas; tanto si el T4SS está codificado en el cromosoma (en un elemento integrativo y conjugativo (ICE) o en una isla genómica) o en un plásmido. Esta homología se constata, además, tanto en T4SS MPF_T involucrados en patogenicidad (cuyo sustrato es exclusivamente proteico) como en conjugación (cuyo sustrato es proteína-ADN) [27].

a Conjugación



b Admisión/liberación de ADN



c Translocador de efectores

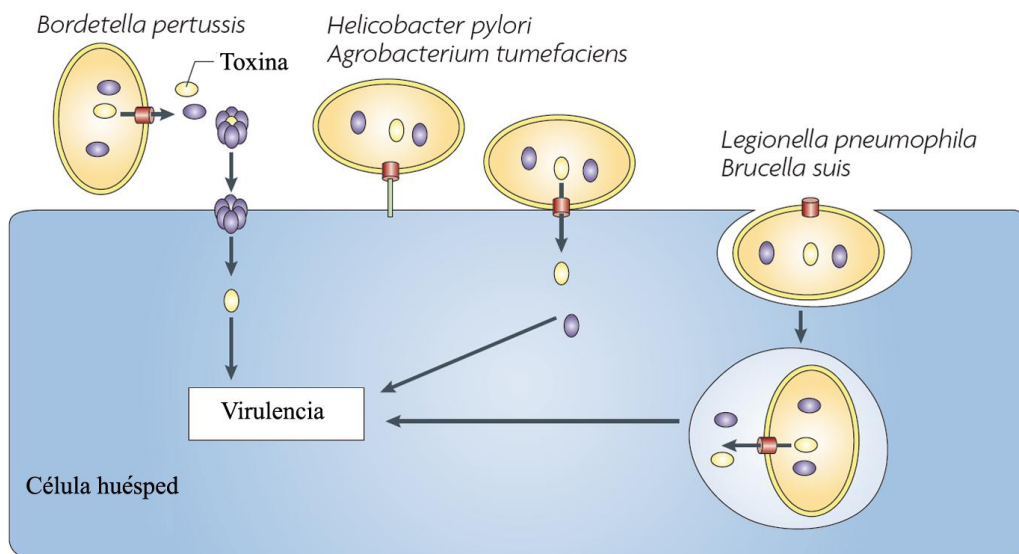


Figura 1.7. Esquema de los diferentes papeles de los sistemas de secreción de tipo IV en bacterias.

(a) Sistemas conjugativos. Exportan plásmidos o transposones de una célula donadora a una receptora, en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

(b) Captación de ADN (transformación) y liberación de ADN al medio extracelular.

(c) Translocación de efectores. Sistemas que secretan sustratos proteicos al medio y ADN o efectores a las células eucariotas y están directamente implicados en la virulencia de muchas bacterias Gram-negativas patógenas.

Tomada de [16].

1.2.1. Esquema del T4SS

Los T4SS son complejos macromoleculares compuestos por once proteínas, denominadas VirB1-VirB11, según la nomenclatura derivada del sistema en *A. tumefaciens*, y una proteína acopladora, VirD4 [28]. Estas proteínas, de tamaño variado y diferente topología, se ensamblan en una arquitectura que se expande desde el citoplasma hasta el espacio extracelular atravesando la membrana interna, el periplasma y la membrana externa.

Su organización genética suele estar relacionada con su organización espacial dentro del sistema (Fig 1.8). Proteínas cercanas espacialmente o directamente unidas están situadas bajo el control de los mismos promotores y son traducidas de manera secuencial dependiendo del promotor bajo el que estén. Además, esta traducción secuencial en el tiempo coincide con los pasos de formación del sistema [29, 30].

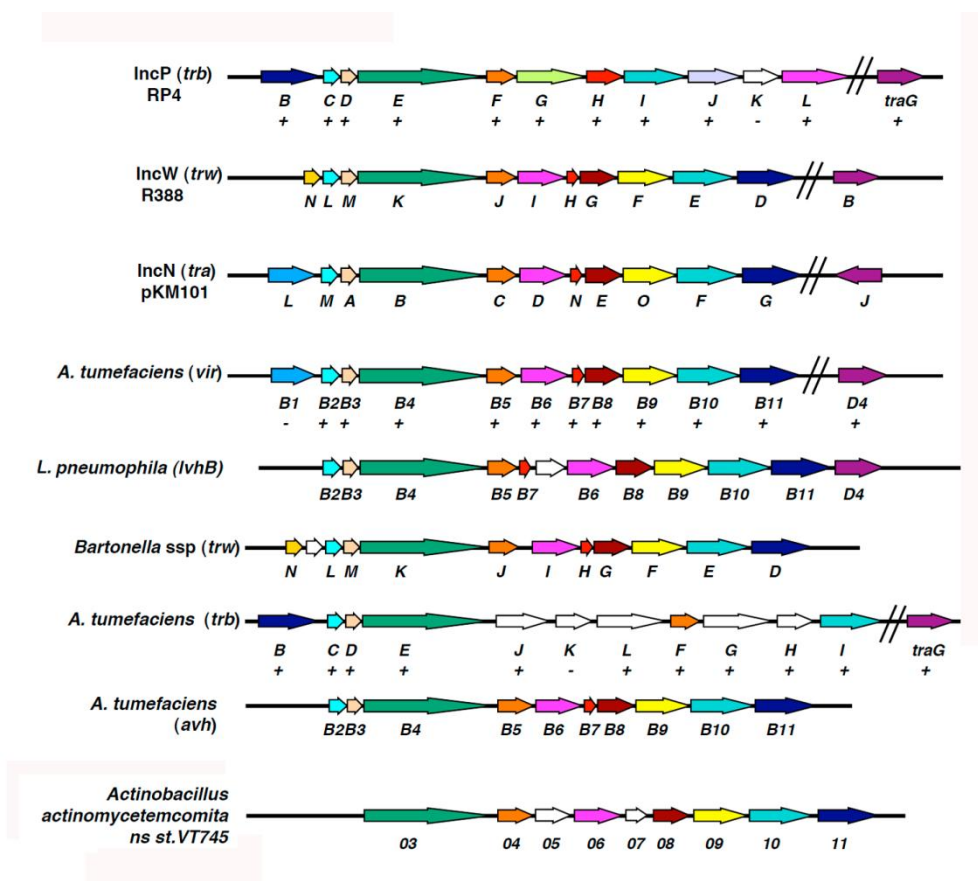


Figura 1.8. Esquema de la organización genética de los T4SS conjugativos de tipo MPF_T más representativos y estudiados.

Las flechas del mismo color indican los homólogos en los distintos T4SS y su longitud, el tamaño relativo de cada uno de los genes.

Gran parte de los componentes del T4SS tienen una función estructural, formando el canal periplásmico y el *pilus* conjugativo. Otras subunidades presentan actividad catalítica, ATPasa y transglicosilasa. Se desconoce la función específica de algunas de las subunidades, más allá de su posible unión a otras proteínas. No obstante, pese a conocer varias interacciones entre ellas, la naturaleza de la gran mayoría está todavía por resolverse.

Los T4SS pueden dividirse en tres partes funcionales: *pilus*, canal periplásmico y motores de secreción (Fig. 1.9).

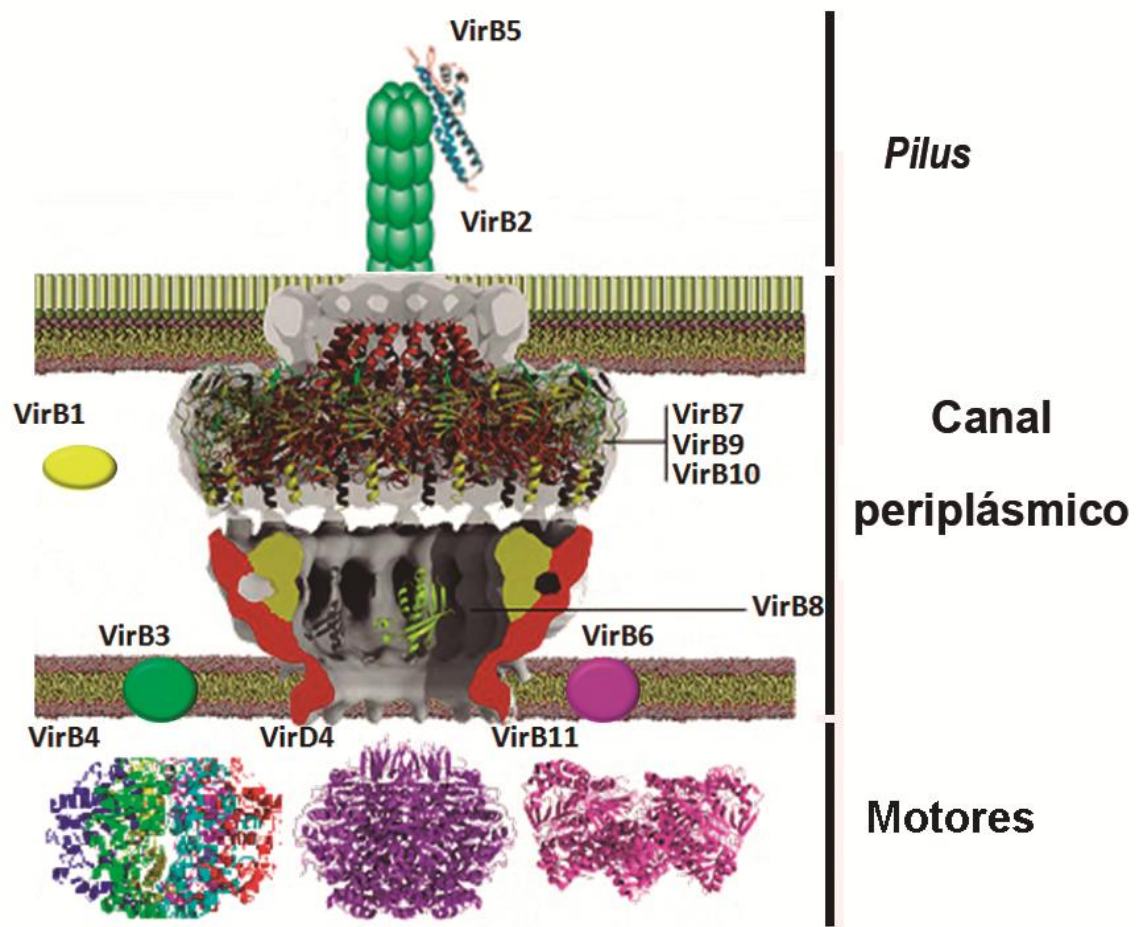


Figura 1.9. Modelo de las partes funcionales del T4SS del tipo MPF.

Pilus. Es el elemento que pone en contacto la bacteria con las células receptoras.

Canal periplásmico. Complejo macromolecular que conecta la membrana interna y externa, atravesando el espacio periplásmico, y utilizándose como canal para el transporte de efectores y ADN.

Motores moleculares. ATPasas hexaméricas que proveen la energía necesaria para el transporte de sustratos y/o la propia formación del complejo.

1.2.1.1. *Pilus*

El *pilus* es una estructura multimérica que se expande desde la membrana externa de la bacteria hacia el espacio extracelular, poniéndola en contacto con la célula diana. Está formado por dos proteínas, VirB2 y VirB5. La pilina (VirB2) es una proteína hidrofóbica que multimeriza creando el *pilus*. Se cree que VirB2 inicia el contacto bacteria-célula huésped antes del inicio de la transferencia de ADN durante la conjugación. VirB5 es un componente menor del *pilus* que actúa como una adhesina ayudando a dicho contacto [31, 32, 33, 34, 35, 36] (Fig 1.10).

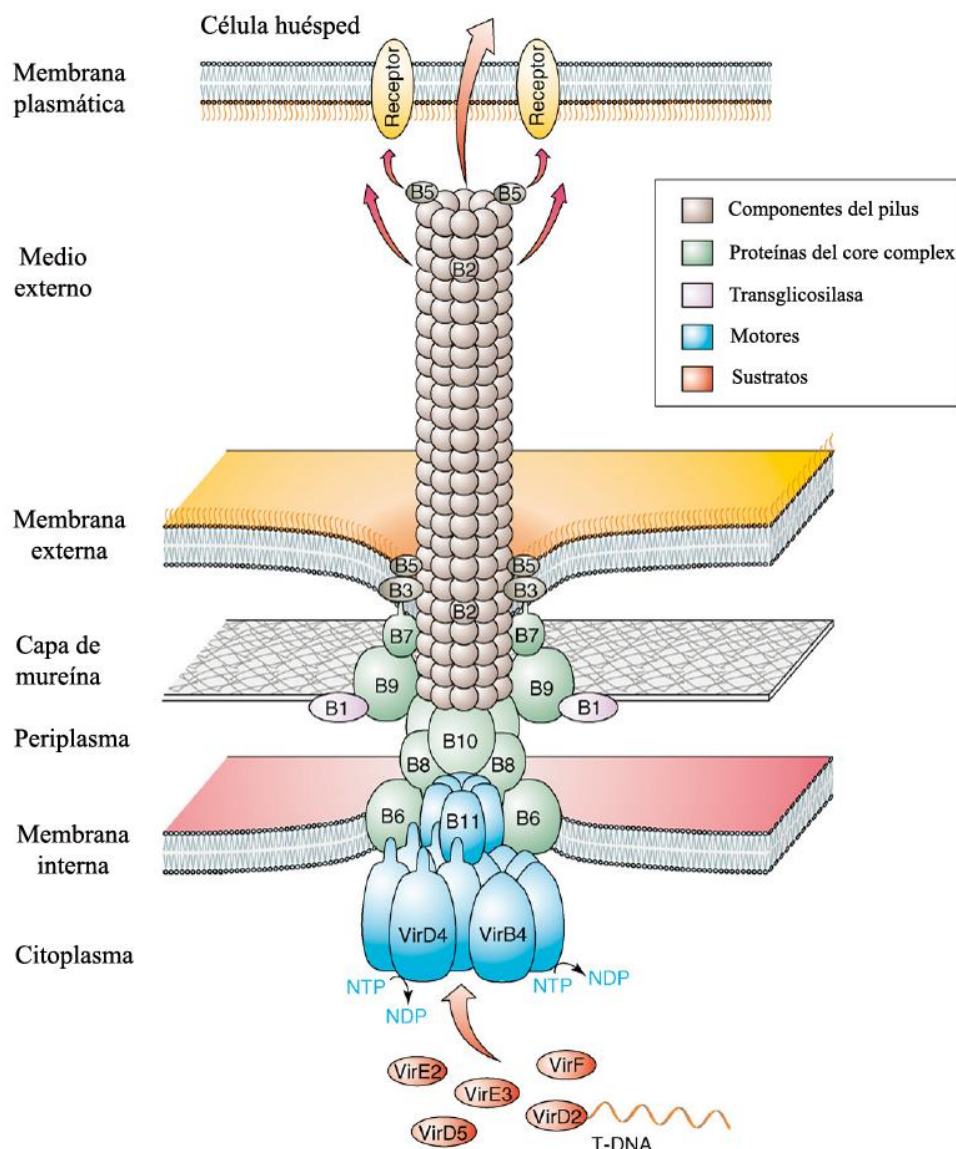


Figura 1.10. Modelo de la estructura del T4SS de *A. tumefaciens*.

Los componentes del *pilus*, VirB2 y VirB5 tienen importantes funciones en el transporte de sustrato a través del sistema, pero también podrían estar involucrados en el reconocimiento y la unión a los receptores de la célula huésped. Tomada de [31].

La pilina se sintetiza en forma de pre-pilina, siendo necesario su procesamiento para la biogénesis del *pilus*. En *A. tumefaciens*, los primeros 74 aminoácidos del péptido son eliminados tras su transporte a la membrana interna y la VirB2 madura se cicla para formar las subunidades del *pilus* [33, 34]. Estudios de homología de secuencia entre pilinas de diferentes plásmidos y géneros bacterianos, indican que todas son sintetizadas inicialmente como pre-pilinas y conteniendo una región en su NTD, que es escindida de la proteína para obtener el péptido maduro.

Análisis estructurales y funcionales indican que VirB5 podría estar involucrada en las interacciones proteína-proteína, importantes en el ensamblaje del *pilus*, la transferencia de ADN y el reconocimiento por el huésped [37]. Posteriormente, se demostró la localización de VirB5 en el extremo del *pilus*, lo que indica que también podría estar involucrada en el contacto directo con la célula receptora [38].

1.2.1.2. Canal periplásmico

El canal periplásmico es un complejo macromolecular formado por tres proteínas diferentes (VirB7, VirB9 y VirB10) repetidas catorce veces cada una, que conectan la membrana interna y la externa, extendiéndose por todo el periplasma [39] (Fig 1.11). La estructura y dimensiones de dicho complejo se han resuelto, mediante microscopía electrónica, dando una idea de sus dimensiones y forma así como del tamaño de efectores, proteicos y ADN, que podrían atravesarlo. Dicho complejo tiene unas dimensiones de 185 Å de alto por 185 Å de ancho y puede ser dividido en tres partes: la tapa, situada en la membrana externa formada por los CTD de VirB7, VirB9 y VirB10, con un diámetro de 80 Å y una constricción interna de 10 Å; el cuerpo, situado en el periplasma y compuesto por dominios de VirB7, VirB9 y VirB10; y la base, situada en la membrana interna, formada por los NTD de VirB9 y VirB10 y con una constricción interna de 50 Å.

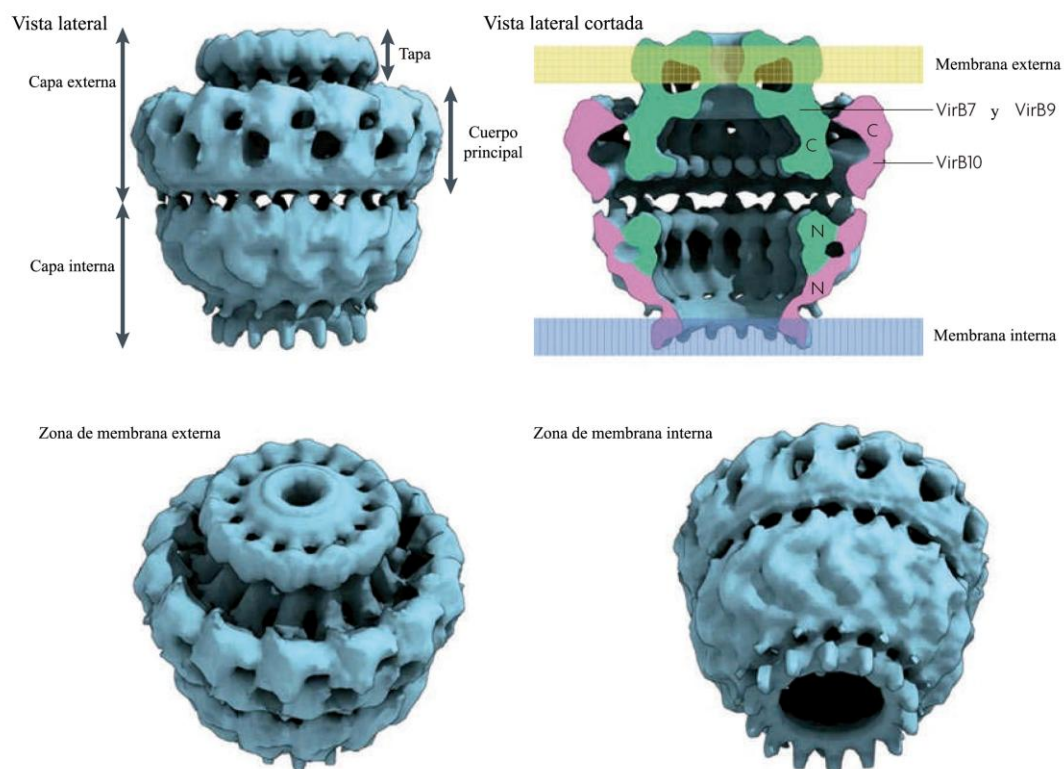


Figura 1.11. Estructura del canal periplásmico del T4SS de pKM101.

Estructura obtenida mediante crio-microscopía del canal periplásmico, compuesto por TraN (VirB7), TraO (VirB9) y TraF (VirB10). La vista lateral segmentada (superior derecha), detalla las regiones propuestas como transmembrana y la localización de los homólogos de VirB7, VirB9 y VirB10 dentro de la estructura. Tomada de [40].

VirB8, aunque se transcribe en el mismo operón que VirB7, VirB9 y VirB10, extrañamente no forma parte del canal periplásmico. No obstante, se han visto interacciones de dicha proteína con VirB4, VirB5, VirB6 y VirB2, implicándola en el proceso de secreción de los monómeros de pilina [41, 42]. A su vez, se ha descrito también su unión a VirB10, situándola acoplada al complejo con una posible función de andamiaje [43].

Existen otras proteínas asociadas a este complejo: VirB1, que puede actuar como una transglicosilasa rompiendo el peptidoglicano para el correcto ensamblaje del complejo [44] y otras proteínas de función hasta ahora desconocida, que han sido propuestas como proteínas de anclaje para otros miembros del sistema y/o pertenecientes a la zona interior del poro, ambas situadas en la membrana interna (VirB3 y VirB6) [27].

VirB3 es una proteína integral de membrana que aparece en la mayoría de los sistemas asociada genéticamente a VirB4 [23]. Se ha sugerido que su presencia junto a VirB4, VirB7, VirB8 es necesaria para la estabilización del complejo, lo que hace pensar que podría estar implicada en el proceso de formación del canal periplásmico [45].

VirB6 ha sido definida como una proteína politópica de membrana capaz de interactuar con varios miembros del sistema, tanto con los estructurales formadores del complejo como con los energéticos [27]. Además, ha sido identificada en agrupaciones génicas de multitud de organismos en los cuales aparecen sólo unos pocos miembros del sistema, situándola como una de las proteínas más importantes de los T4SS. Pese a dichas interacciones y distribución filogenética, su papel dentro del complejo es todavía desconocido [27]. También se ha descrito que VirB6 es capaz de interactuar con el factor de exclusión de la célula huésped. [162]

1.2.1.3. Motores del sistema

Los motores de secreción son tres proteínas hexaméricas (VirB4, VirB11, VirD4) que utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para producir un trabajo mecánico necesario para la transferencia de ADN y proteínas a través del canal, así como a la formación del mismo [29, 46, 47, 48] (Fig. 1.12). Esta energía generaría un cambio conformacional en el hexámero que ayudaría al transporte de efectores. Este cambio puede generar diferentes trabajos mecánicos: bombeo del ADN, transporte directo de sustratos, plegamiento/desplegamiento de efectores o proteínas propias del sistema, ensamblaje/desensamblaje de efectores y modificación de la acción o el mecanismo de otras ATPasas (actividad activasa y dislocasa) [29, 46, 47, 48, 49, 50, 51].

Los tres motores están situados en la cara citoplasmática de la membrana interna. Su ubicación exacta con respecto al canal periplásmico es todavía desconocida, habiéndose obtenido diferentes resultados con cada una de ellas y en distintos géneros bacterianos o plásmidos, encontrando uniones entre los distintos motores con proteínas del canal periplásmico, del relaxosoma, con el ADN y entre ellas mismas [21, 29, 52, 53, 54, 55, 56, 57]. Este tipo de resultados hacen pensar más en uniones transitorias entre los motores y otros miembros del sistema que en uniones fijas para llevar a cabo una secuencia de pasos que daría con la formación del complejo y la exportación de sustratos.

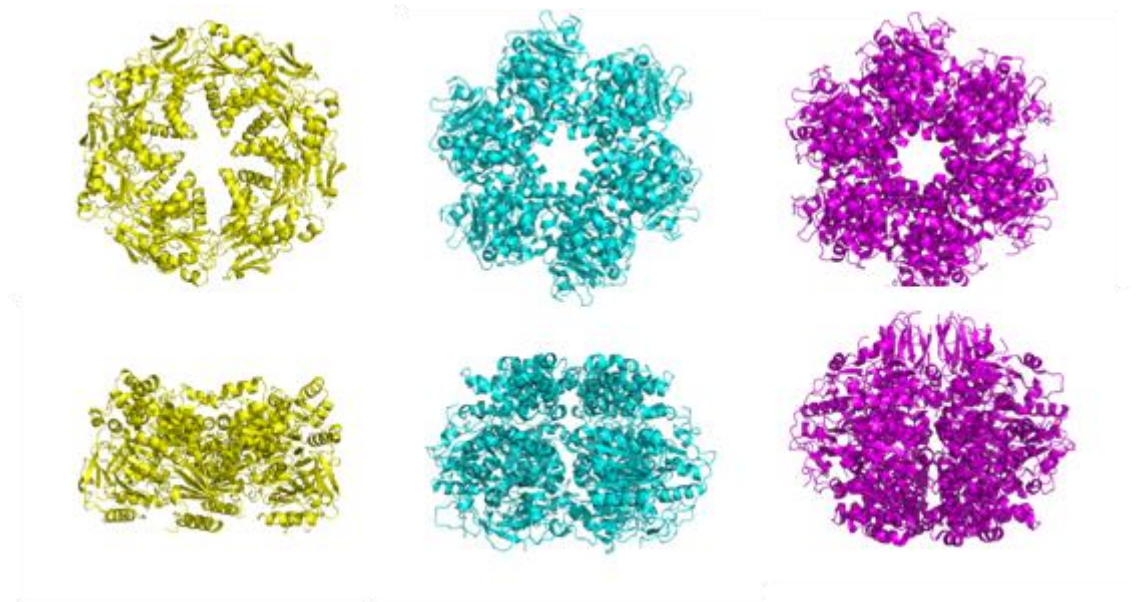


Figura 1.12. Representación estructural de las ATPasas hexaméricas del T4SS.

Vistas laterales y frontales del modelado estructural de TrwD (amarillo), modelado estructural del CTD de TrwK (cian) y de la estructura cristalográfica de TrwBΔN70 (1e9r.pdb) (magenta).

1.3. VirB11

Las proteínas VirB11 están presentes en la mayoría de los T4SS de las Gram-negativas, estando altamente conservadas sus estructuras entre distintos géneros bacterianos y plásmidos. Son proteínas de alrededor de 500 aminoácidos, sin segmentos transmembrana y que forman hexámeros [58]. Se ha resuelto la estructura cristalográfica de dos homólogos de VirB11: de *H. pylori* y de *B. suis* [58, 59, 158] (Fig. 1.13). La estructura confirma estudios filogenéticos previos [159] que situaban a VirB11 en una familia de proteínas denominadas *Traffic ATPases*, implicadas en secreción (PilT) y ensamblaje/desensamblaje (ClpV) [20, 60]. También guardan relación estructural con enzimas encargadas en el plegamiento de proteínas (ClpB) y con CbbX, una proteína implicada en la activación de la enzima Rubisco [61, 160]. La estructura de VirB11 consiste en dos anillos, uno más cerrado (C-terminal) y otro más abierto (N-terminal), con una distribución de cargas que, apoyada por estudios de actividad en presencia de lípidos, propone una posible interacción con la membrana interna [158]. Confirmando esta hipótesis, TrwD se ha visto que es capaz de interactuar con membranas modelo [57]. De la misma manera, estudios estructurales mediante microscopía electrónica en TrwD de R388, demuestran que forma anillos hexaméricos en distintas condiciones de pH y en presencia de diferentes nucleótidos y magnesio [49, 62].

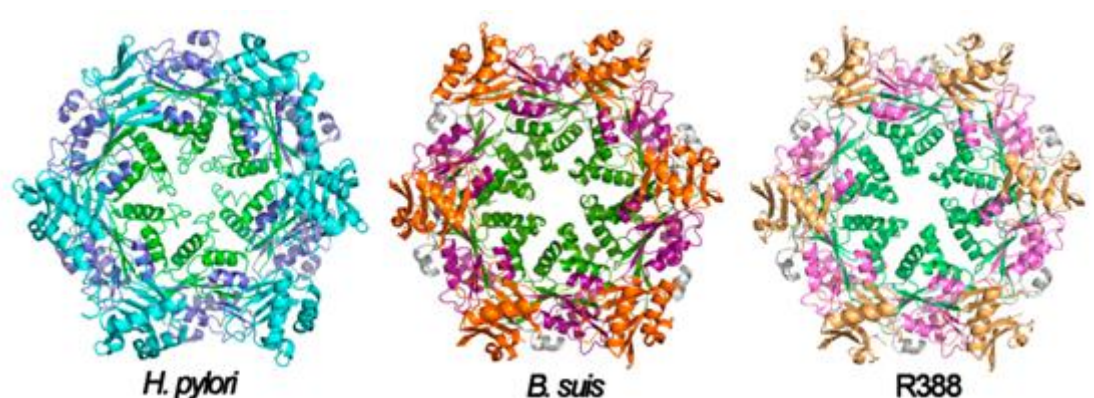


Figura 1.13. Estructuras hexaméricas de tres homólogos de VirB11.

Representación de las estructuras hexaméricas de *H. pylori* HP0525 (1nlz.pdb), de *B. suis* VirB11 (2gza.pdb) y del modelado informático de TrwD de R388. Cada monómero consta de un NTD (cian, naranja y marrón) y un CTD, (azul, magenta rosa), conectados por un *linker* flexible (azul oscuro y gris). Las regiones en verde (subdominio del CTD), orientadas hacia el interior del anillo, podrían estar implicadas en las interacciones con sus sustratos. Tomada de [49].

Se ha descrito la capacidad para hidrolizar ATP de varios homólogos de VirB11 [49, 62, 63, 64]. Esta capacidad para hidrolizar ATP es esencial durante el proceso conjugativo, ya que mutantes defectivos en su actividad ATPasa (en los motivos Walker) generan un sistema incapaz de conjugar. La actividad ATPasa de TrwD, es regulada por ADP y por magnesio [49]. Con estos estudios y otros realizados en dicha superfamilia de *Traffic ATPases*, se ha postulado un posible mecanismo catalítico que podría ser llevado a cabo por los miembros de dicha familia y que ayudaría a la comprensión de su inhibición/activación, conformación estructural y actividad específica [49, 161].

Estudios de mutantes en VirB11 de *A. tumefaciens* indican la necesidad de dicha proteína para la translocación del sustrato [56] y el ensamblaje del T4SS. Por otra parte, ciertos mutantes de VirB11 son defectivos únicamente en la formación del *pilus* o en la transferencia del sustrato, indicando que ambas funciones pueden ser independientes. Pese a estos datos que acentúan la importancia de VirB11, existen algunos T4SS en los cuales no aparece ningún homólogo de la proteína, como es el caso del plásmido F [65].

1.4. VirD4

VirD4, o proteína acopladora, es una ATPasa anclada en la membrana que está presente en todos los sistemas conjugativos y en algunos no conjugativos [28]. Estas proteínas acoplan el procesamiento del ADN plasmídico con el transporte a través del T4SS, usando la energía derivada de la hidrólisis de ATP. Son capaces de transportar ADN de cadena sencilla (su sustrato durante la conjugación), pero también de unir ADN tanto de cadena doble como con diferentes estructuras (cruciformes, *G-quadruplex*) [66]. Pese a su capacidad de unión al ADN, no está implicada en el corte del ADN plasmídico [67, 68].

TrwB, la proteína acopladora del plásmido R388, es capaz de hidrolizar ATP en presencia de ADN [46, 66]. A su vez, se ha descrito su interacción con la relaxasa (TrwC) [69] y la proteína accesoria (TrwA) [55]. La interacción TrwB-TrwA resulta en una activación de la actividad de hidrólisis de TrwB en presencia de ADN [46]. Dicha activación ayudaría a la formación del relaxosoma y al transporte del ADN a través del canal periplásmico vía su interacción con TrwE. La interacción TrwB-TrwE tiene lugar en los dominios transmembrana de ambas proteínas [52]. También, se ha descrito que TrwB es requerida para la transferencia de TrwC en ausencia de transporte de ADN [70].

Se ha resuelto la estructura cristalográfica del dominio citosólico de TrwB (TrwB Δ N70) [71], que carece del segmento transmembrana y se purifica de forma soluble [28] (Fig. 1.14). La estructura cristalográfica de TrwB Δ N70 presenta similitudes estructurales con las F₁-ATPasas y con diferentes translocasas de ADN de la familia RecA [71] (Fig. 1.15). Dichas translocasas, están implicadas en el transporte de ADN en diversos organismos y llevan a cabo funciones tales como: segregación cromosómica (FtsK) [72], esporulación (SpoIIIE) [73], replicación (helicasa T7) [74] y recombinación (RuvB) [75].

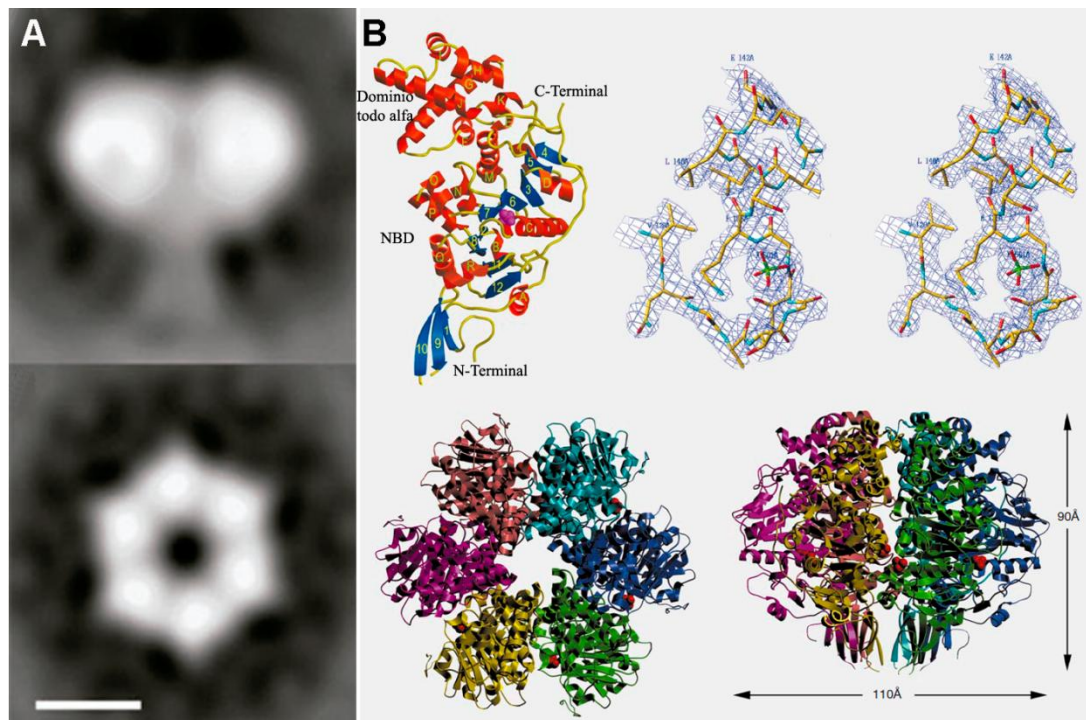


Figura 1.14. Caracterización estructural de TrwB.

(A) Vista lateral (panel superior) y frontal (panel inferior) de TrwB salvaje obtenida mediante microscopía electrónica (barra de escala 50 Å). En estas imágenes se puede apreciar el canal interno así como la región transmembrana [76].

(B) Medidas y descripción de la estructura cristalográfica de TrwBΔN70. Descripción de las partes del monómero y de su densidad electrónica (panel superior) y vistas lateral y frontal del hexámero (panel inferior) [71].

Esta gran similitud entre translocasas de ADN y otros miembros de la familia RecA, implicados en segregación cromosómica, esporulación, división celular y encapsulado viral, define una homología estructural en toda esta familia de ATPasas hexaméricas y un posible origen evolutivo común de una proteína de segregación cromosómica en arqueas [77, 78]. Dicha similitud comprende un dominio motor que contiene los motivos catalíticos Walker A y B y define un dominio de plegamiento común para las proteínas de dicha familia. Concretamente, existe una homología estructural entre TrwB y FtsK que las relaciona en estudios filogenéticos, sugiriendo un mecanismo de acción similar de ambas proteínas pese a la diferencia en los procesos celulares en los que intervienen (Fig. 1.16).

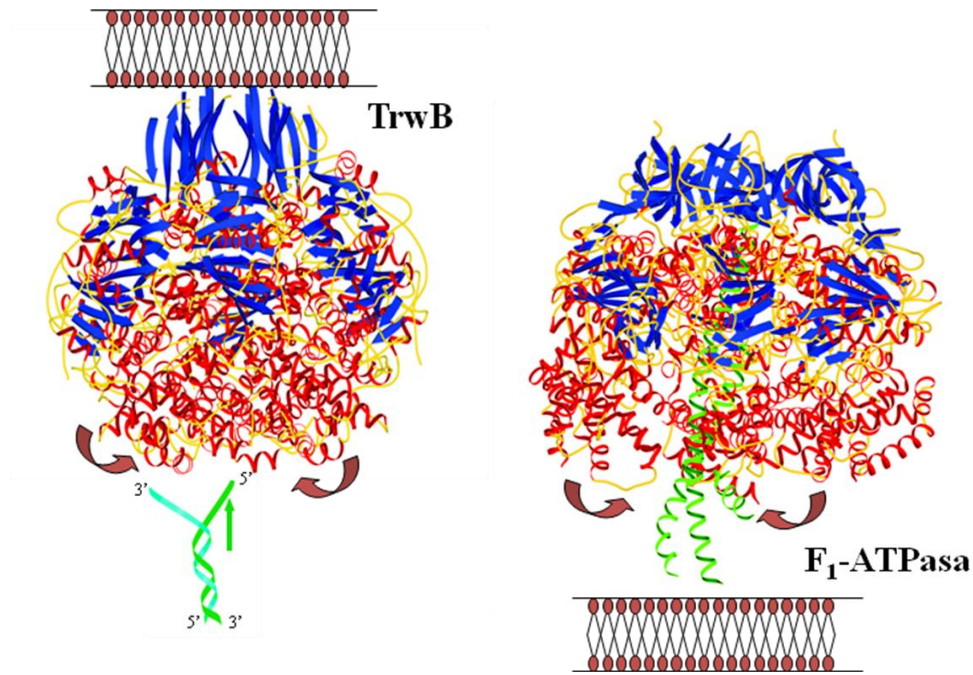


Figura 1.15. Comparación estructural entre TrwB y F₁-ATPasa.

Estructuras de TrwB (panel izquierdo) y F₁-ATPasa (panel derecho), representadas en orientación contraria respecto a la membrana interna. La subunidad γ de la F₁-ATPasa está coloreada en verde. En el caso de TrwB, la doble hebra de ADN está coloreada en verde y cian, aunque solo una de ellas (5'-3') es translocada a través de la proteína y el T4SS. La separación de las hebras puede ocurrir en un paso previo mediado por la relaxasa (TrwC). Las flechas marrones representan los cambios en el estado (abierto/cerrado) de las subunidades catalíticas asociado a la hidrólisis de ATP. Los cambios conformacionales creados por dicha hidrólisis harían, en el caso de la F₁-ATPasa, que ese movimiento se transmitiese a través de la subunidad γ . De la misma manera, la hidrólisis del ATP en TrwB, promovería el transporte de la cadena sencilla a través de su poro central. Tomada de [46].

FtsK es una proteína hexamérica, con forma de anillo, implicada en la segregación cromosómica bombeando ADN de cadena doble a través de su poro central [72]. Las diferencias entre el tamaño de su poro central (32 Å) (2iuv.pdb) y el de TrwB (8 Å) (1e9r.pdb) obtenidas mediante cristalografía de rayos X, podrían explicarse por el sustrato transportado (cadena doble en FtsK y sencilla en TrwB) [71, 72]. Pese a la diferencia en el sustrato empleado, ambas proteínas son capaces de reconocer estructuras de tipo *G-quadruplex*, siendo reconocidas específicamente por FtsK mediante su unión a las zonas KOPS [79] y estimulando su unión y actividad en el caso de TrwB [66].

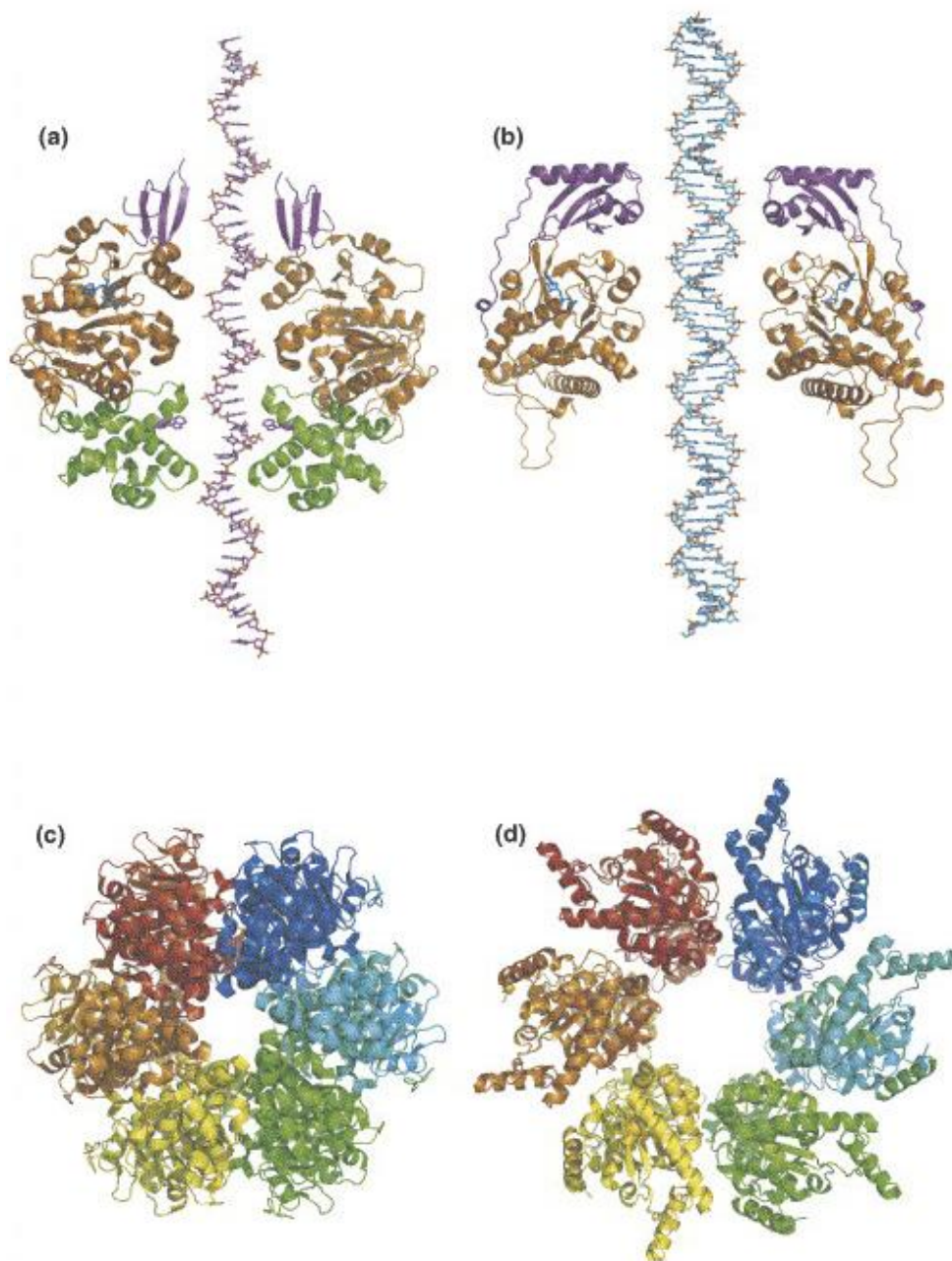


Figura 1.16. Comparación estructural entre TrwB y FtsK.

Ambas proteínas poseen un dominio motor altamente conservado, implicado en generar la energía necesaria para el transporte del ADN de cadena sencilla (a, c) o cadena doble (b, d), a través de su poro central. Modificada de [80].

1.5. VirB4

1.5.1. Introducción

Las proteínas de la familia VirB4 son las más largas y conservadas de los T4SS (Fig. 1.17) jugando un papel esencial en la biogénesis del *pilus*, en la virulencia y en el transporte de sustratos. Están presentes en todos los T4SS de Gram-negativas, Gram-positivas y arqueas e incluso en agrupaciones génicas de hipotéticos sistemas conjugativos en los cuales sólo se pueden caracterizar VirB6, VirB2 y VirB4. En estas agrupaciones, el gen de *virB4* co-localiza con *virB2*. Esta organización genética se ha descrito como vital para ejercer el papel de determinante patogénico en ambas proteínas y para definir a VirB4 como esencial para la aparición del *pilus* [27].

Se trata de proteínas de entre 600 y 900 aminoácidos, con unos 815 de media (823 en TrwK), formadas por dos dominios estructurales, N y C-terminal, perfectamente diferenciados. El CTD es el más conservado de los dos y está constituido por los 400 últimos aminoácidos aproximadamente. Este dominio, además, contiene los motivos catalíticos Walker A y B, característicos de ATPasas de la familia RecA [54]. La presencia de estos dominios indica que las proteínas VirB4 pueden unir e hidrolizar ATP. Diversos estudios filogenéticos han sugerido una relación evolutiva del CTD de las VirB4 con diversas translocasas de ADN [77, 78]. Sin embargo, el NTD está bastante menos conservado y carece de motivos catalíticos característicos. Por ello, se ha postulado como un dominio que podría intervenir en la oligomerización de la proteína y/o en la unión a la membrana interna bacteriana, directa o indirectamente mediante la unión a proteínas integrales de membrana (VirB3) o a otros componentes del sistema [45, 81, 82].

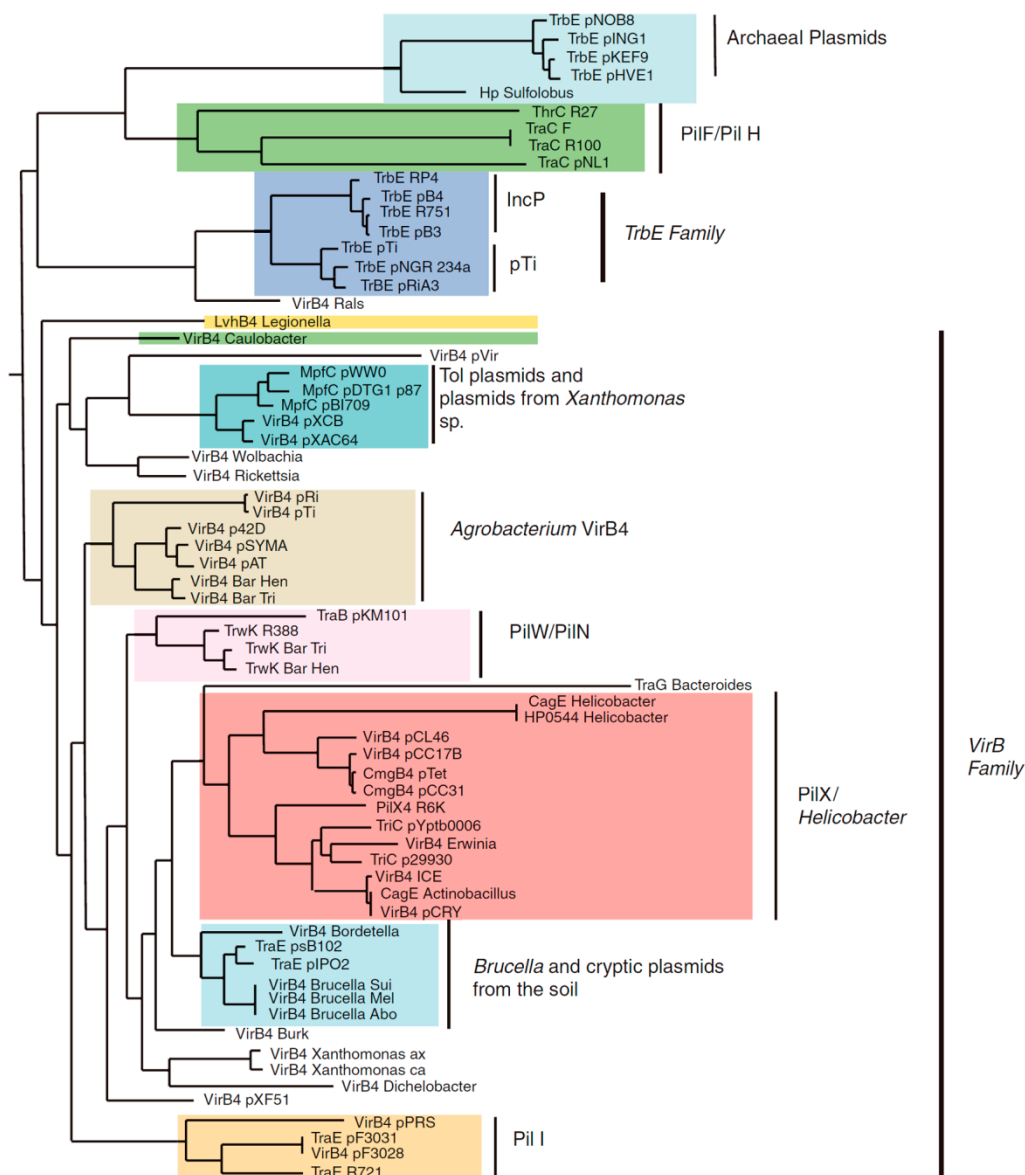


Figura 1.17. Distribución filogenética de las VirB4.

Árbol filogenético de TrwK y sus homólogos obtenido mediante métodos de máxima verosimilitud (PHYMLIP software, J. Felsenstein, <http://evolution.genetics.washington.edu/phymlip.html>). Tomada de [83].

1.5.2. Topología y estado oligomérico

La predicción de la topología de la mayoría de las VirB4 indica que son proteínas solubles, sin segmentos transmembrana, con la excepción de los homólogos pertenecientes a la rama IncX y TrbE del plásmido RP4 [48]. Sin embargo, existe controversia acerca de esta topología. Por ejemplo, la VirB4 de *A. tumefaciens* ha sido descrita como una proteína integral de membrana [84] a pesar de carecer segmentos transmembrana según análisis bioinformáticos [48]. La asociación a la membrana de las proteínas VirB4 parece estar mediada por la interacción con VirB3 [45], una proteína integral de membrana. Es más, diferentes análisis de secuencia de las proteínas del clado IncX identifican miembros de la familia VirB4 que codifican un único polipéptido compuesto por la fusión de VirB3 y VirB4 [81, 85]. Diferentes estudios realizados por el mismo grupo en la misma proteína (TraB de pKM101), sitúan su hipotético dominio transmembrana en posiciones diferentes (alrededor del residuo 100 y del 300), y describen su estado oligomérico como una transición entre dímero y hexámero atendiendo a su origen en la purificación (de membrana y soluble) y a la ausencia o presencia de actividad [86, 87]. Estos datos reflejan la dificultad para definir la topología y el estado oligomérico de las VirB4.

Como se ha apuntado anteriormente, el estado oligomérico de estas proteínas también ha sido difícil de establecer. Se ha descrito que VirB4 de *A. tumefaciens* forma dímeros [84]. PrgJ, el homólogo de VirB4 en *Enterococcus faecalis*, ha sido purificada como una proteína soluble y dimerica [54] y, LvhB4, el homólogo en *L. pneumophila*, como soluble y monomérica [87]. Estudios de caracterización bioquímica de TrbE (RP4) y TrwK (R388) sugieren que ambas se presentan como monómeros en solución [82]. Por otra parte, la similitud estructural entre el CTD de VirB4 y el dominio citoplasmático de VirD4, sugiere que las VirB4 son capaces de hexamerizar [88]. Esta asunción sería consistente dado que las otras dos ATPasas del sistema son hexaméricas y que el CTD de VirB4 no solo posee similitud estructural con VirB4, también con otras ATPasas hexaméricas implicadas en la translocación del ADN [77, 78]. Se ha propuesto que el NTD de la proteína puede ser el responsable de la dimerización o posible formación de mayores estados de multimerización, en ausencia de otros miembros del sistema, debido a la presencia en *A. tumefaciens* de un dominio de cremallera de leucinas entorno al aminoácido 300 [82]. De la misma manera, VirB3 podría intervenir en la correcta oligomerización de VirB4 siendo los diferentes estados de agregación encontrados los precursores de su estado oligomérico activo.

1.5.3. Actividad/función

Los homólogos de VirB4 contienen los motivos conservados Walker A y B, esenciales para la unión e hidrólisis del ATP (Fig 1.18). Mutaciones en los motivos Walker A y B de TrbE (homólogo de VirB4 en RP4) revelan que estos motivos son esenciales para la producción del *pilus*, propagación de plásmidos y transferencia de ADN.

La actividad ATPasa de diferentes homólogos ha sido difícil de demostrar *in vivo*, ya que distintos autores han obtenido resultados contrarios que apuntaban tanto a su capacidad para hidrolizar ATP como a la ausencia de ésta [16, 82, 91]. Sin embargo, estudios de caracterización bioquímica de TrbE, así como de TrwK (R388), sugieren que ambas proteínas carecen de la capacidad para hidrolizar ATP o GTP [82].

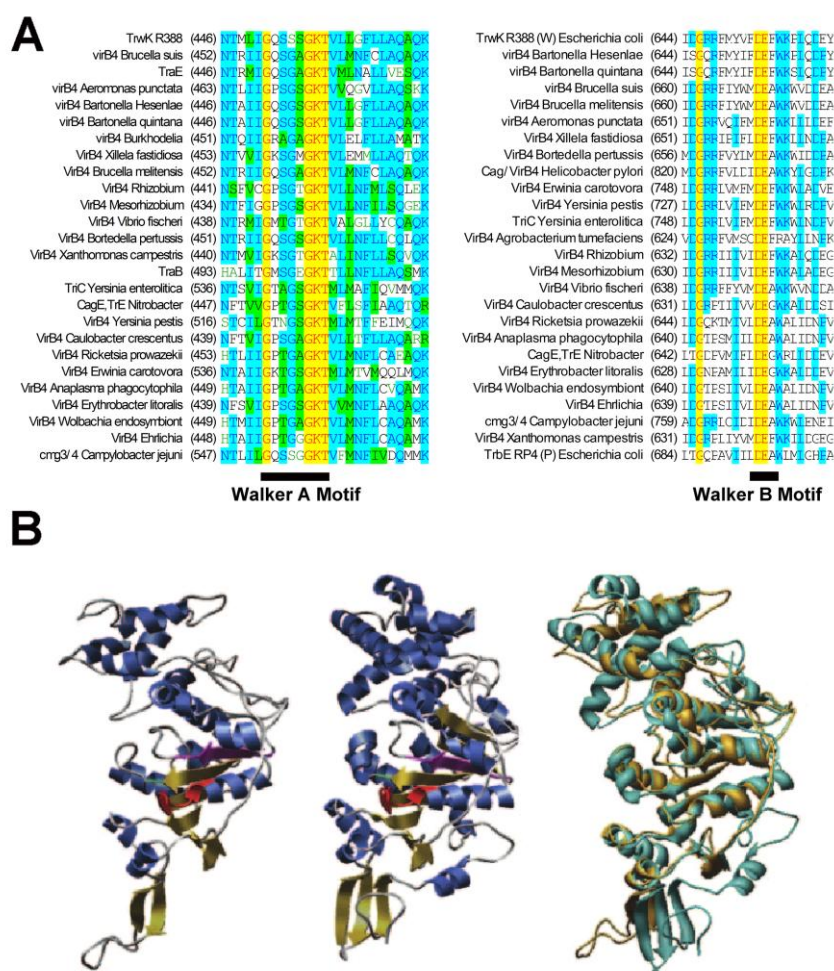


Figura 1.18. Alineamiento de los motivos Walker A y B en las VirB4 y su localización en su estructura.

(A) Alineamiento de los motivos catalíticos Walker A y Walker B en distintas VirB4 mostrando su alto grado de conservación.

(B) Localización de los motivos Walker A y B (violeta) en la estructura cristalográfica de TrwB, en el modelado del VirB4_{CTD} de *A. tumefaciens* y superposición de ambas (cian y amarillo). Modificada de [50].

1.5.4. Interacción de VirB4 con otros miembros del T4SS

La ubicación de las VirB4 en el sistema y su asociación con la membrana interna, sugiere posibles interacciones, tanto funcionales como estructurales, con otros miembros del sistema.

Análisis en *A. tumefaciens*, revelan una interacción directa con VirB8 y VirB10 [43]. Atendiendo a estos resultados, VirB4 podría intervenir en la estabilización de VirB8 mediando la incorporación de los componentes del *pilus* conjugativo VirB5 y VirB2 [43]. Utilizando plásmidos deletéreos en la producción de VirB4 se ve reducida en gran medida la aparición de VirB3 y VirB8. Sin embargo, la expresión en *trans* de VirB4 y VirB4_{K439R}, mutante en el Walker A, restaura los valores de expresión de VirB3 y VirB8 [89]. Por otra parte, la ausencia de VirB4 o su mutación en el motivo Walker A, impide la detección de VirB6, VirB8, VirB2 y VirB9 [29]. Estos datos sugieren que el sitio activo de VirB4 es esencial para la transferencia del sustrato, pero no para la formación del *pilus*. Otros estudios también describen interacciones de VirB4 con VirB1, VirB8 y VirB10. Esto, unido al hecho de que es una de las primeras proteínas en aparecer durante el proceso de formación del sistema, le da un papel de nucleación del T4SS [90].

Atendiendo a estos estudios, se ha postulado una secuencia de interacciones que podría ser compatible con un posible papel de la proteína en el proceso de formación del *pilus* en *A. tumefaciens*. En dicho modelo, VirB4 interaccionaría con VirB6 y VirB8. Después interaccionaría con VirB11 y ayudaría a VirB4 a transportar el ADN a través del canal [53]. Ensayos de interacción mediante doble híbrido en *A. tumefaciens* sugieren secuencias en el CTD de VirB4 (entre los residuos 400 y 500) y en el NTD de VirB11 (residuos 1-110) implicadas en su interacción [53] (Fig. 1.19).

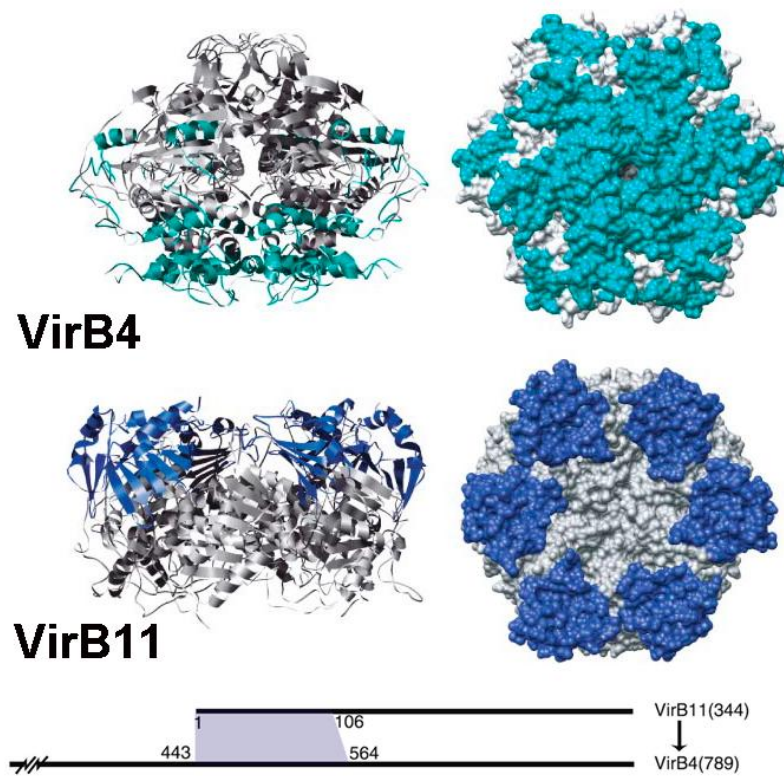


Figura 1.19. Posibles dominios de interacción entre VirB4 y VirB11.

Representación de la estructura hexamérica de VirB11 y del CTD de VirB4, con su posible zona de interacción. En verde azulado, el mapeado mediante la técnica de doble híbrido de los aminoácidos propuestos en VirB4 para su interacción. En azul, el mapeado del NTD de VirB11. Modificada de [53].

1.5.5. Estructura

La estructura de las proteínas VirB4 aún se desconoce, ya que se han resistido a extensos esfuerzos de cristalización en varios de sus homólogos. El modelado atómico de la proteína revela un alto grado de homología estructural del CTD con las proteínas VirD4. Concretamente, utilizando la estructura cristalográfica de TrwB de R388 (1e9r.pdb) como molde para efectuar el modelado informático de la proteína [48, 53] (Fig. 1.20). Además de con TrwB, los programas de modelado estructural encuentran también altos valores de similitud con FtsK.

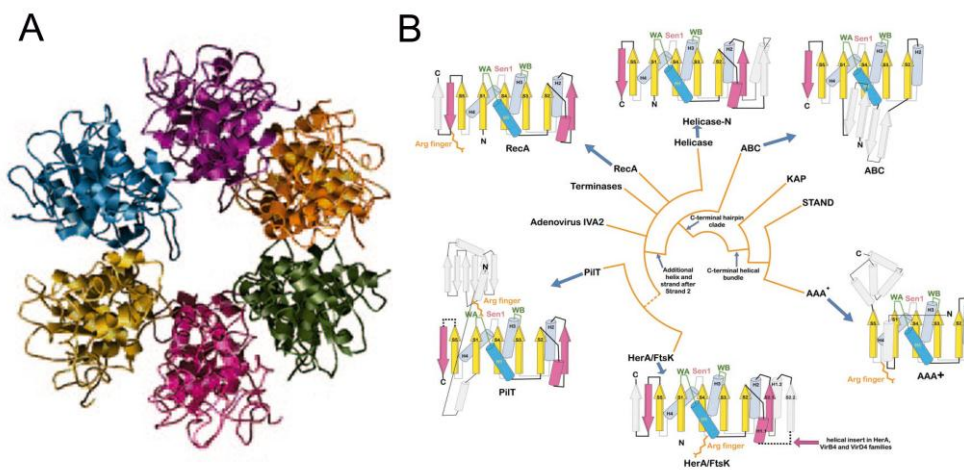


Figura 1.20. Análisis estructural y relaciones filogenéticas de las VirB4.

(A) Modelado estructural mediante *molecular threading* de VirB4_{CTD} de *A. tumefaciens* usando como referencia la estructura cristalográfica de TrwB (1e9r.pdb). Tomada de [50].

(B) Diagrama de la topología de diversas *p-loop* NTPasas en el cual se incluye a las VirB4 en la superfamilia HerA/FtsK. Tomada de [78].

Por el contrario, no se han observado similitudes estructurales fiables del NTD con ninguna proteína o dominio cristalizado. No obstante, se han llevado a cabo aproximaciones más indirectas para conocer su estructura, como por ejemplo, utilizando TraB de pKM101. Dicha proteína entera, así como sus dominios N y C-terminal, han sido analizadas mediante SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*), obteniendo una estructura constituida por dímeros en los tres casos, por lo que se ha especulado que monómeros extendidos interaccionarían "abrazándose" entre sí [87].

Atendiendo a la similitud estructural entre el dominio CTD de las VirB4 y TrwB o FtsK_{CTD}, se han realizado estudios filogenéticos de las VirB4 en los que aparecen altamente relacionadas con translocasas de ADN de cadena simple y doble de la familia RecA, implicadas en diferentes funciones biológicas (segregación cromosómica, esporulación o conjugación) [77, 78], (Fig. 1.21).

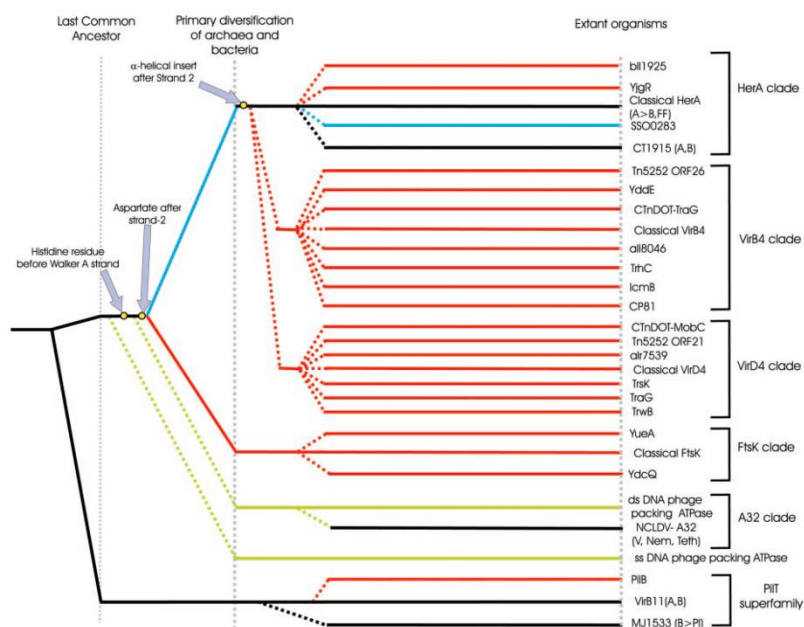


Figura 1.21. Estudio filogenético de la superfamilia HerA/FtsK.

Las líneas horizontales representan las dos transiciones más importantes en la evolución. Los linajes bacterianos están representados en rojo, los de arqueas en azul y los víricos en verde. Tomada de [78].

Resulta interesante que, al igual que las VirB4, el tamaño y la topología de las proteínas de la familia FtsK/SpoIIIE son altamente variables, pudiendo poseer dominios transmembrana en su extremo N-terminal. La posesión de diferentes dominios, tanto en su NTD como en su extremo C-terminal, podría ser la característica que haría divergir, tanto en su localización celular, como en su función y su unión a diferentes sustratos, a los miembros de la familia HerA/FtsK de las VirD4 y VirB4 (Fig. 1.22).

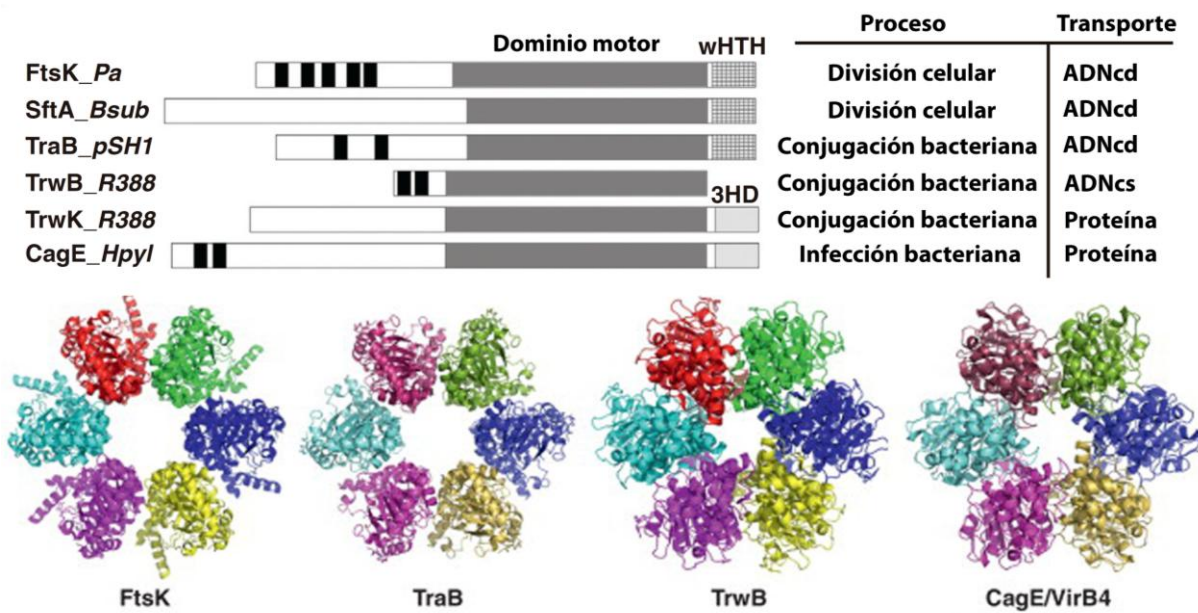
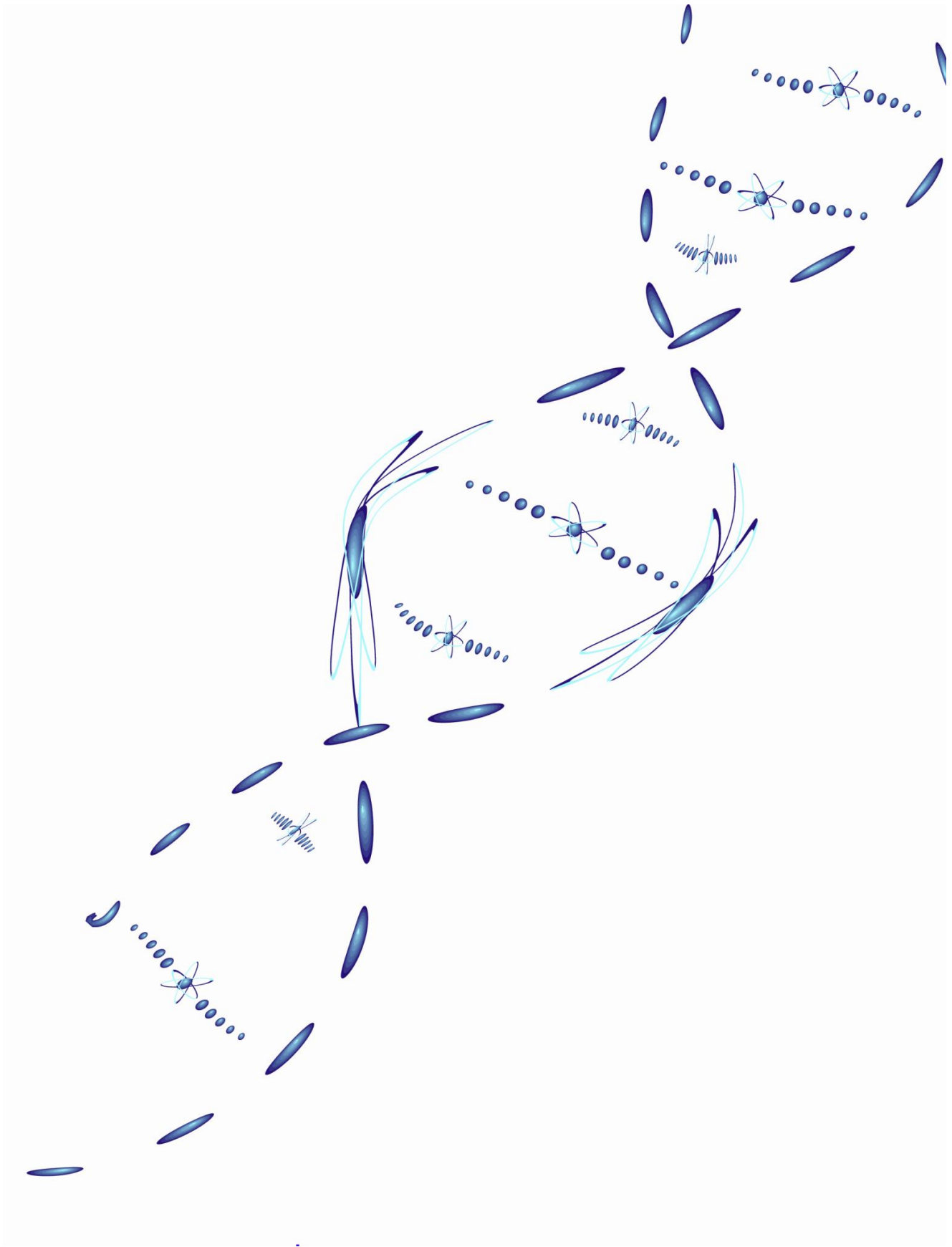


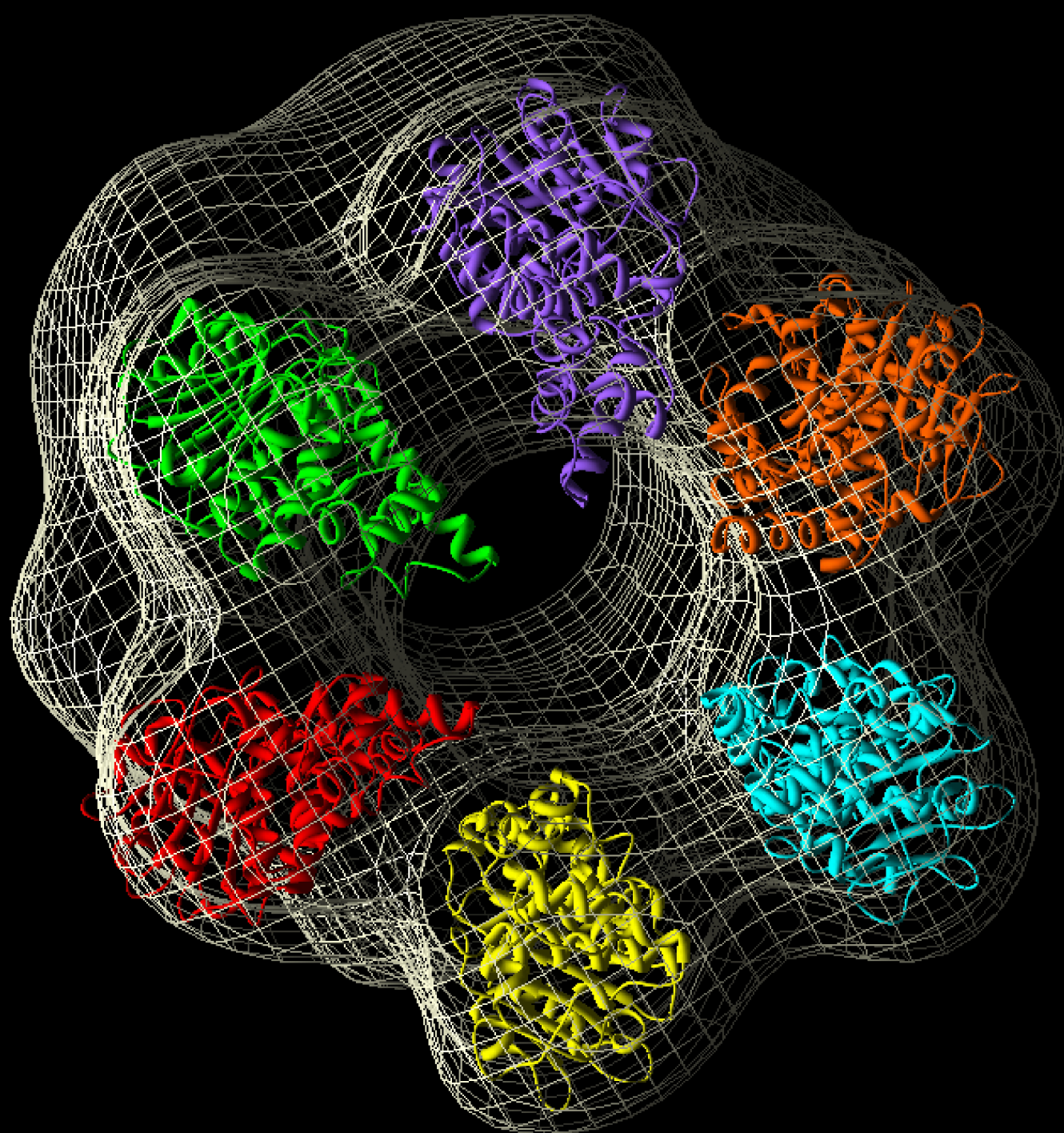
Figura 1.22. Estructura de los dominios de translocadores de proteínas y ADN asociados a membrana.
Comparación esquemática entre FtsK de *P. aeruginosa*, SftA de *Bacillus subtilis*, TraB del plásmido pSVH1 de *Streptomyces venezolae*, TrwB del plásmido R388, y TrwK y CagE, homólogos de VirB4 en R388 y *H. pylori*, respectivamente.
Panel superior: las barras negras, hélices transmembrana del segmento N-terminal obtenido mediante el predictor TMHMM, el dominio motor común a todas las proteínas está coloreado en gris. Los transportadores de ADN de cadena doble contienen un CTD con el motivo *helix-turn-helix* (HTH), el cual está ausente en TrwB. Las proteínas VirB4 presentan un dominio diferente en su extremo C-terminal, formado por tres α -hélices (3HD).
Panel inferior: comparación de la estructura cristalográfica de FtsK_{CTD}, TraB, TrwB y del modelado estructural de VirB4_{CTD}. Tomada de [77].



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 2.1. Caracterización bioquímica y funcional de TrwK.
- 2.2. Estudio de los mecanismos de regulación de la actividad de TrwK.
- 2.3. Estudio comparativo a nivel estructural, bioquímico y filogenético de TrwK y TrwB para establecer posibles relaciones evolutivas entre TrwK y translocadores de ADN.
- 2.4. Resolución de la arquitectura estructural de TrwK mediante microscopía electrónica.



MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas y plásmidos usados en este estudio

Plásmido	Descripción	Fenotipo	Referencia
pET3a	Vector de expresión	Ap ^R , Cm ^R , Rep (pMB8)	[92]
pET28a	Vector de expresión	Km ^R , Rep (pMB8)	[93]
R388	Plásmido conjugativo	Su ^R , Tp ^R , Tra ⁺ , IncW	[94]
R6K	Plásmido conjugativo	Ap ^R , Sm ^R , Tra ⁺ , IncX	[95]
pSU4133	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwK</i>	Km ^R , Tp ^R	[55]
pMEC1	pET3a::trwBΔN70(W216A)	Ap ^R , Rep (pMB8)	[46]
pSU4637	pET3a::trwBΔN70	Ap ^R , Rep (pMB8)	[69]
pSU4639	pET3a::trwBΔN70(K136T)	Ap ^R , Rep (pMB8)	[69]
pJR01	pET3a::trwD	Ap ^R , Rep (pMB8)	[49]
pSAN1	pET3a::trwK	Ap ^R , Rep (pMB8)	[48]
pSAN2	pET28a::trwK	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN3	pET3a::trwK(K457T)	Ap ^R , Rep (pMB8)	[48]
pSAN4	pET3a::trwK(D654A)	Ap ^R , Rep (pMB8)	[48]
pSAN5	pET3a::trwK_413-772	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN6	pET28a::trwK_413-772	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN7	pET3a::trwK_Δ402	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN8	pET28a::trwK_Δ402	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN9	pET3a::trwK_413-823	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN10	pET28a::trwK_413-772(D654A)	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN11	pET3a::trwK_1-772	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN12	pET3a::trwK_1-772(D654A)	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN13	pET28a::trwK_1-772	Km ^R , Rep (pMB8)	[51]
pSAN14	pET28a::trwK_1-772(D654A)	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN15	pET3a::trwK_1-787	Ap ^R , Rep (pMB8)	[51]
pSAN16	pET3a::trwK_1-801	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN17	pET28a::trwK_1-787	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN18	pET28a::trwK_1-801	Km ^R , Rep (pMB8)	[51]
pSAN19	pET28a::trwK_413-823	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN20	pET3a::trwM+trwK	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN21	pET3a::trwM-trwK	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN30	pET3a::trwK(D576A_D578K)	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN40	pET3a::trwK_178-823	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN41	pET28a::trwK_178-823	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN42	pET3a::trwK_1-375	Ap ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN43	pET28a::trwK_1-375	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo
pSAN44	pET28a::trwK_1-413	Km ^R , Rep (pMB8)	Este trabajo

Tabla 3.1. Plásmidos usados en este estudio.

Cepa	Genotipo	Referencia
C41(DE3)	<i>F- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal λ</i> (DE3)	[96]
DH5α	<i>F-supE44lacU169(f80lacZDM15) hsdR17 recA1endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[97]
BL21(DE3)	<i>F- ompT hsdS- gal</i> (DE3)	[98]
D1210	<i>F- recA hspR hsdM rpsL Laqlq</i>	[99]
DY380	<i>λcl857 (cro-bioA) tet</i> (DH10B)	[100]
UB1637	<i>F- lys his trp rpsL recA56</i>	[101]
C43(DE3)	<i>F- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal λ</i> (DE3)	[96]

Tabla 3.2 Cepas usadas en este estudio.

3.2. Técnicas de clonaje y crecimiento celular

3.2.1. Medio de crecimiento y agentes de selección

Para el crecimiento de cultivos bacterianos fue usado el medio Luria-Bertani (LB) (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl) suplementado con agar 1.5 % (p/v) para cultivos sólidos. En el caso de crecimiento selectivo, los antibióticos usados fueron: ácido nadilíxico (Nx) 25 µg/ml (Sigma-Aldrich), ampicilina (Ap) 100 µg/ml (Britapén Beecham), cloranfenicol (Cm) 25 µg/ml (Sigma-Aldrich), estreptomicina (Sm) 300 µg/ml (CEPASA), kanamicina (Km) 25 µg/ml (Sigma-Aldrich) y trimethoprim (Tp) 10 mg/l (Sigma-Aldrich).

3.2.2. Extracción y purificación de ADN

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). En el caso de la purificación de fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR, el GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). En la extracción de ADN de geles de agarosa, el kit GenElute Agarose Spin Columns (Sigma-Aldrich).

Las concentraciones de ADN obtenidas para cada uno de los casos fueron medidas con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

3.2.3. Preparación de células competentes

Se crecieron 10 ml de un inóculo de células en LB a 37 °C *o/n*. Se llevaron a un volumen de 200 ml de medio fresco (dilución 1/20) y se crecieron hasta una densidad óptica entre 0.5 y 0.7 a 600nm. Se incubaron en hielo 30 min y se centrifugaron 15 min a 5000xg, a 4 °C. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de agua MiliQ estéril y se centrifugaron en las mismas condiciones. Se repitió dos veces el último paso. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en el mismo volumen de agua MiliQ con glicerol al 10 % (p/v). Se repitió la centrifugación y se descartó el sobrenadante dejando 1 ml para resuspender las células. Se alicuotaron las células en fracciones de 60 µl congeladas en un baño de hielo seco con etanol y se almacenaron a -80 °C.

3.2.4. Construcción de mutantes

3.2.4.1. Digestión

Este proceso se llevó a cabo en el caso de la extracción de genes de un vector de clonaje para insertarlos en otro distinto. Se usaron las enzimas compatibles con los dos vectores para digerirlos. El inserto digerido se ligaba con el vector de destino. En la mayoría de los casos, el cambio se produjo desde el vector pET3a al pET28, creando los nuevos plásmidos por digestión directa con las enzimas NdeI y BamHI.

3.2.4.2. PCR

Este proceso se llevó a cabo en el caso de extraer un gen de su plásmido salvaje para ser insertado en vectores de expresión y clonaje. Para genes que fuesen de una dimensión cercana a las 1000 pb, se usó una sola PCR añadiendo, en la secuencia de ambos oligonucleótidos, las dianas de restricción específicas para su inserción en el plásmido deseado.

3.2.4.3. Doble PCR

En genes de longitud mayor a 1000 pb, se usaron dos reacciones de PCR. En la primera, se originaba un fragmento de PCR con los oligonucleótidos situados uno al principio del gen y otro en la zona intermedia. Este fragmento de PCR sería usado como oligonucleótido de inicio, junto con el oligonucleótido de la zona terminal del gen, para amplificar de esta manera el gen entero. Para la creación de mutaciones puntuales en zonas específicas de un gen, se seguía la estrategia de dos reacciones de PCR, generando en la primera las mutaciones deseadas, usando oligonucleótidos con dichas mutaciones.

Tras obtener el fragmento de ADN deseado, se ligaba en el vector requerido. Una vez inactivada la ligasa, se procedía a la microdiálisis del ADN mediante filtros de 20 µm de poro (Amersham) para disminuir la concentración de sales. Posteriormente, el plásmido con el inserto deseado se electroporaba en células competentes (Micropulser BIORAD). El resultado de la electroporación se llevaba a un mililitro de medio LB fresco y se incubaba durante una hora a 37 °C en agitación para que las células expresasen sus genes de resistencia. Un volumen de 100 µl de dicho medio se cultivaba en placas de LB con el antibiótico de selección para cada plásmido y cepa.

Nombre	Secuencia
TrwK ini	TATCATATGGGGGCAATTGAATCCC
TrwK fin	TTTGGATCCTCATACGTCGCTCCTTTTCG
TrwK 412ini	TGTCATATGGCGGTCACGATTCTCAAG
TrwK 413ini	TTGGAGGCATATGGTCACGATTCT
TrwK 442ini	TGTCATATGCTGCTCGGTAACACCA
TrwK Phe600ini	TTCGACAACCCGACTGATGCC
TrwKdelta400	TAATCATATGTCGGGCAAGCCGACT
TrwKdelta400ini(2)	TATCATATGCATAATTTTCATGTCGGGCAAG
NotI TrwK	TGGCAATGGCGGCCGCGTC
PilX3 ini	GCGTACACCGGTCATGATC
PilX4 ini	TGCCCCATATGAGTACCGTTTTTAA
Age1_K677A	GTGGACAATCATATGAAGCTG
TrwK_K458T_rev	GCAGCACCGTGGTACCGGAGCT
TrwK_K458A_rev	GCAGCACCGTGGCACCGGAGCT
TrwK_D654A_rev	TCCAGAACTCGGCAAACACGTACA
TrwK_E655A_rev	GGCTTCCAGAACGCGTCAAACACG
TrwK770fin	TCAGGATCCACCGTCTCACCATCGA
TrwKfin772rev	TTTGGATCCTCACGTCTCACCATCGA
AgeI TrwK_rev	ATCATGACCGGTGTACGCGCTTCGG
K457A_Rev	GCAGCACCGTTGCACCGGAGCT
K677A_Rev	CGTTTTGCGCACGGATGG
PilX4fin_fusión	TTTGGATCCTTATTTGATCCACGG
PILX4 Final	GGATCCTATTTGACTCCACGG
TrwK_787_fin	TAAGGATCCCGTGCCGACAGCAC
TrwK_801_fin	TTTGGATCCGACTTCGGCAATAATG
TrwK_Leu375STOPrev	TCATGGATCCTCACAGTTGCGCC
TrwK_1-413fin	TTGGGGGCCTAGGATCCCGATTCT

Tabla 3.3. Oligonucleótidos usados para la creación de los distintos mutantes.

3.2.5. Ensayos de conjugación

Para realizar dichos ensayos, se eligieron UB1637 como cepa receptora, y D1210 o DH5 α como cepas donadoras. Los plásmidos requeridos eran electroporados en bacterias donadoras que contenían los plásmidos R388 y/o pSU4133, una variante de R388 deletérea en la producción del gen *trwK*. A su vez, a estas bacterias donadoras se les electroporaba un plásmido pET3a con las construcciones deseadas.

En los ensayos de complementación, se usaron distintos plásmidos (pET) con varias construcciones de la proteína, electroporadas en los donadores con pSU4133 para determinar la capacidad de dichas construcciones de complementar la actividad de TrwK durante la conjugación.

Para los ensayos de dominancia negativa, las células en las que se electroporaban las diferentes construcciones de *trwK*, contenían el plásmido R388 salvaje.

3.3. Técnicas bioquímicas

3.3.1. *Western blot*

Las muestras de proteínas se corrieron en geles desnaturalizantes con SDS. Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa durante 1 h a un amperaje constante de 400 mA. Para testar la eficiencia de la transferencia se tiñó la membrana con *rojo ponceau*. La membrana se bloqueó en presencia de leche al 10 % (p/v) diluida en TBS-T (Tris-buffered saline + Tween), a temperatura ambiente durante 1 h con el fin de evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario, en 1 % (p/v) de leche en TBS-T, en diferentes diluciones, dependiendo de la naturaleza de la muestra (proteína purificada o extracto celular) y de la eficiencia del anticuerpo. El tiempo de incubación del anticuerpo varió también en función de su eficiencia y de la temperatura de incubación, desde 1 h hasta *o/n*. Finalmente, se añadió el anticuerpo secundario y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y a concentraciones entre 1:1000 y 1:10000. Para anticuerpos conjugados con reactivo peroxidasa, se le usó el reactivo ECL (ECL Western Blotting Analysis System Amersham Biosciences) y se analizó su señal con películas fotográficas. En el caso de anticuerpos conjugados con fluoróforos (Donkey anti-rabbit IR-Dye 800 y 680 CW), se analizaron usando el escáner Odyssey (LI-COR Biosciences).

3.3.2. Purificación de anticuerpos a partir de suero de conejo

Se cargó un SDS-PAGE con la máxima cantidad de antígeno posible (proteína purificada). Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se tiñeron las bandas con *rojo ponceau* para cortarlas e introducirlas en un tubo estéril. Se añadió PBS-T (Phosphate Buffered Saline + Tween) en 10 % (p/v) de leche en polvo y se incubó 2 h a temperatura ambiente (ó 4 °C *o/n*). Se lavó 5 min con PBS-T y se repitió cuatro veces el lavado. Se añadió un volumen de suero de conejo por cuatro volúmenes de PBS-T y se incubó 2 h a temperatura ambiente (ó 4 °C *o/n*). Se lavó 5 min con PBS-T y se repitió cuatro veces el lavado. Se añadió a la membrana 400 µl de glicina 100 mM pH 2.5 e incubó 10 min. Se mezcló el eluido de glicina con 50 µl de Tris pH 1 M 8.0. Se repitieron los pasos de lavado con glicina cuatro veces. Se comprobaron las fracciones obtenidas mediante *western blot*.

3.3.3. Tinción de plata

Para la fijación, el gel se incubó con 400 ml de una solución de 40 % metanol y 10 % ácido acético (v/v) durante 30 min. Se cambió al mismo volumen de una solución con 10 % etanol y 5 % ácido acético (v/v) durante 15 min. Se repitió el último paso. Se retiró la solución fijadora y añadieron 200 ml de reactivo oxidante, con el cual se incubó durante 3 min. Se lavó con 400 ml de agua desionizada durante 5 min. Se repitió tres veces el lavado y se añadieron 200 ml de la solución de plata durante 20 min. Se lavó con 400 ml de agua desionizada durante 1 min y añadió el revelador, 200 ml, durante 30 s. Se lavó con revelador durante 5 min dos veces. La reacción se paró con 400 ml de ácido acético 5 % (v/v).

3.3.4. Purificación de proteínas

3.3.4.1. Proteínas solubles

La expresión de las proteínas fue inducida mediante la adición de 1 mM de IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) cuando el cultivo estaba a una densidad óptica a 600nm de 0.6. Tras 6 h de inducción, las células fueron recogidas y resuspendidas en 20 ml de un tampón con 20 mM espermidina, 200 mM NaCl, y 1 mM EDTA, para ser almacenadas a -20 °C. Las células se descongelaron y resuspendieron en un tampón con 50 mM Tris pH 7.6, 10 % sacarosa, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.01 % PMFS, 240 μ l de benzamidina 0.5 M y una pastilla de mezcla de inhibidores (complete EDTA-free, Roche). Las células fueron lisadas con 100 μ l de lisozya 0.2 g/l y se agitaron 10 min en hielo. Este paso se repitió dos veces. Posteriormente se añadieron 20 ml de un tampón con 50 mM Tris pH 7.6, 1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, y 0.6 % (p/v) Tritón X-100. La mezcla fue agitada 10 min en hielo, sonicada y ultracentrifugada a 120000 xg. El sobrenadante de la ultracentrifugación fue diluido cuatro veces en un tampón con 50 mM Tris pH 7.6, 2mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.001 % PMFS y 50 mM de NaCl, para llegar a una concentración total de 125 mM NaCl. La muestra se cargó en una columna SP-Sepharose (5 ml) (Amersham Biosciences). Se recuperó el volumen que no se pega a la columna. Posteriormente la muestra fue diluida en el mismo tampón hasta alcanzar una concentración de 83 mM NaCl. Dicho volumen fue cargado en una columna Q-Sepharose (5 ml) (Amersham Biosciences). La muestra quedó retenida en la columna. Para eluirla se hizo un gradiente en veinte volúmenes de columna (GE-Healthcare) de 0-40 % de tampón "B" (50

mM Tris pH 7.6, 2mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.001% PMFS y 1 M de NaCl) usando un ÄKTA purifier. Las muestras enriquecidas en la proteína aparecen entre 200 y 300 mM de NaCl. Dichas muestras fueron cargadas en una segunda columna Q-Sepharose siguiendo un gradiente de 0-20 % de tampón “B” en dos volúmenes de columna, de 20-40 % en 20 volúmenes de columna y de 40-100 % en dos volúmenes de columna. Las muestras enriquecidas en la proteína fueron concentradas en un centricon (Amicon Ultra. Millipore) hasta un volumen final de 500 µl e inyectadas en una columna de tamizado molecular Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences) equilibrada anteriormente en un tampón 50 mM Hepes pH 7.2, 150 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA y 10 % glicerol. Las muestras obtenidas fueron alicuotadas y conservadas a -80 °C.

3.3.4.2. Proteínas con colas de histidinas

En el caso de las proteínas clonadas con colas de histidinas, las condiciones de lisado fueron las descritas en el apartado anterior. Una vez ultracentrifugada la muestra, el volumen fue llevado a 50 mM de imidazol. Dicho volumen fue cargado en una columna Ni-His Trap (Amersham Biosciences) previamente equilibrada con un tampón con 50 mM Tris pH 7.6, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.001 % PMFS, 50 mM imidazol y 200 mM NaCl. Las muestras fueron eluidas siguiendo un gradiente de ocho volúmenes de columna con un tampón “B” que contenía 50 mM Tris pH 7.6, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.001 % PMFS, 500 mM de imidazol y 200 mM NaCl. Las muestras enriquecidas con la proteína eluían a una concentración entre 200 y 300 mM de Imidazol. Dependiendo de su pureza, la proteína era diluida hasta 50 mM de NaCl en un tampón con 50 mM Tris pH 7.6, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.001 % PMFS, cargada en una columna Q-Sepharosa y eluida en un gradiente de sal de ocho volúmenes de columna con un tampón con 50 mM Tris pH 7.6, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.001 % PMFS y 1 M de NaCl.

Las muestras enriquecidas en la proteína de interés fueron concentradas en un centricon (Amicon Ultra. Millipore) y cargadas en una columna de tamizado molecular Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences) equilibrada anteriormente en un tampón 50 mM Hepes pH 7.2, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA y 10 % glicerol. Las muestras obtenidas fueron alicuotadas y conservadas a -80 °C.

3.3.4.3. Proteínas que forman cuerpos de inclusión

En el caso de las proteínas que formaban cuerpos de inclusión, el paso de lisado era el descrito anteriormente, exceptuando el paso de la ultracentrifugación. Una vez lisadas las células, se centrifugaron a 5000 xg durante 10 min, para desechar las células que no se habían roto. Una posterior centrifugación a 27000 xg situaría a los cuerpos de inclusión en el *pellet*. Dicho *pellet* se solubilizó en 40 ml de un tampón que contiene 50 mM Tris pH 7.6, 6 M cloruro de guanidinio, 0.1 mM EDTA, 50 mM imidazol y 200 mM NaCl. La muestra, previamente sonicada, se cargó lentamente en una columna Ni His-Trap equilibrada con el anterior tampón de solubilización. La columna se llevó a un tampón igual que el anterior, sin cloruro de guanidinio, retirándolo gradualmente hasta llegar a eliminarlo de la columna y favoreciendo así el correcto plegamiento de la proteína aún anclada a la columna. Posteriormente, la columna se llevó a un tampón con 500 mM de imidazol para eluir la proteína. Las muestras enriquecidas en la proteína fueron cargadas en una columna de tamizado molecular Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences) equilibrada en un tampón 50 mM Hepes pH 7.2, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA y 10 % glicerol. Las muestras obtenidas fueron alícuotadas y conservadas a -80 °C.

3.3.5. Fraccionamiento de membranas

Las células se resuspendieron en un tampón con 50 mM Tris pH 7.6, 10 % sacarosa, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA y 0.01 % PMFS. En el proceso de lisis se añadieron 100 µl de lisozima (0.2 g/l) a las células, agitando en hielo 10 min, y repitiendo este paso dos veces. Un volumen igual de agua pura se añadió lentamente sin dejar de agitar, para romper las células por ósmosis [102]. De esta manera, se previene la total destrucción de las fracciones de membrana.

La muestra se ultracentrifugó a 200.000 xg durante 40 min. El *pellet*, que contiene la fracción de membrana, se resuspendió en un tampón 50 mM Tris pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.01 % PMFS y 2 % SDS y se ultracentrifugó en las mismas condiciones. En este caso, el sobrenadante estará enriquecido en proteínas de membrana, ancladas y/o asociadas a membrana.

3.3.6. Ensayos de retardos de ADN

Formación del sustrato G4 intermolecular. El oligonucleótido 45-mer (TCGCCACGTTTCGCCGTTGCGGGGGTTTCTGCGAGGAACTTTGG), diluido a una concentración de 300 μ M, fue incubado *o/n* a 60 °C en un tampón 50 mM PIPES pH 6.2, 50 mM NaCl, 5 % glicerol y 150 mM NaAc. La mezcla fue incubada a 37 °C un día y enfriada hasta temperatura ambiente durante 2 h. La formación del G-*quadruplex* fue confirmada por cromatografía de filtración en gel.

Marcaje del ADN. El sustrato formado, a una concentración de 200 μ M, fue diluido 100 veces en su propio tampón de formación hasta lograr una concentración final de 2 μ M. Posteriormente fue marcado con ATP radiactivo mediante la T4 quinasa: 9.6 μ l G-*quadruplex* (para 1 μ M final) 2 μ l γ^{32} -ATP* (6000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences), 1 μ l T4 PNK, 2 μ l tampón quinasa y 5.4 μ l agua desionizada (DWE), para un volumen final de 20 μ l. La mezcla se incubó 1 h a 37 °C y 20 min a 65 °C para inactivar la quinasa. Se añadieron 30 μ l de DWE y se pasaron por una columna “Micro Bio-Spin™ 6 Chromatography Columns” (BioRad) para eliminar el ATP radiactivo no incorporado.

Mezcla de reacción. Se diluyó el ADN G-*quadruplex* 1/100 en su tampón de formación, hasta llevarlo a 10 nM. Se diluyó después en una mezcla de reacción que contiene 25 mM PIPES pH 6.45, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 μ g/ml BSA y 3 % glicerol, hasta una concentración final de 0.5 nM de ADN.

Carga en el gel. Para un volumen total de 20 μ l se añadieron 18 μ l de la mezcla de reacción y 2 μ l de proteína. La concentración de proteína dependerá de la afinidad de ésta por el sustrato. Antes de cargar el gel, se llevó a cabo un paso previo en el que el gel es sometido a un voltaje de 150 V durante 10 min para evitar posibles impurezas en los pocillos que impidan la correcta migración de los complejos proteína-ADN. Todos los geles fueron preparados al 7 %. En el caso del sustrato G-*quadruplex*, la reacción se corrió en el gel a 150 V durante 3 h, y durante 1 h en el caso de ADN de cadena simple.

3.3.7. Ensayos de hidrólisis de ATP

La capacidad de las proteínas para hidrolizar ATP se testó mediante un ensayo acoplado. En este ensayo se acopla la hidrólisis de ATP con la oxidación del NADH. Es un ensayo en el que el ATP no es limitante ya que se regenera mediante reacciones catalizadas por las enzimas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa [103]. Las proteínas fueron incubadas en 150 μ l de un tampón consistente en 50 mM PIPES pH 6.45, 75 mM KAc, 5% (p/v) glicerol, 10 mM MgAc₂, 1 mM NaAc, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM PEP, 0.25 mM NADH, 60 μ g/ml piruvato quinasa, 60 μ g/ml lactato deshidrogenasa y 5 mM ATP. En el caso de las titulaciones de ATP, su cantidad varió en un intervalo entre 0.1 y 5 mM. Las reacciones comenzaron con la adición de la proteína o, en los casos de proteínas que unen ADN, del complejo ADN-proteína. La actividad fue medida por el descenso de absorbancia del NADH a 340 nM durante 10 min a 37 °C en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).

3.3.8. Péptidos sintéticos

Para los ensayos de actividad ATPasa fueron usados distintos péptidos sintéticos (Peptide-2.0 Chantilly, VA), en complementación con la actividad de TrwK. Los péptidos contenían los últimos 21 aminoácidos de TrwK, 19 de la zona C-terminal de TrwC y los 20 últimos de TrwL. Fueron disueltos en 50 mM PIPES-NaOH pH 7.0, en el caso de los péptidos de TrwK y TrwC, y en 100 % de DMSO en el caso de TrwL, hasta una concentración final de 10 mM y fueron alicuotados y almacenados a -20 °C.

Péptido	Secuencia
TrwK_802-823	GDDPAVWLPFLDRVKAERSDV
TrwC_947-966	PAHDRQKAAREAERGMEAGR
TrwL_92-112	SIGVIIAGSAVQITAMLFT

Tabla 3.4. Péptidos sintéticos usados en los ensayos de inhibición.

3.3.9. Análisis por espectrometría de masas

Las bandas seleccionadas fueron escindidas manualmente del gel y sometidas a digestión con tripsina (Roche, Basel, Switzerland) de acuerdo con el método de [104] con modificaciones. Las muestras fueron analizadas mediante espectrometría de masas en cromatografía líquida (LC-MS/MS). Los espectros fueron adquiridos usando un espectrómetro de masas Q-ToF Micro (Waters, Milford, MA) interconectado con un sistema de cromatografía capilar CapLC (Waters). Alícuotas de 8 µl fueron cargadas en una columna Symmetry 300 C18 NanoEase Trap (Waters) conectada a una columna XBridge BEH130 C18 (Waters) equilibrada en 5 % acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico. Los péptidos fueron eluidos en un gradiente lineal de 10 a 60 % de acetonitrilo directamente sobre un emisor NanoEase (Waters). El espectro obtenido fue procesado usando el servidor ProteinLynx (Waters) y buscado en la base de datos del NCBI, usando el motor de búsqueda MASCOT (Matrixscience).

3.3.10. Análisis de interacciones TrwK-TrwB mediante *cross-linking*

Concentraciones de 125 µM de ambas proteínas fueron incubados durante 30 min con el agente *cross-linker* (*ethylene glycol-bis succinic acid N-hydroxysuccinimide ester*) (Sigma-Aldrich) y cargadas en una columna de filtración en gel Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences) equilibrada con 50 mM Pipes pH 6.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ y 0.1 mM EDTA. Las muestras fueron corridas en un gel SDS-PAGE transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos anti-TrwK y anti-TrwB (conejo). Las imágenes fueron obtenidas tras la incubación con anticuerpos secundarios IRDye anti-conejo IgG (cabra), a 800 nm para TrwB y 680 nm para TrwK, usando un escáner Odyssey (LI-COR Biosciences).

3.4. Microscopía electrónica

Alícuotas de proteína purificada (0.1-0.5 mg/ml) fueron aplicadas sobre rejillas de cobre cubiertas de carbono, activadas previamente a la aplicación de la muestra (Glow discharge EMITECH K100X). Las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo 2 % (p/v). Las micrografías fueron tomadas a una magnificación de 60000X en películas Kodak SO-163 usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200EX-II, operando a 100 kV. Las micrografías fueron digitalizadas en un escáner Zeiss SCAI a 14 Å de resolución, con un valor final de muestreo de 4.66 Å/píxel.

Para la localización del extremo N-terminal de TrwK, las proteínas fueron incubadas con partículas de oro de 5 nm conjugadas con Ni-NTA-Nanogold (Nanoprobes), en una relación 1:10 de hexámero de TrwK:Ni-NTA-Nanogold durante 30 min y aplicadas sobre las rejillas de cobre como en el apartado anterior. Las micrografías fueron tomadas a una magnificación de 150000X en una cámara GATAN modelo ORIUS SC 1000 CCD usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 operando a 80 kV, con un valor final de muestreo de 6.4 Å/píxel.

Las partículas seleccionadas fueron extraídas y normalizadas usando el programa de procesamiento de imágenes XMIPP [105]. El alineamiento y clasificación de partículas se realizó mediante métodos de máxima verosimilitud [106]. Para determinar la simetría de las partículas, se calculó el espectro rotacional de imágenes [107]. Para analizar la variabilidad de las imágenes se usó un algoritmo basado en una red neuronal de auto-organización (*self-organizing map* "SOM") [108, 109]. Los volúmenes de referencia usados en las reconstrucciones 3D fueron obtenidos mediante el programa EMAN [110], hasta que un volumen con la forma general del conjunto de medias de partículas se hiciera evidente. Para las subsecuentes iteraciones de refinamiento angular por retro-proyecciones de los volúmenes resultantes en cada iteración, se usó el programa XMIPP [105]. La resolución del volumen obtenido fue estimada usando el método de *Fourier Shell Correlation* [111]. Los volúmenes finales obtenidos, fueron posteriormente filtrados atendiendo a los valores de resolución calculados.

3.5. Modelado estructural

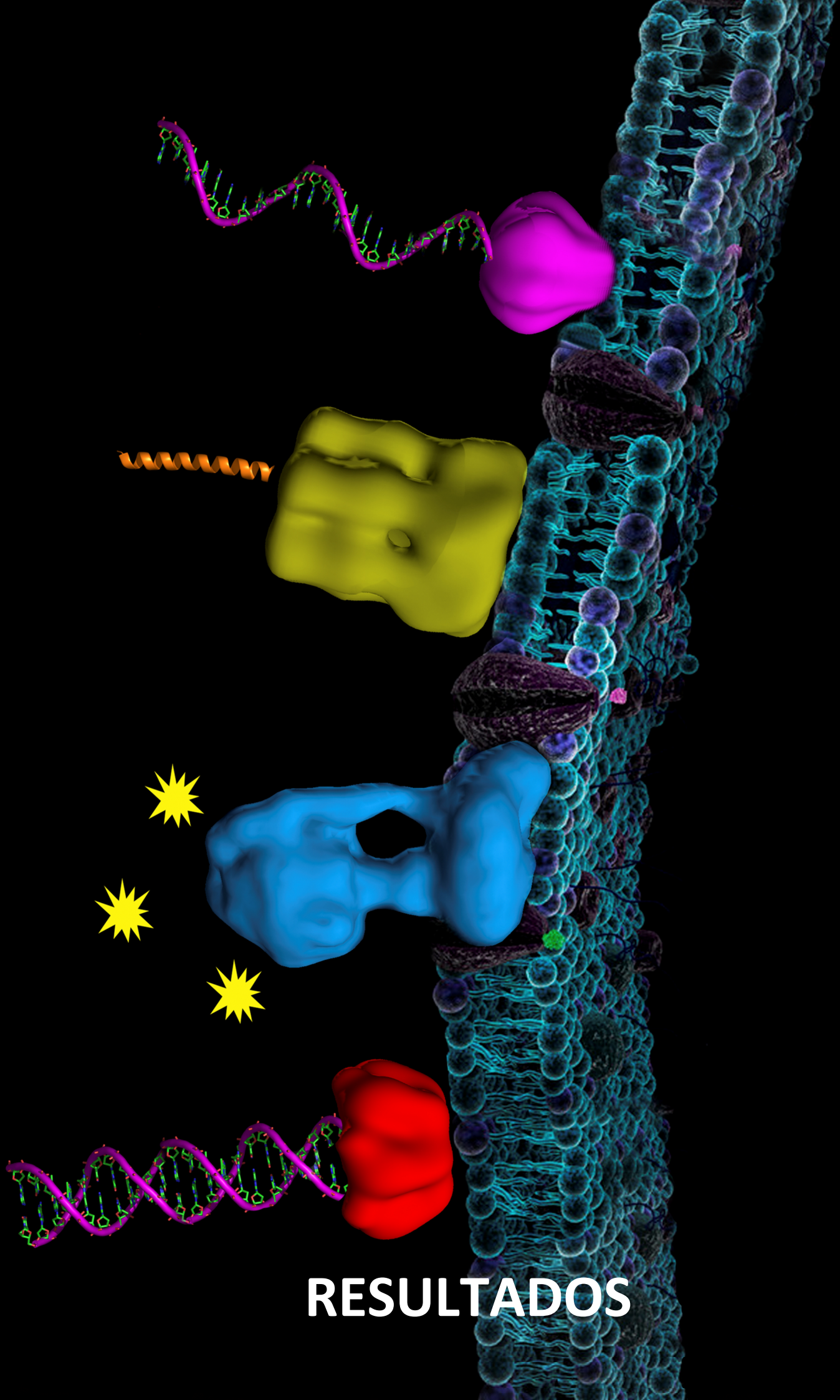
Para obtener información acerca de las características estructurales de TrwK se llevaron a cabo predicciones de estructura secundaria usando el programa Psi-Pred [112]. Para estudios de modelado de estructura terciaria, se usaron diferentes programas de predicción de estructura: Phyre [113] y Modeller [114]. Los resultados obtenidos de la predicción de estructura terciaria fueron contrastados con las predicciones de estructura secundaria para testar su precisión. Atendiendo a dicha comparación y a los valores de confianza ofrecidos por los distintos programas, fueron elegidos los modelos de estructura terciaria más adecuados. En el caso de todas las VirB4 analizadas, los modelos con mejores valores fueron los que usaban como molde a las translocasas de ADN TrwB (1e9r.pd) y FtsK (2iuv.pdb).

Para la visualización y análisis de los modelos se usó el programa Pymol [115] y para el alineamiento y ajuste con otras estructuras de referencia (TrwB y FtsK) y la construcción de hexámeros de TrwK, el programa Chimera [116].

3.6. Análisis bioinformáticos

Se han usado diferentes paquetes de programa para análisis y tratamiento de secuencias, predicción de estructura de proteínas y tratado de éstas, análisis informáticos, matemáticos y gráficos:

- i. Análisis y tratamiento de secuencias de ADN: Vector Nti suite 10.0 (Advance database, Invitrogen), Webbcutter, Primer3.
- ii. Análisis matemático: Sigmaplot
- iii. Tratamiento de gráficos: Photoshop.
- iv. Análisis de microscopía electrónica: (ver sección “Microscopía electrónica”).
- v. Análisis de estructura de proteínas: (ver sección “Modelado estructural”).



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Purificación y caracterización bioquímica de TrwK

La posible actividad ATPasa de las VirB4 ha sido estudiada por varios grupos en diferentes homólogos con resultados poco esclarecedores acerca de la capacidad de hidrolizar ATP por parte de estas proteínas. Concretamente, estudios realizados con TrwK no han sido capaces de demostrar actividad ATPasa en dicha proteína ni en su homólogo en el plásmido RP4 (TrbE) [82]. En esta tesis se demuestra por primera vez la capacidad de TrwK para hidrolizar ATP. Para ello se desarrolló un nuevo protocolo de purificación que permite obtener grandes cantidades de proteína pura (Fig. 4.1). Con esta proteína se determinó la actividad ATPasa de TrwK (Fig. 4.2) mediante un ensayo acoplado que permite la regeneración del sustrato ATP [103]. Mediante estos ensayos se determinaron los parámetros cinéticos de la actividad de TrwK ($V_{\max}$, $K_{m(ap)}$ y cooperatividad), así como el efecto de la variación en diferentes rangos de pH y de distintas sales.

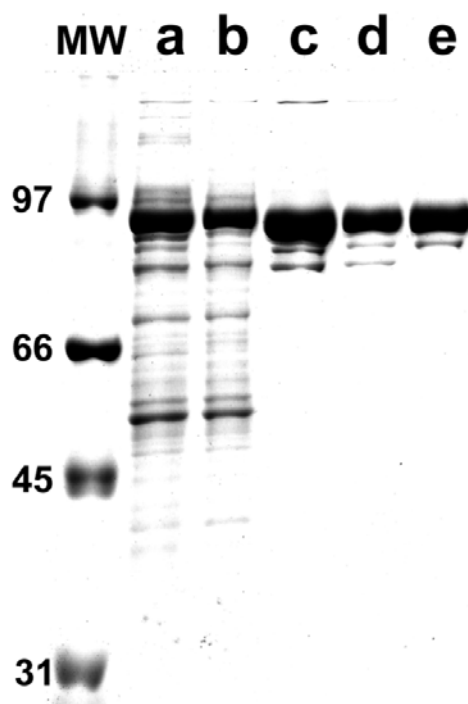


Figura 4.1. Purificación de TrwK.

Calle a, lisado celular; calle b, material no unido a SP-Sepharose; calle c, elución de Q-Sepharose; calle d, segunda elución de Q-Sepharose; calle e, elución de Superdex-200. MW kDa.

Los valores obtenidos fueron: una $V_{\max}$ de $48.4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Fig. 4.3A), una $K_{0.5}$ de 0.82 mM (K_m aparente de 0.7 mM) y un coeficiente de Hill de 0.5 para valores menores de 1 mM ATP y 0.75 para valores mayores (Fig. 4.3B). Este valor podría indicar una cooperatividad negativa para la hidrólisis del ATP si todos los sitios de unión fueran idénticos y la proteína tuviera una única estructura cuaternaria.

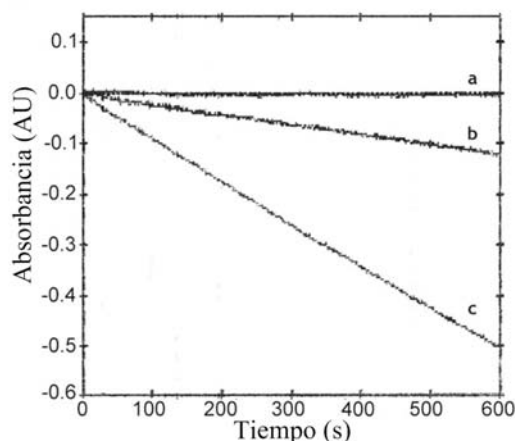


Figura 4.2. Actividad ATPasa de TrwK en diferentes rangos de sales y pH.

La actividad ATPasa fue medida en relación al descenso de absorbancia del NADH a 340 nm en presencia de 75 mM NaCl (b) o 75 mM KAc (c). El control negativo está representado en a.

Debido a las bajas velocidades obtenidas en presencia de MgCl_2 y NaCl, las sales de cloruro fueron sustituidas por las correspondientes sales de acetato (MgAc_2 KAc). En presencia de estas sales, los valores de hidrólisis de ATP se ven incrementados (Fig. 4.2, línea c).

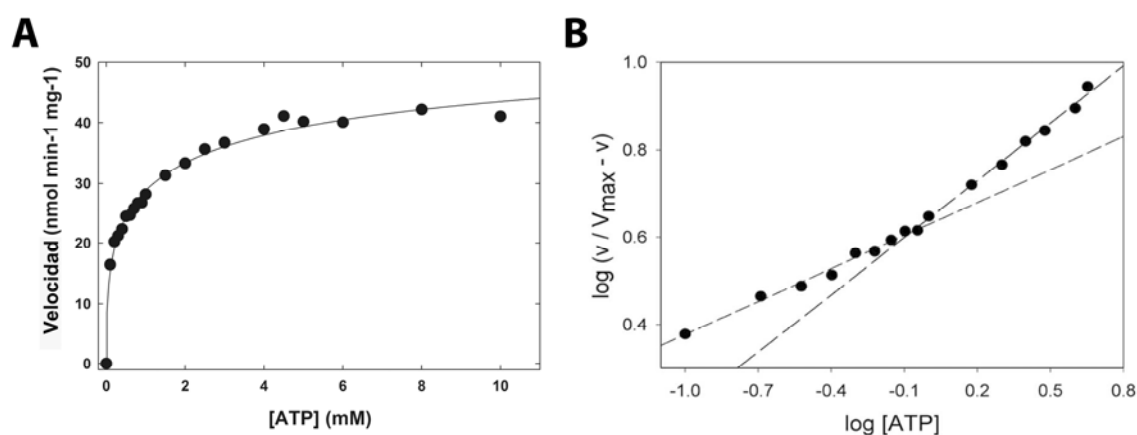


Figura 4.3. Análisis cinético de la hidrólisis de ATP por TrwK.

Los valores de hidrólisis de ATP están representados en función de la concentración de ATP (A).

La curva se ajusta a una ecuación de Hill, teniendo dos tramos definidos con coeficientes distintos (B).

Incrementando la concentración de sales, la actividad se veía reducida un 50 % a 300 mM de sales de acetato y a un 5 % a 600 mM (Fig 4.4A). En el caso de las sales de cloruro, a 75 mM sólo se alcanza un 15 % de actividad con respecto a las mismas condiciones con sales de acetato siendo prácticamente indetectable a altas concentraciones (Fig 4.4A). Estos datos sugieren que las sales de cloruro ejercen un efecto inhibitorio en la actividad de hidrólisis de ATP. De la misma manera, se estudió el efecto del pH en la actividad ATPasa. La velocidad máxima se obtenía a valores de 6.5 y se observaba un efecto inhibitorio a valores menores de 6 y mayores de 7.5 (Fig. 4.4B).

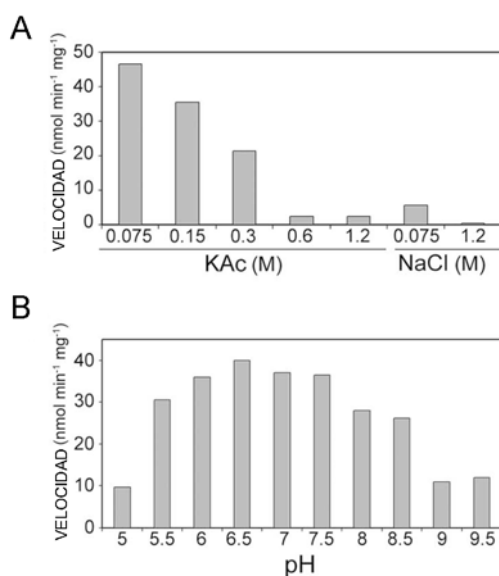


Figura 4.4. Caracterización del efecto del pH y las distintas sales en la actividad de TrwK.

(A) Actividad ATPasa en presencia de sales de acetato y de cloruro variando su concentración.

(B) Valores de la actividad ATPasa en un rango de pH entre 5 y 9.5.

Por otra parte, para excluir que dicha actividad ATPasa fuera causada por la existencia de algún contaminante en la purificación se llevaron a cabo dos estudios: mutaciones en los motivos Walker de la proteína y caracterización de la banda de la purificación que aparece debajo de TrwK, bandeando alrededor de 80 kDa (Fig. 4.1 calle e).

4.1.1. Análisis por espectrometría de masas

Las dos bandas que aparecen en la calle e de la figura 4.1 fueron extraídas del gel y sometidas a una digestión con tripsina y analizadas por espectroscopia de masas. El péptido de mayor tamaño (94 kDa) fue identificado como TrwK (Fig. 4.5A) y la banda de masa aparente de 80 kDa como un péptido formado por la degradación de TrwK (Fig. 4.5B). La comparación de la secuencia obtenida con las bases de datos revelaba que dicho péptido carecía de los primeros aminoácidos de la región N-terminal de TrwK, produciéndose un corte en la proteína en el residuo Arg173.

A	1	MGAIESRKLL	ASET	PVGQFI	PYSH	HVTDIT	ISTK	NAEYLS	VWKIDGRSHQ
	51	SASEADVFW	IRELN	NNTLRG	ISSAN	LSLWT	HIVRR	RVYFY	PDAEFDNVFC
	101	RQLDEKYRES	FTGYN	LMVND	LYLT	VVYRPV	SDKVL	SFFAK	RERETPDQKK
	151	HRQESCIKAL	EDINR	TLGQS	FKRYG	AEALLS	VYEKG	GHAFFS	APLEFLARLV
	201	NGEHIPMPIC	RDRFS	DYMAV	NRPMS	FKWGE	VGELR	SLTGL	RRFGMLEIRE
	251	YDDATEPGQL	NVLLE	SDYEF	VLTHS	SFVLS	RPAKE	YLRQ	HQKNLIDARD
	301	VATDQIEEID	EALNQL	ISGH	FVMGE	HHCTL	TVYGE	TVQQV	RDNLAHASAA
	351	MLDVAVLPPK	VDLAE	AGYW	AQLPA	NWQWR	PRPAP	ITSLN	FLSFSPFHNF
	401	MSGKPTGNPW	GPAVT	ILKTV	SGTPLY	FNHF	ASKEE	EDATD	KRLGNTMLI
	451	GQSSSGKTIVL	LGFLLA	QAQK	FKPTI	VAFDK	DRGME	ISIRA	MGGRYLPLKT
	501	GEPSGFNPFQ	LPPTHAN	LIF	LKQFV	KKLAA	AGGEV	THRDE	EEIDQAITAM
	551	MSDSIDKSLR	RLSLL	LQFLP	NPRSD	DMAR	PTVHA	RLVKW	CEGGDYGNLF
	601	DNPTDALDLS	THQIY	GFDIT	EFLDN	PEART	PVMML	LYRT	ESMIDGRRFM
	651	YVFDEFWKPL	QDEYF	EDLAK	NKQKT	IRKQN	GIFVF	ATQEP	SDALESNIAK
	701	TLIQQCATYI	FLANPK	ADYE	DYTQG	FKLTD	SEFEL	VRLG	EFSSRFLIKQ
	751	GQQSALAEMN	LKGFR	TIVDG	ETVER	DFDDE	LLVLS	GTDPN	AEIAESIIE
	801	VGDDPAVWLP	IFLDR	VKAER	SDV				

B	1	MGAIESRKLL	ASET	PVGQFI	PYSH	HVTDIT	ISTK	NAEYLS	VWKIDGRSHQ
	51	SASEADVFW	IRELN	NNTLRG	ISSAN	LSLWT	HIVRR	RVYFY	PDAEFDNVFC
	101	RQLDEKYRES	FTGYN	LMVND	LYLT	VVYRPV	SDKVL	SFFAK	RERETPDQKK
	151	HRQESCIKAL	EDINR	TLGQS	FKRYG	AEALLS	VYEKG	GHAFFS	APLEFLARLV
	201	NGEHIPMPIC	RDRFS	DYMAV	NRPMS	FKWGE	VGELR	SLTGL	RRFGMLEIRE
	251	YDDATEPGQL	NVLLE	SDYEF	VLTHS	SFVLS	RPAKE	YLRQ	HQKNLIDARD
	301	VATDQIEEID	EALNQL	ISGH	FVMGE	HHCTL	TVYGE	TVQQV	RDNLAHASAA
	351	MLDVAVLPPK	VDLAE	AGYW	AQLPA	NWQWR	PRPAP	ITSLN	FLSFSPFHNF
	401	MSGKPTGNPW	GPAVT	ILKTV	SGTPLY	FNHF	ASKEE	EDATD	KRLGNTMLI
	451	GQSSSGKTIVL	LGFLLA	QAQK	FKPTI	VAFDK	DRGME	ISIRA	MGGRYLPLKT
	501	GEPSGFNPFQ	LPPTHAN	LIF	LKQFV	KKLAA	AGGEV	THRDE	EEIDQAITAM
	551	MSDSIDKSLR	RLSLL	LQFLP	NPRSD	DMAR	PTVHA	RLVKW	CEGGDYGNLF
	601	DNPTDALDLS	THQIY	GFDIT	EFLDN	PEART	PVMML	LYRT	ESMIDGRRFM
	651	YVFDEFWKPL	QDEYF	EDLAK	NKQKT	IRKQN	GIFVF	ATQEP	SDALESNIAK
	701	TLIQQCATYI	FLANPK	ADYE	DYTQG	FKLTD	SEFEL	VRLG	EFSSRFLIKQ
	751	GQQSALAEMN	LKGFR	TIVDG	ETVER	DFDDE	LLVLS	GTDPN	AEIAESIIE
	801	VGDDPAVWLP	IFLDR	VKAER	SDV				

Figura 4.5. Análisis por espectrometría de masas de TrwK purificada.

Las bandas obtenidas tras la digestión con tripsina fueron procesadas usando ProteinLynx Global Server y contrastadas con la base de datos del NCBI usando el motor de búsqueda MASCOT. Las secuencias de aminoácidos de masas aparentes de 94 kDa (Panel A) y 80 kDa (Panel B) fueron identificadas como fragmentos de TrwK. La comparación de las secuencias en los paneles A y B muestra que en B faltan péptidos en el N-terminal sugiriendo un sitio de corte de la proteína en el aminoácido Arg173.

4.1.2. Análisis de la mutación en los motivos Walker A y B

Para estudiar si la actividad ATPasa observable era la intrínseca de TrwK, se mutaron los motivos Walker A y B, generando las variantes mutantes TrwK (K457T) y TrwK (D654A), respectivamente. Dichas proteínas fueron purificadas y su actividad *in vitro* fue medida en las mismas condiciones que la proteína salvaje, sin observar actividad alguna en el mutante del Walker B (dato similar a la figura 4.2, línea a) y una reducción del 70 % de actividad en el mutante del Walker A. Estos resultados corroboraban los obtenidos en los ensayos *in vivo*, en los que el mutante en el motivo Walker B era incapaz de complementar un plásmido R388 deletéreo en la producción de TrwK (pSU4133) y el mutante en el Walker A disminuía su capacidad para conjugarse en un orden de magnitud (Tabla 4.1).

Plásmido donador	Variante de TrwK	Frecuencias de transconjugación
R388	Ninguna	3.93×10^{-1}
pSU4133	$\Delta trwK$	1.03×10^{-6}
pET3a	Control Negativo	4.44×10^{-7}
pSU4133 + pET3a	<i>trwK</i>	2.10×10^{-2}
pSU4133 + pET3a	<i>trwK_K457T</i>	4.78×10^{-3}
pSU4133 + pET3a	<i>trwK_D654A</i>	7.04×10^{-6}

Tabla 4.1. Frecuencias de conjugación de los mutantes en los motivos Walker A y B de TrwK.

Células donadoras (*E. coli* K12 cepa DH5 α) con los plásmidos de la primera columna fueron unidas con la cepa donadora UB1637. Las frecuencias de conjugación de los transconjugantes fueron seleccionadas en placas de estreptomycin y trimethoprim

Como se muestra en la tabla 4.1, la proteína TrwK salvaje era capaz de complementar dicho plásmido, restituyendo las frecuencias de conjugación originales hasta niveles similares a los obtenidos con el plásmido salvaje. Sin embargo, el mutante en el motivo Walker B generaba una proteína incapaz de conjugarse. Este resultado indica que dicha mutación de TrwK produce una proteína inactiva en el proceso de conjugación al carecer de su actividad ATPasa. Las bajas frecuencias de conjugación del mutante Walker A se corresponden también con la disminución en su actividad ATPasa. Además, se obtuvieron también datos similares *in vivo* con el mutante del motivo Walker A en el homólogo de VirB4 en RP4, TrbE [82].

4.2. Caracterización del estado oligomérico y topología de TrwK

4.2.1. Estudios sobre el estado oligomérico de TrwK por ultracentrifugación analítica

Trabajos previos realizados en homólogos de VirB4 no eran capaces de ofrecer una única visión acerca del estado oligomérico de estas proteínas. Varios autores utilizando distintos homólogos obtenían resultados diferentes definiendo a sus proteínas de estudio principalmente como monómeros, dímeros y hexámeros [82, 117].

En este trabajo, se analizó el estado oligomérico de TrwK, así como la relación con su actividad ATPasa. El estado de asociación y el grado de homogeneidad de TrwK fueron determinados por la velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica.

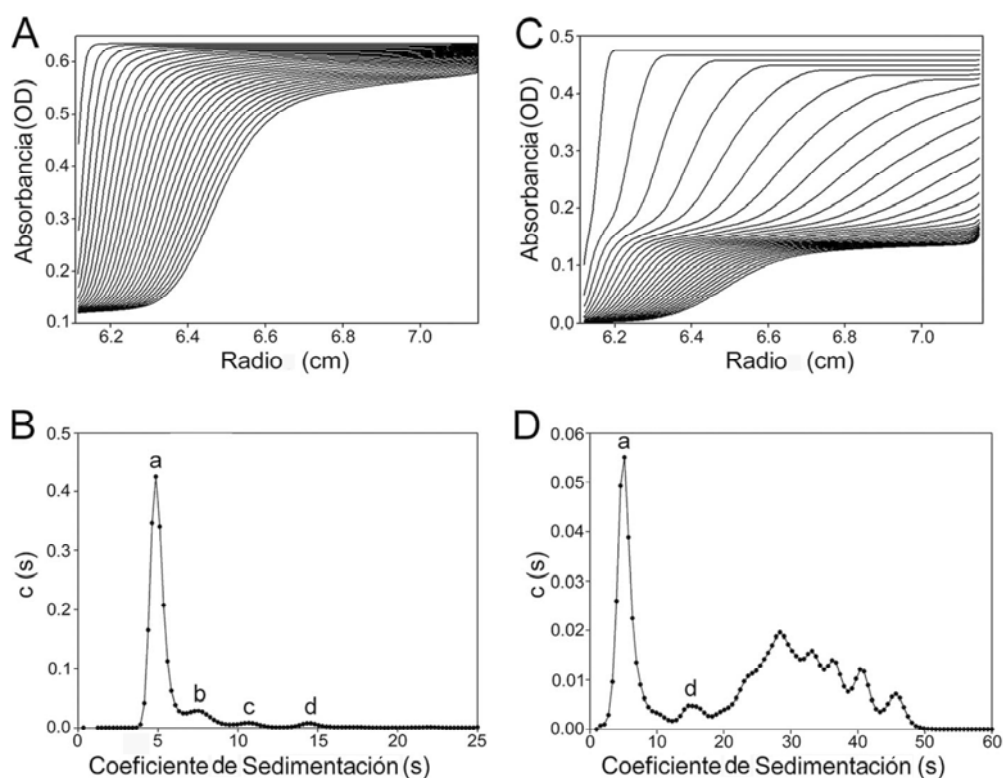


Figura 4.6. Análisis de la velocidad de sedimentación de TrwK.

Los perfiles de velocidad de sedimentación y la distribución de los coeficientes de sedimentación, fueron obtenidos en buffer HEPES a pH 7.25 (A, B) o PIPES a pH 6.45 (C, D). Los picos medidos en los paneles B y D corresponden con monómeros (a), dímeros (b), trímeros (c) y hexámeros (d).

La especie predominante en el tampón de purificación (HEPES pH 7.25) es el monómero (84.1 % de la concentración total de proteína), con un valor de sedimentación de 5.1 S y una masa molecular estimada de 89.000 Da (Fig. 4.6A y B). El resto de especies observadas, con valores de 8 S (9.6 % del total), 11 S (~3 %) y 15 S (~3 %), con masas estimadas de 176.000, 282.000, y 452.000 Da, podrían identificarse como dímeros, trímeros y hexámeros de TrwK, respectivamente. Los ensayos de velocidad de sedimentación en un tampón PIPES pH 6.45, en condiciones similares a las usadas en los ensayos de ATPasa (Fig. 4.6C y D), revelan la formación de oligómeros de mayor estado de agregación. Bajo estas condiciones, sólo un 32 % de la proteína sedimenta como monómero y aproximadamente un 5 % como hexámero, lo cual puede explicar los bajos valores de actividad. Por otra parte, esta polidispersidad en el estado de agregación a pH 6.45 puede explicar la aparente cooperatividad negativa observada en los análisis cinéticos de la actividad ATPasa.

4.2.2. TrwK es una proteína soluble, sin segmentos transmembrana

Algunas VirB4 han sido propuestas como proteínas integrales de membrana [84]. En este estudio se han testado los efectos de fosfolípidos en la actividad ATPasa de TrwK en condiciones similares a las realizadas para TrwD (VirB11), otra ATPasa hexamérica del T4SS [63]. TrwK (1.8 μ M) fue incubada con fosfatidilcolina-cardiolipina-Tritón X-100 (1: 1:3) (50 μ M), y su actividad ATPasa fue medida mediante el ensayo acoplado. No se observó efecto alguno en los valores de actividad (datos iguales a los mostrados en la Fig. 4.3A) tras la adición de lípidos o detergentes. (0.01 a 2 mM Triton X-100). Estos resultados y el hecho de que no sea necesario el uso de detergente alguno para la purificación de TrwK para mantenerla en solución, sugieren que TrwK es una proteína soluble y no una proteína integral de membrana. Apoyando estos datos, estudios bioinformáticos de predicción de segmentos transmembrana de las VirB4, únicamente reconocen miembros de IncX y TrbE del plásmido RP4 como posibles proteínas con segmentos transmembrana. Como se observa en la figura 4.7, los miembros de la familia IncX, representados por las PilX de *H. pylori*, tienen segmentos transmembrana y el tamaño de las proteínas es mayor que la media de las proteínas sin segmentos predichos.

Family or source	Protein	Organism	Predicted transmembrane region	Size (aa)
PilF/PilH	TrhC R27	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	No	887
	TraC F	<i>Escherichia coli</i>	No	875
	TraC R100	<i>E. coli</i>	No	876
TrbE family	TrbE RP4 (IncP)	<i>E. coli</i>	Yes (2)	852
	TrbE pTi	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	No	822
	LvhB4	<i>Legionella pneumophila</i>	No	826
	VirB4	<i>Caulobacter crescentus</i>	No	794
Tol plasmids, <i>Xanthomonas</i>	MpfC	<i>Pseudomonas putida</i>	No	894
	VirB4 pXcB	<i>Xanthomonas citri</i>	No	877
	VirB4	<i>Wolbachia endosymbiont</i>	No	801
	VirB4	<i>Rickettsia felis</i>	No	810
<i>Agrobacterium</i> VirB4	VirB4	<i>A. tumefaciens</i>	No	789
	VirB4 p42D	<i>Rhizobium etli</i>	No	795
	VirB4 pSYMA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	No	792
	VirB4	<i>Bartonella henselae</i>	No	784
PilW/PilN	TraB pKM101	<i>E. coli</i>	No	866
	TrwK R388	<i>E. coli</i>	No	823
	TrwK	<i>Bartonella quintana</i>	No	823
PilX, <i>Helicobacter</i>	CagE	<i>Helicobacter pylori</i>	Yes (2)	981
	VirB4 pCL46	<i>Campylobacter lari</i>	Yes (1)	924
	CmgB3/4	<i>Campylobacter jejuni</i>	Yes (1)	922
	TriC	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yes (2)	915
	VirB4 pCRY	<i>Yersinia pestis</i>	Yes (1)	894
	PilX3/4 R6K	<i>E. coli</i>	Yes (1)	919
<i>Brucella</i> and cryptic plasmids from soil	PtlC	<i>Bordetella pertussis</i>	No	824
	TraC pIPO2T		No	826
	VirB4	<i>Brucella suis</i>	No	831
	VirB4	<i>Xanthomonas campestris</i>	No	817
	VirB4	<i>Dichelobacter nodosus</i>	No	796
	VirB4 pXF51	<i>Xylella fastidiosa</i>	No	815
	TraE pF3028	<i>Haemophilus influenzae</i>	No	807

Figura 4.7. Análisis de predicción de segmentos transmembrana en miembros representativos del grupo de las VirB4.

Secuencias correspondientes a proteínas representativas de las diferentes ramas del árbol filogenético de las VirB4 [83], fueron analizadas mediante programas de predicción de secuencias transmembrana (Sosui, HMMTOP, DAS, TMHMM, y TopPred).

4.2.3. TrwK se une a la membrana interna mediante la interacción con TrwM

La gran mayoría de las VirB4 carecen de segmento transmembrana. No obstante, homólogos pertenecientes a la rama IncX codifican un solo polipéptido compuesto por VirB3 y VirB4 [48, 85]. Sin embargo, en el caso del plásmido R6K, se había publicado que existían dos proteínas independientes (PilX3 y PilX4). Para comprobar este dato, contradictorio en un principio con las predicciones de segmentos transmembrana, se llevó a cabo una nueva secuenciación de esa zona del genoma de R6K. Esta nueva secuenciación revelaba un error en los datos anteriormente depositados corroborando que PilX3 y PilX4 estaban fusionadas (Fig. 4.8).

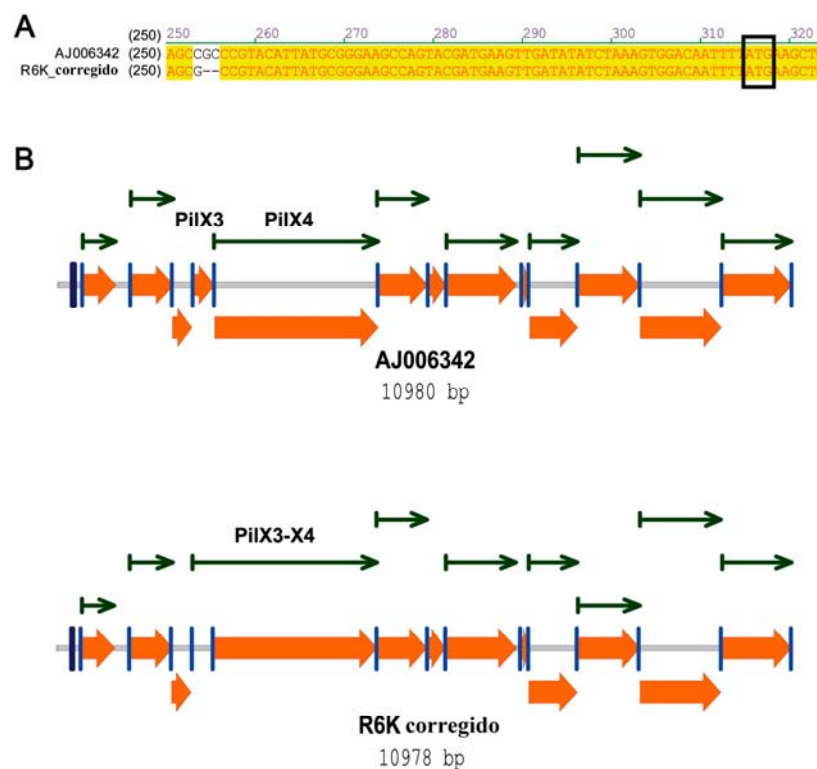


Figura 4.8. Fusión de los genes PilX3-PilX4 en R6K.

En la secuenciación de la región intergénica entre PilX3 y PilX4, se encontró un error, resultado de una mala anotación, en el genoma de R6K (panel A). Como resultado, fueron anotados dos genes en lugar de uno (panel B). El codón ATG (en el recuadro negro del panel A) indica el inicio de PilX4.

Recientes estudios sitúan a VirB3 como una proteína integral de membrana interna, clave en el anclaje de VirB4 a la membrana [45]. A la vista de estos resultados, se crearon dos mutantes consistentes en fusiones transcripcionales y traduccionales de TrwM (VirB3) y TrwK (VirB4) pSAN20 (TrwM+TrwK) y pSAN21 (TrwM-TrwK) respectivamente. Se realizaron ensayos de localización celular mediante la técnica de fraccionamiento de membranas (apartado 3.5 de Materiales y métodos) y se determinó su ubicación mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-TrwK (Fig. 4.9). Ambas construcciones se localizaban en la fracción de membrana interna, no encontrándose en la fracción soluble como ocurre cuando se expresa sola, lo que indica que es necesaria la presencia de TrwM para la localización de TrwK en la membrana interna.

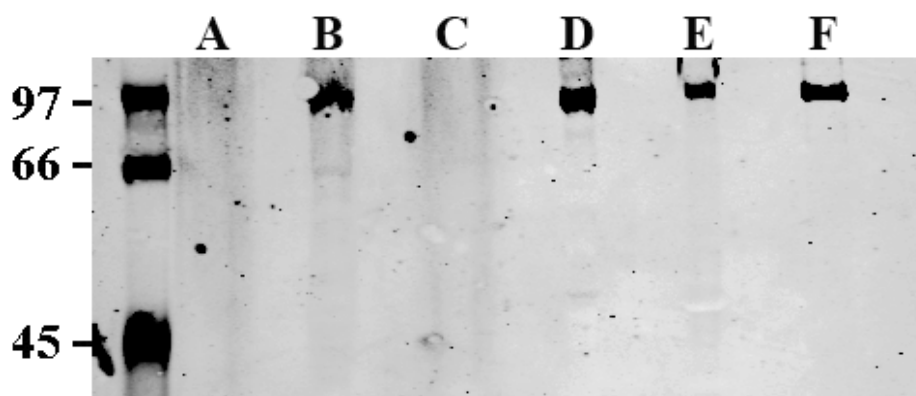


Figura 4.9. Localización celular de TrwK y sus fusiones con TrwM.

Western blot anti-TrwK de la fracción soluble de células que co-expresan TrwM+TrwK (A), TrwK sola (B) o TrwM-K fusionadas (C). TrwK purificada fue usada como control (D). Fracción de membrana de TrwM+TrwK (E) y de TrwM-TrwK (F).

4.3. Modelado molecular de TrwK

4.3.1. Obtención de modelos de VirB4

Ante la dificultad de resolver la estructura de los homólogos de VirB4 mediante cristalografía, se han acometido otro tipo de aproximaciones para conocer su estructura. Análisis bioinformáticos de las VirB4 utilizando diferentes programas informáticos de predicción de estructura terciaria y secundaria, han arrojado cierta luz sobre determinados aspectos. Para analizar su estructura terciaria fueron usados diferentes homólogos de VirB4 que representasen las diferentes funciones biológicas de los T4SS. Se seleccionaron una VirB4 implicada en conjugación (TrwK de R388), otra en secreción de efectores (VirB4 de *B. Suis*) y una implicada en la importación de ADN del medio (TraC de *N. gonorrhoeae*). Para todas ellas, el modelo con mayores valores de confianza resultó ser aquel que usaba como molde la estructura cristalográfica de TrwB (1e9r.pdb), modelando la mitad C-terminal de todas las VirB4.

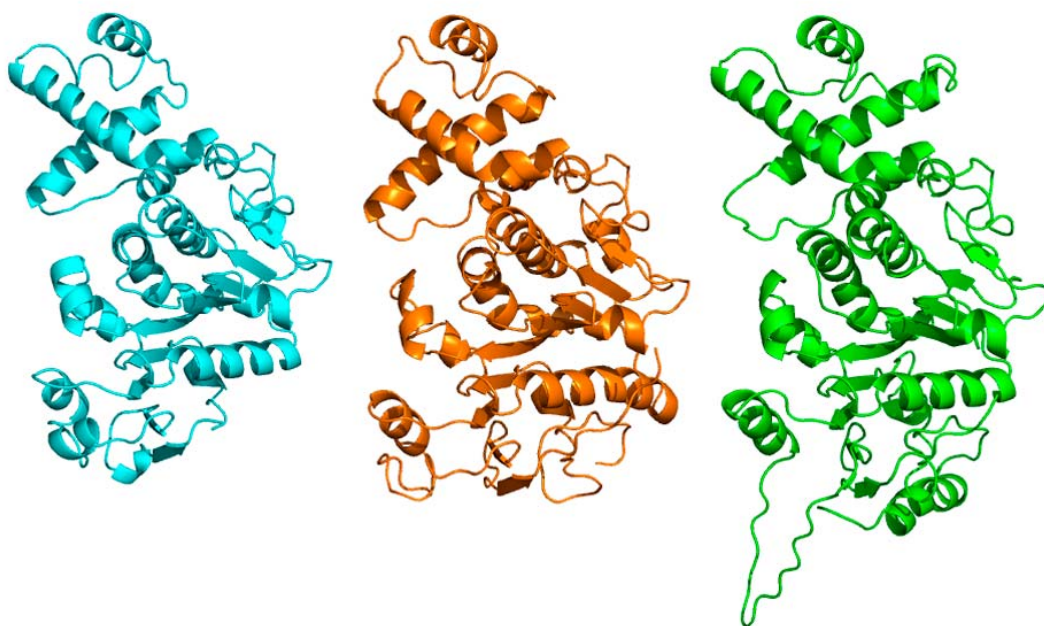


Figura 4.10. Comparación de los modelados estructurales de diferentes VirB4.

Modelado estructural de TrwK de R388 (cian), VirB4 de *B. Suis* (naranja) y TraC de *N. gonorrhoeae* (verde) usando las coordenadas atómicas de TrwBΔN70 como molde.

Como se observa en la figura 4.10, los modelos obtenidos para las diferentes VirB4 son muy parecidos, reforzando así su alto valor de conservación y la robustez del modelo tomando como referencia la estructura de TrwB.

Estos modelos resultaron ser muy parecidos al modelo de VirB4 de *A. tumefaciens* [50] también modelado usando como molde la estructura cristalográfica de TrwB Δ N70 [71].

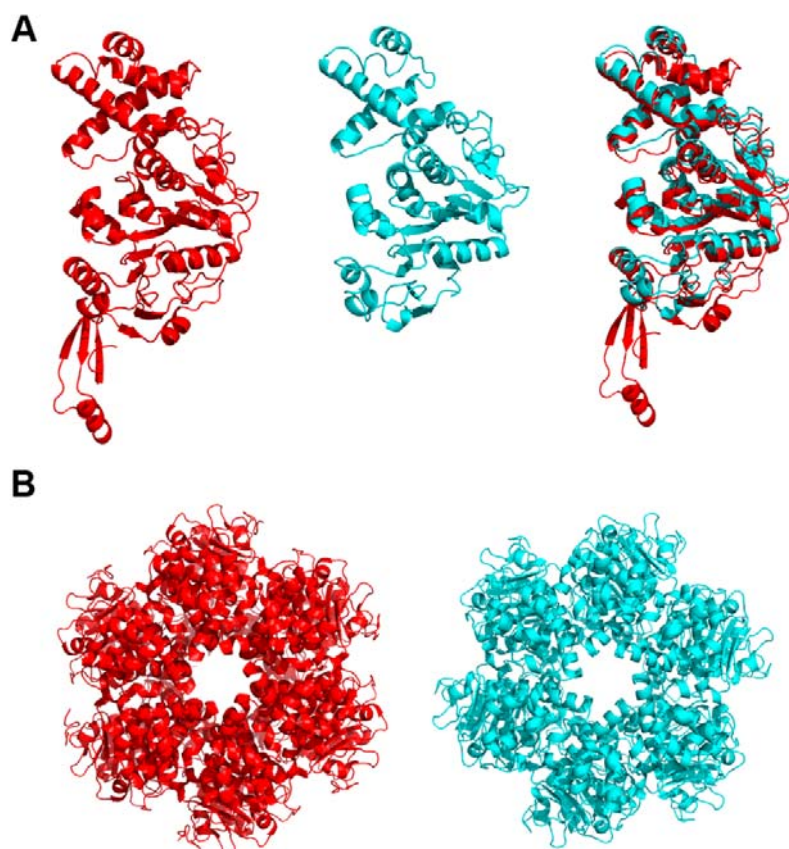


Figura 4.11. Comparación del modelado estructural de TrwK_{CTD} y la estructura cristalográfica de TrwB.

Se generó un modelo del CTD de TrwK (azul) desde el residuo Ala413 hasta el Thr772, mediante técnicas de *molecular threading* usando las coordenadas atómicas de TrwB, 1e9r.pdb (rojo) como molde. El alineamiento de ambas estructuras muestra una gran similitud estructural (A). El modelo monomérico fue ensamblado como hexámero ajustando sus coordenadas con TrwB hexamérica (B) usando el programa Chimera.

4.3.2. Análisis de la región C-terminal de TrwK

La comparación entre el modelo atómico de TrwB y el modelado del dominio C-terminal de TrwK revela una llamativa similitud estructural (Fig. 4.11). Sin embargo, existen importantes diferencias en sus extremos C-terminales. El modelo de TrwK termina en el residuo Thr772, ya que no es posible modelar los últimos 51 aminoácidos del C-terminal de TrwK al carecer TrwB de residuos equivalentes en esa posición. La predicción de la estructura secundaria de ambas proteínas sugiere que TrwK contiene tres α -hélices en su extremo C-terminal que no están presentes en TrwB (Fig. 4.12 panel superior). Curiosamente, este dominio está altamente conservado en todos los homólogos de VirB4 (Fig. 4.12 panel inferior). Por esta razón, se decidió investigar si estas tres últimas α -hélices, presentes en TrwK y ausentes en TrwB, podrían jugar un papel importante en las diferentes funciones biológicas sugeridas para ambas proteínas: transporte de efectores, ensamblaje del *pilus* y translocación de ADN.

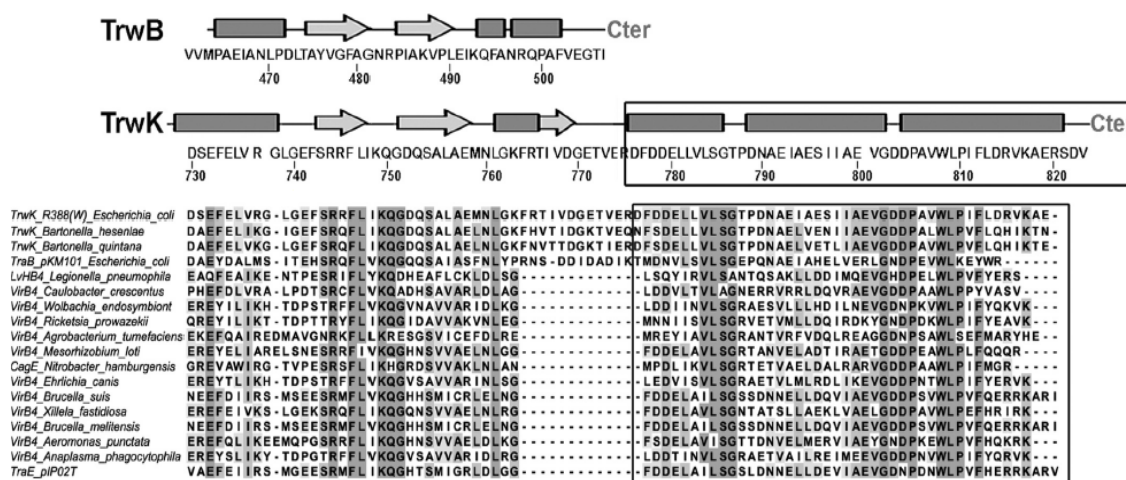


Figura 4.12. Las proteínas VirB4 poseen un extremo C-terminal, altamente conservado, consistente en tres α -hélices que no están presentes en TrwB.

Predicciones de la estructura secundaria de TrwB y TrwK (panel superior) revelan la presencia en TrwK de tres α -hélices, ausentes en TrwB. Un alineamiento de secuencia de un número representativo de VirB4 (panel inferior) muestra que dicha región C-terminal está altamente conservada en esta familia de proteínas. Los aminoácidos con un 100 % de identidad están representados en gris oscuro. Los alineamientos fueron realizados usando T-Coffee [118] y representados con Jalview [119].

4.4. Regulación de la actividad ATPasa de TrwK

4.4.1. La eliminación de las α -hélices del extremo C-terminal de TrwK incrementa la actividad ATPasa *in vitro*

Las diferencias detectadas en el extremo C-terminal de TrwK, respecto a TrwB, podrían ser responsables de sus diferentes funciones biológicas. Para poder discernir el papel de esta región en TrwK, se diseñaron mutantes en los que las últimas tres α -hélices fueron secuencialmente eliminadas, generando las variantes TrwK_1-772, TrwK_1-787 y TrwK_1-801. Cada uno de los mutantes fue purificado (Fig. 4.13) y se testó su actividad ATPasa en las mismas condiciones que la proteína salvaje (Fig. 4.14).

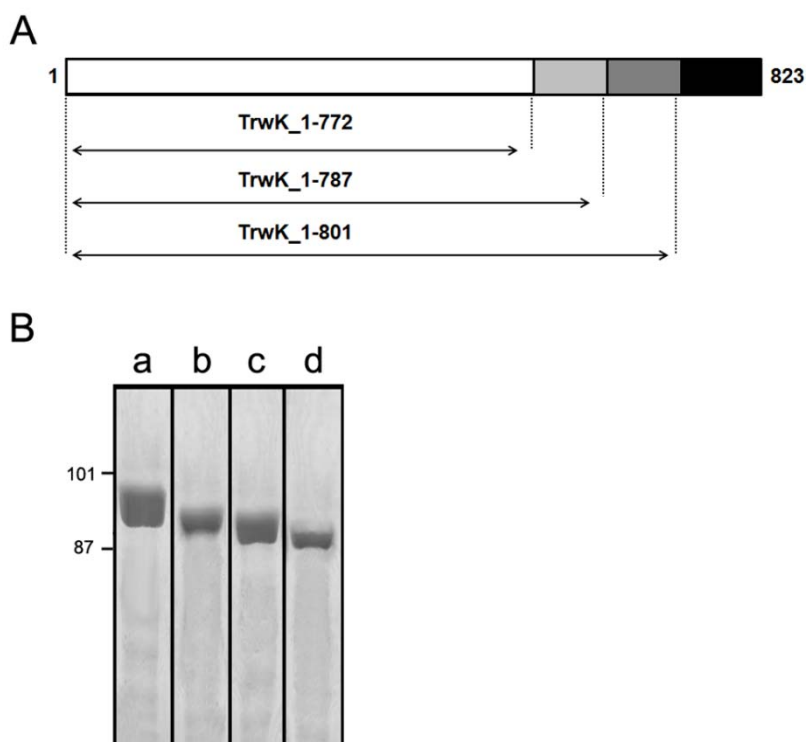


Figura 4.13. Purificación de los mutantes en el extremo C-terminal de TrwK.

(A) Representación de TrwK y los mutantes en las tres α -hélices, secuencialmente eliminadas para generara tres diferentes formas truncadas de la proteína.

(B) SDS-PAGE de las proteínas purificadas por filtración en gel. Calle a, TrwK salvaje (93 kDa); calle b, TrwK_1-801 (91 kDa); calle c, TrwK_1-787 (89.8 kDa); calle d, TrwK_1-772 (87 kDa).

4. Resultados

La eliminación de las α -hélices del extremo C-terminal de TrwK resulta en un dramático incremento de los valores de velocidad de hidrólisis de ATP (Fig. 4.14). Así, mientras la velocidad máxima ($V_{\max}$) de hidrólisis para la proteína salvaje era de 48 nmol min⁻¹mg⁻¹, los valores de actividad obtenidos para los mutantes donde se eliminaban tres (TrwK_1-772), dos (TrwK_1-787) o una (TrwK_1-801) α -hélices fueron 467, 476 y 591 nmol min⁻¹mg⁻¹, respectivamente. Curiosamente, la $K_{m(ap)}$ no varía significativamente (Tabla 4.2), lo que puede sugerir que la eliminación de dichas regiones no provoca cambios conformacionales en la estructura del sitio de unión a nucleótidos ni a su afinidad de unión.

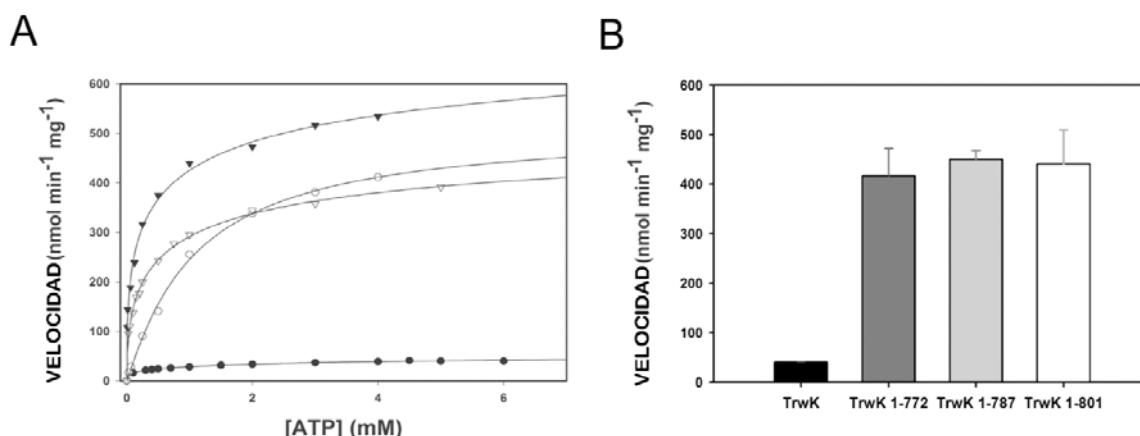


Figura 4.14. Análisis cinético de la hidrólisis de ATP de los mutantes en el extremo C-terminal de TrwK.

Isoterma de respuesta de TrwK y sus mutantes en función de la concentración de ATP usando el ensayo acoplado. Los datos fueron ajustados a una ecuación de Hill. (A) TrwK salvaje (círculos negros), TrwK_1-772 (triángulos blancos), TrwK_1-787 (círculos blancos) y TrwK_1-801 (triángulos negros). La diferencia de valores máximos de hidrólisis ($V_{\max}$) resultó ser diez veces mayor en los mutantes del extremo C-terminal respecto a la proteína salvaje (B).

Variante mutante	$V_{\max}^a$ nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	$K_{m(ap)}^b$ mM
TrwK	48.1 ± 1.9	0.41 ± 0.07
TrwK ¹⁻⁷⁷²	467.8 ± 54.4	0.49 ± 0.03
TrwK ¹⁻⁷⁸⁷	476.2 ± 22.6	0.60 ± 0.16
TrwK ¹⁻⁸⁰¹	591.5 ± 23.7	0.38 ± 0.08

^a Los valores de $V_{\max}$ fueron calculados usando la representación de Hill modificada log (v/ $V_{\max}$ -v) vs log (ATP).

^b Los valores de $K_{m(ap)}$ fueron obtenidos por ajuste directo con la ecuación de Hill.

Tabla 4.2. Comparación de las variables cinéticas de TrwK y sus mutantes en el extremo C-terminal.

4.4.2. La adición de péptidos sintéticos que complementan las α -hélices eliminadas, revierten el incremento en la actividad ATPasa de los mutantes del extremo C-terminal

El aumento en la velocidad de hidrólisis tras eliminar el extremo C-terminal de TrwK hace pensar que dichas α -hélices ejercen una función inhibitoria sobre la proteína o, por otra parte, que dicha inhibición venga dada por aminoácidos específicos de ese dominio. Alineamientos de 25 secuencias de VirB4 (Fig. 4.15), pertenecientes a ramas distantes del árbol filogenético de VirB4 [83], muestran un alto grado de conservación en el extremo C-terminal (residuos Gly802-Val823 en TrwK), con la siguiente secuencia consenso: G-(D/X)-(D/X)-P-X-X-W-L/I-P/X-XF/Y.

<i>LvHB4_Legionella_pneumophila</i>	GHDP E L W L P V F Y E R S K K - - - - -
<i>VirB4_Caulobacter_crescentus</i>	GDDP A A W L P P Y V A S V S E H R - - - - -
<i>VirB4_Wolbachia_endosymbiont</i>	GDNP K V W L P I F Y Q K V K N V - - - - -
<i>VirB4_Rickettsia_prowazekii</i>	GNDP D K W L P I F Y E A V K T L - - - - -
<i>VirB4_Agrobacterium_tumefaciens</i>	GDNP S A W L S E F M A R Y H E A K D - - - - -
<i>TraB_pKM101_Escherichia_coli</i>	GNDP E V W L K E Y W R L T A - - - - -
<i>TrwK_R388(W)_Escherichia_coli</i>	GDDP A V W L P I F L D R V K A E R S D V - - - - -
<i>TrwK_Bartonella_Hensenlae</i>	GDDP A L W L P V F L Q H I K T N R R T T - - - - -
<i>TrwK_Bartonella_quintana</i>	GDDP A V W L P V F L Q H I K T E R R V I - - - - -
<i>VirB4_Mesorhizobium_loti</i>	GDDP E A W L P L F Q Q Q R S A G - - - - -
<i>CagE_Nitrobacter_hamburgensis</i>	GDDP A A W L P I F M G R A Q G - - - - -
<i>VirB4_Erwinia_carotovora</i>	GMQP D D W K D A F L E I A L - - - - -
<i>TriC_Yersinia_enterocolitica</i>	GMKP D D W L E R Y L Q L A L - - - - -
<i>VirB4_Yersinia_pestis</i>	GMQP H E W L D T Y L A K A L - - - - -
<i>VirB4_Ehrlichia_canis</i>	GDDP N T W L P I F Y E R V K H V - - - - -
<i>VirB4_Xillela_fastidiosa</i>	GDDP A V W L P E F H R I R K G A I A - - - - -
<i>VirB4_Brucella_melitensis</i>	GDDP S V W L P V F Q E R R K A R I A S S K S T G R - - - - -
<i>VirB4_Brucella_suis</i>	GDDP S V W L P V F Q E R R K A R I A S S K S T G R - - - - -
<i>VirB4_Burkholderia_vietnamiensis</i>	GDMP K D W L P V F H E R L A K R R A A Q A S S R L S - P A P
<i>VirB4_Aeromonas_punctata</i>	GNDP K E W L P V F H Q K R K Y G Q - - - - -
<i>VirB4_Vibrio_fischeri</i>	GENP I D W I P I F L Q K V R E E K E R K Q G V R N E Q H H P
<i>VirB4_Anaplasma_phagocytophila</i>	GDDP N V W L P I F Y Q R V K N A - - - - -
<i>TraE_pIP02T</i>	GDNP D N W L P V F H E R R K A R V A S S K L H M V R - - - -
<i>TraE_Haemophilus_influenza</i>	GDNP D N W I E P F L A R M K E L K Q L Q A A A K A A K A A -
consensus	G-(D/X)-(D/X)-P-X-X-W-L/I-P/X-X-F/Y

Figura 4.15. Alineamiento de secuencias del extremo C-terminal de proteínas VirB4.

Veinticinco secuencias correspondientes a miembros pertenecientes a distintas ramas de la familia de las VirB4 fueron analizadas usando T-Coffee y representadas con Jalview.

Basándonos en esta homología, diseñamos un péptido sintético comprendiendo los aminoácidos G802-V823 de TrwK (GDDPAVWLPIFLDRVKAERSDV), complementarios a la variante truncada TrwK_1-801.

La actividad ATPasa de todas las variantes truncadas de TrwK se ve disminuida tras la adición de este péptido a la reacción de hidrólisis (Fig. 4.16). Por el contrario, TrwK salvaje, que ya contiene esa secuencia unida covalentemente, no se ve afectada en sus valores de hidrólisis.

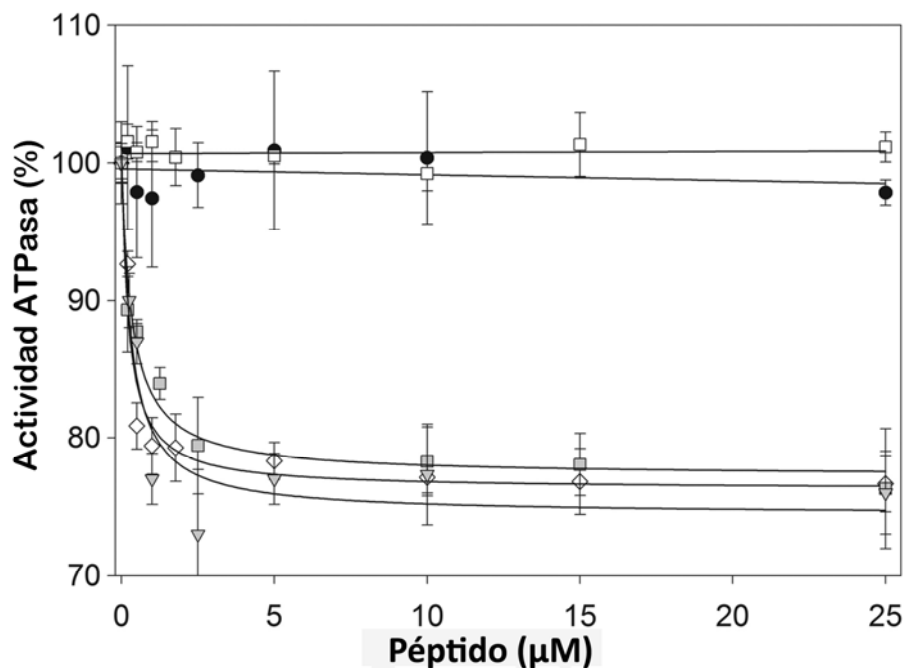


Figura 4.16. Inhibición de la actividad ATPasa de las variantes de TrwK por la adición de un péptido sintético correspondiente a la secuencia de la última α -hélice de TrwK.

Actividad de TrwK salvaje (círculos negros), TrwK_1-772 (triángulos grises), TrwK_1-787 (cuadrados grises) y TrwK_1-801 (diamantes blancos), incubadas con un péptido sintético que comprende los aminoácidos Gly802-Val823 de TrwK. Un péptido con los aminoácidos terminales de TrwC, Pro947-Arg966, (cuadrados blancos) fue usado como control en todas las variantes de la proteína.

El efecto inhibitorio del péptido TrwK_802-823 no cambia significativamente los valores de $K_m(ap)$ (Fig. 4.17) y es específico para TrwK, dado que su adición a ensayos de actividad ATPasa de TrwB y TrwD, la otras dos ATPasas esenciales en el T4SS, no tiene efecto alguno en sus valores de velocidad de hidrólisis. Por otro lado, la adición de un péptido control cuya secuencia es la de los 20 últimos aminoácidos de la relaxasa de R388, TrwC (residuos Pro947-Arg966) usados como control, no afecta a los valores de hidrólisis de los mutantes en el extremo C-terminal ni de la proteína salvaje (Fig. 4.16, cuadrados blancos).

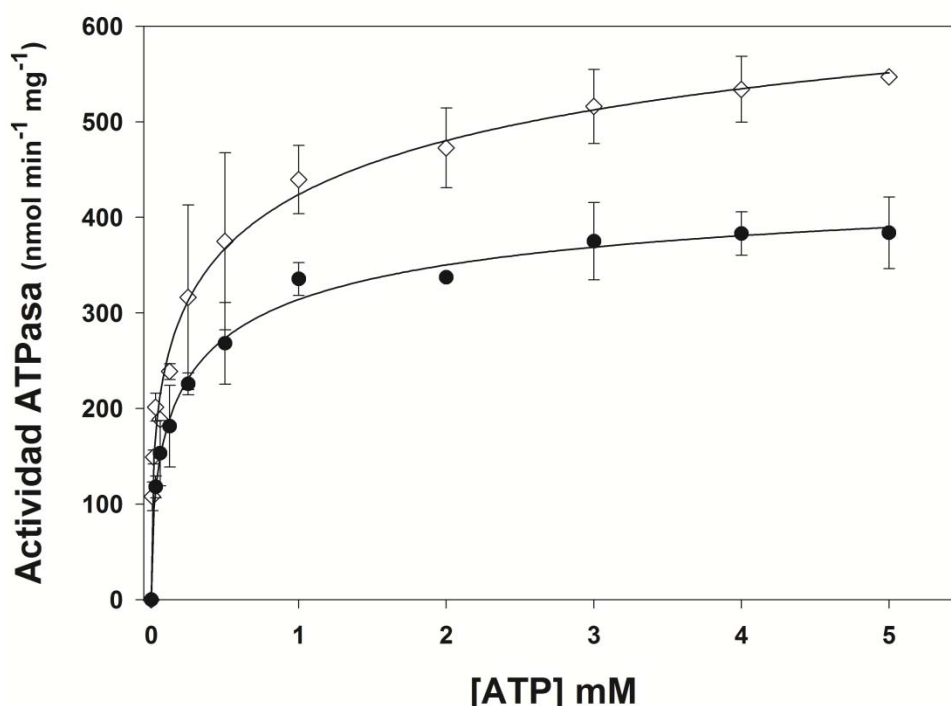


Figura 4.17. Curva de titulación de la actividad ATPasa de TrwK_1-801 en ausencia y en presencia de 25μM del péptido TrwK_802-823.

Las constantes cinéticas de $K_m(ap)$ y coeficiente de Hill no varían en ningún caso siendo las $K_m(ap)$ 0.28 y 0.3 μM para los casos de ausencia (diamantes blancos) y presencia (círculos negros) del péptido respectivamente y sus coeficientes de Hill de 0.56 y 0.51.

4.4.3. Los mutantes en el extremo C-terminal de TrwK no son capaces de complementar la función *in vivo* del R388::Δ*trwK*

El efecto de la eliminación de las α-hélices del extremo C-terminal de TrwK en la actividad ATPasa sugiere que esa región puede jugar un papel importante en la regulación de la función *in vivo* de TrwK. Debido a esto, se estudió el efecto de estos mutantes en la conjugación. Las células donadoras, llevando la variante modificada del plásmido R388 defectivo en la producción de TrwK (pSU4133), fueron transformadas con plásmidos (pET3a) que contenían los mutantes del extremo C-terminal. La capacidad de complementar la actividad del gen de *trwK* en conjugación fue analizada atendiendo al número de transconjugantes. Como se observa en la tabla 4.3, ninguno de los mutantes fue capaz de complementar la actividad de TrwK salvaje.

Plásmidos en el donador	Variante de TrwK en el donador	Frecuencias de conjugación
R388	TrwK	4.76×10^{-1}
pSU4133	R388::Δ <i>trwK</i>	$<1 \times 10^{-7}$
R388 + pET3a_ <i>trwK</i>	<i>trwK</i>	2.21×10^{-2}
R388 + pET3a_ <i>trwK1-801</i>	<i>trwK1-801</i>	1.84×10^{-2}
R388 + pET3a_ <i>trwK1-787</i>	<i>trwK1-787</i>	1.37×10^{-2}
R388 + pET3a_ <i>trwK1-772</i>	<i>trwK1-772</i>	1.21×10^{-2}
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK</i>	<i>trwK</i>	2×10^{-3}
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK1-801</i>	<i>trwK1-801</i>	$<1 \times 10^{-7}$
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK1-787</i>	<i>trwK1-787</i>	$<1 \times 10^{-7}$
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK1-772</i>	<i>trwK1-772</i>	$<1 \times 10^{-7}$

Tabla 4.3. Frecuencias de conjugación de los mutantes en el extremo C-terminal de TrwK en complementación a R388 y pSU4133.

El estudio de los niveles de expresión de los mutantes, así como de su localización subcelular en el entorno de la membrana, verifican su correcta expresión y ubicación al igual que la proteína salvaje (Fig. 4.18). Curiosamente, las frecuencias de conjugación obtenidas utilizando células donadoras que llevaban el plásmido R388 junto con los plásmidos que contenían los mutantes del extremo C-terminal, fueron similares en todos los casos, indicando que la expresión de dichos mutantes no afecta a la función de TrwK en conjugación.

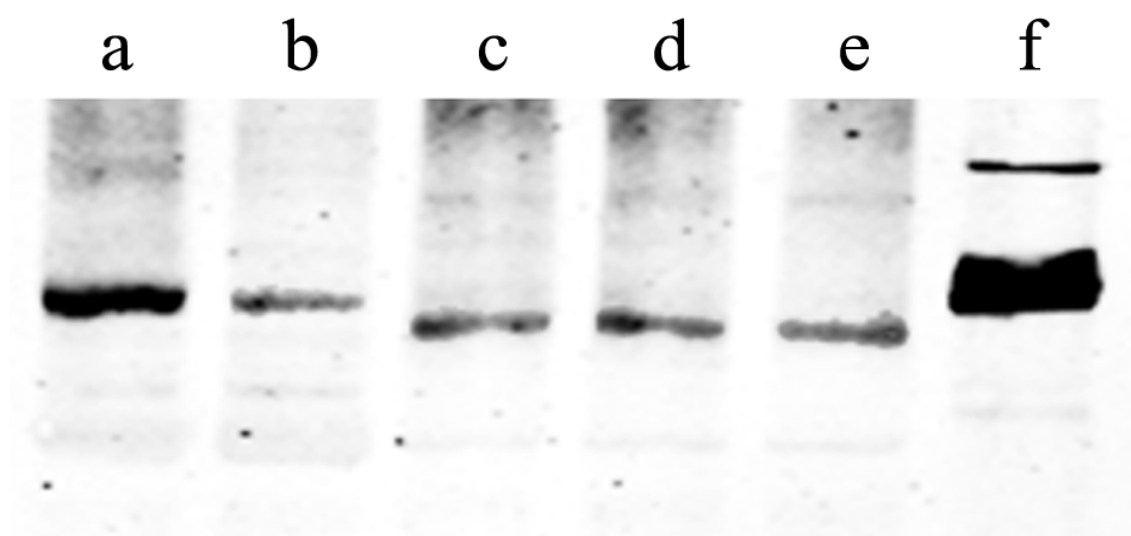


Figura 4.18. Análisis de la expresión y localización subcelular de TrwK y los mutantes del extremo C-terminal.

Las células donadoras (*E. coli* DH5 α) usadas en los ensayos de conjugación, fueron lisadas como se describe en (3.5 Materiales y Métodos). La fracción de membrana fue aislada mediante centrifugación diferencial, cargada en un gel SDS-PAGE y transferida a una membrana de nitrocelulosa e incubada con anti-TrwK. Calle a, R388; calle b, pSU4133+pET3a_trwK; calle c, pSU4133+pET3a_trwK_1-801; calle d, pSU4133+pET3a_trwK_1-787; calle e, pSU4133+pET3a_trwK_1-772; calle f, TrwK purificada (50 ng).

4.5. Análisis estructural de TrwK

4.5.1. Reconstrucción tridimensional de TrwK

Alícuotas de TrwK pura, eluídas en una columna de tamizado molecular, con un peso molecular compatible con un hexámero, fueron analizadas mediante microscopía electrónica. La proteína en tinción negativa mostró una distribución de partículas individuales con una estructura en forma de anillo (Fig. 4.19). Además, se observaron también partículas en forma de pesa, que fueron interpretadas como vistas laterales de la muestra analizada.

Las imágenes fueron sometidas a una clasificación para alinear medias de vistas similares. Los análisis de simetría rotacional de las vistas de los anillos identificaron claramente una simetría 6 en el eje Z (Fig. 4.20).

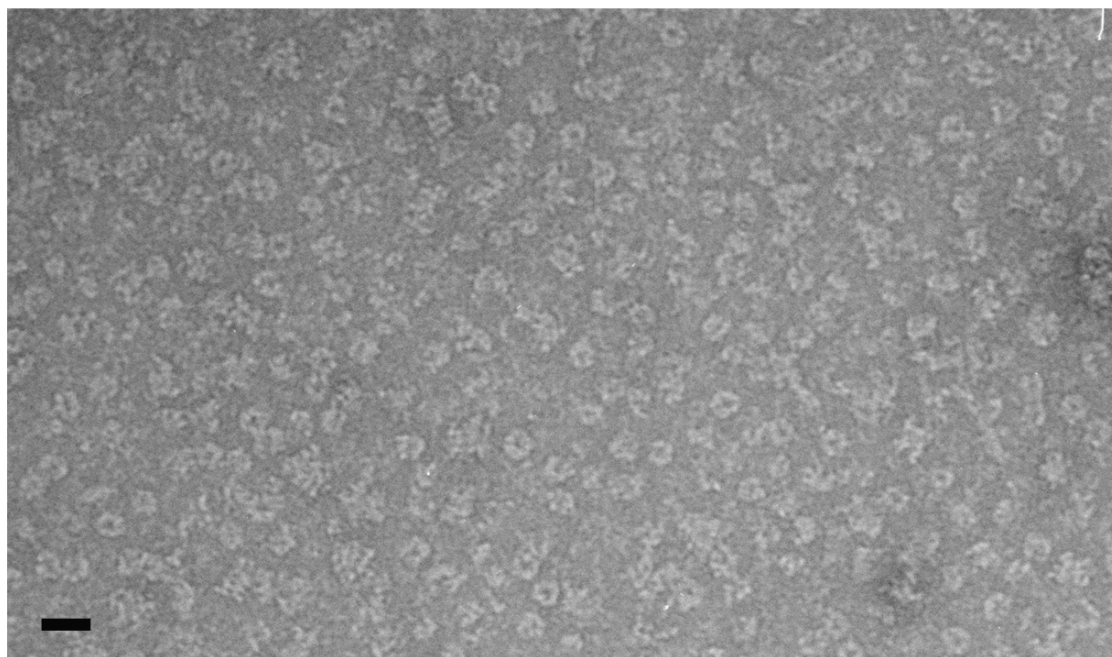


Figura 4.19. Microscopía electrónica de TrwK salvaje en su forma hexamérica.

TrwK fue teñida con acetato de uranilo y analizada por microscopía electrónica, mostrando una prevalencia de las vistas frontales con forma de anillo. Barra de escala: 30 nm.

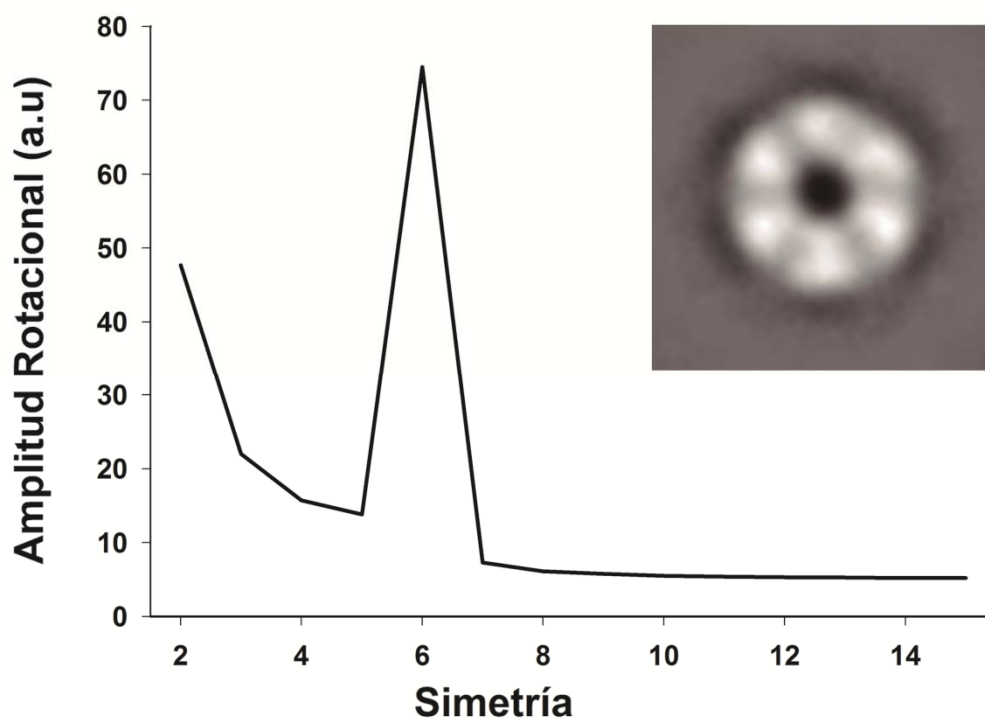


Figura 4.20. Análisis rotacional de TrwK.

El análisis armónico de la media de clases de los anillos (inserción), en relación al porcentaje de la energía armónica como una función del radio, refleja claramente una simetría 6 en las vistas frontales.

Un análisis pormenorizado de los anillos revelaba que el tamaño y la forma de los mismos no era uniforme, lo que podría deberse a que se trataban de vistas distintas de la proteína correspondientes a los extremos N y C terminal. Por ello, durante la reconstrucción tridimensional se aplicó una simetría C6 en lugar de D6.

La reconstrucción tridimensional revela una estructura con un doble anillo hexamérico separado por una constricción en su zona media (Fig. 4.21). Dicha constricción podría actuar como un *linker* entre ambos dominios, lo que estaría en concordancia con los programas de predicción de estructura secundaria y de zonas desordenadas en la estructura. Las dimensiones de la reconstrucción final fueron 165 Å de largo, con un diámetro interno de 42 Å y diámetros externos de 132 Å y 124 Å para ambos extremos. Las proyecciones del volumen final se ajustaban perfectamente a las medias de las distintas clases, corroborando la fiabilidad de la reconstrucción (Fig. 4.22).

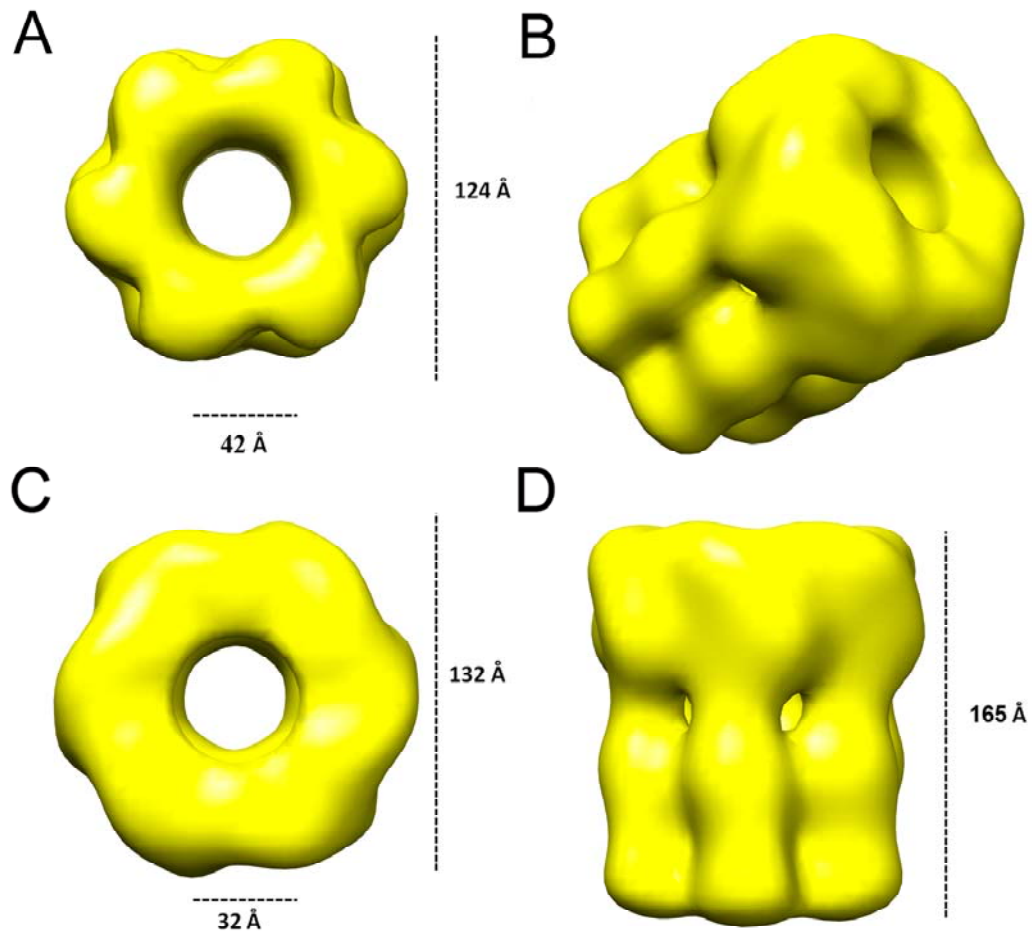


Figura 4.21. Reconstrucción tridimensional de TrwK.

Volumen final obtenido por retro-proyección de los volúmenes resultantes en reconstrucciones iterativas y refinamiento de ángulos filtrado a 22 Å. Vista inferior (A), inclinada (B), superior (C) y lateral (D) del volumen obtenido.

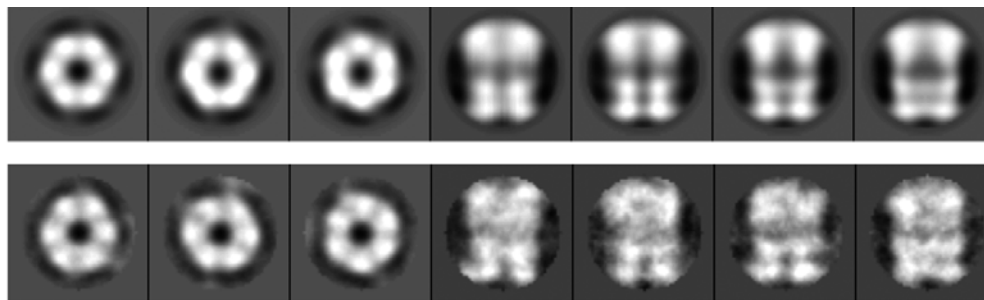


Figura 4.22. Proyecciones del volumen final (panel superior) y medias de clases de partículas que han contribuido al volumen final (panel inferior).

El volumen final fue obtenido a 18 Å atendiendo al criterio de corte de 0.5 de la *Fourier Shell Correlation* (Fig. 4.23). El posterior filtrado del volumen se realizó a 22 Å para evitar el efecto de mínimos locales en la reconstrucción tridimensional de la proteína.

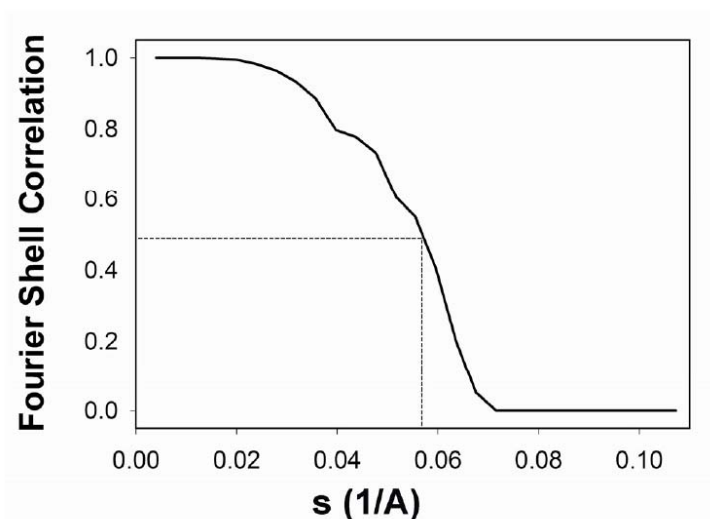


Figura 4.23. Análisis de la *Fourier Shell Correlation* de TrwK.

La resolución espacial de la reconstrucción tridimensional (18 Å) fue calculada usando la correlación cruzada entre dos subconjuntos de volúmenes aplicando el criterio de corte de 0.5.

Para discriminar cuál de los anillos correspondía con los dominios N y C-terminales, se unieron partículas de oro de 5 nm conjugadas con níquel, a TrwK clonada con una cola de histidinas en el extremo N-terminal. El análisis de las partículas (Fig. 4.24) ha permitido identificar claramente el extremo más ancho como el N-terminal de la proteína.

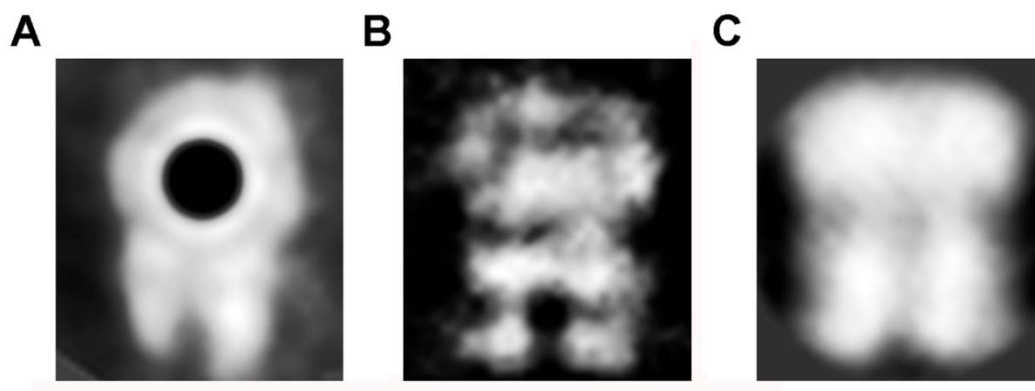


Figura 4.24. Marcaje con oro del NTD del hexámero de TrwK.

TrwK con colas de histidinas fue incubada con Ni-NTA conjugado con oro (5 nm) en una relación 1:10 de TrwK hexámero:Ni-oro, durante 30 min. Las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo 2 % (p/v). Las micrografías fueron obtenidas a una magnificación de 150000X en una cámara GATAN modelo ORIUS SC 1000 CCD usando un microscopio electrónico JEOL JEM-1011 operando a 80 kV, con un ratio de muestreo final de 6.4 Å/pixel. Media de las clases marcadas con oro (A), sin oro (B) y proyección de la vista lateral del volumen final (C).

4.5.2. Relación filogenética entre TrwK y las translocasas de ADN TrwB y FtsK

Las proteínas VirB4 pertenecen a una familia de ATPasas que incluyen a proteínas como FtsK/SpoIIIE, sus homólogos en arqueas HerA, y a las VirD4/TrwB [78]. Estas proteínas contienen un dominio motor en su CTD que está altamente conservado, que sugiere un ancestro común [77]. Sin embargo, el NTD de las proteínas que pertenecen a las familias FtsK/SpoIIIE y VirB4 no está en absoluto conservado, siendo su tamaño y secuencia altamente variables. Por ello, para este análisis se excluyeron las secuencias del NTD de todas las proteínas. Se seleccionaron únicamente las secuencias pertenecientes al dominio motor de miembros de las familias de FtsK/SpoIIIE (incluyendo a SftA, un homólogo de FtsK en *B. subtilis*), de homólogos de VirB4 y de las proteínas acopladoras VirD4/TraD/TrwB. Además, se incluyó en el análisis la secuencia de TraB, una proteína que transfiere ADN de cadena doble en el proceso conjugativo en *Streptomyces*, que se asemeja a FtsK [120]. El análisis filogenético se realizó en presencia de cuatro proteínas RecA, que fueron usadas como raíz del árbol filogenético (Fig. 4.25). Los resultados obtenidos de este análisis sugieren que las proteínas FtsK, VirD4 y VirB4 evolucionaron a partir de un ancestro común, pero que divergieron en dos ramas claramente diferenciadas, con las FtsK por un lado y las proteínas acopladoras y las VirB4, por otro. Resulta interesante que la translocasa de cadena doble TraB, del plásmido pSHV1 de *Streptomyces venezuelae*, aparece en una rama intercalada entre las FtsK y las VirD4/VirB4, lo que sugiere que TraB_{SHV} se distanció de las proteínas acopladoras antes de la especiación entre VirD4 y VirB4 y después de la diversificación entre FtsK y las familias VirB4/VirD4.

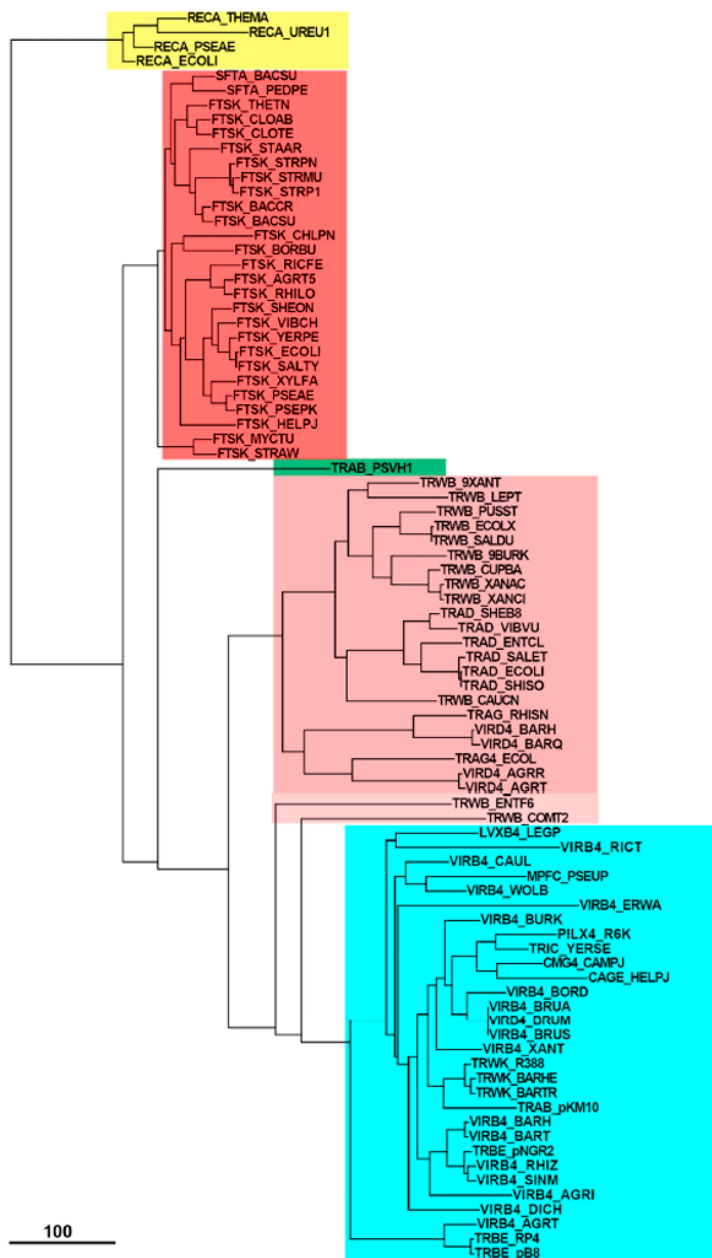


Figura 4.25. Árbol filogenético del dominio motor de FtsK/SpoIIIE, VirD4/TrwB y VirB4.

Las translocasas de ADN FtsK/SpoIIIE y VirD4/TrwB han sido descritas como filogenéticamente relacionadas con las VirB4 [78]. Todas estas proteínas contienen un dominio motor que parece haber evolucionado de un ancestro común. Las secuencias correspondientes con el dominio motor fueron seleccionadas y alineadas con T-coffee [118]. Los árboles filogenéticos fueron construidos con FastTree [121] y representados con Archeopteryx [122]. Los clados de FtsK/SpoIIIE, VirD4/TrwB y VirB4 están coloreados en rojo, salmón y cian respectivamente. TraB, la translocadora conjugativa de ADN de doble cadena en *Streptomyces* está coloreada en verde.

4.5.3. Ajuste de las coordenadas atómicas de translocasas de ADN en el mapa de microscopía electrónica de TrwK

Basándonos en las relaciones evolutivas entre el dominio motor de FtsK, TrwB y TrwK, se decidió acoplar las estructuras atómicas de TrwB Δ N70 (1e9r.pdb) [71] y FtsK_{CTD} (2iuu.pdb) [72] en el mapa de microscopía electrónica de TrwK. Sorprendentemente, FtsK se acopla mucho mejor que TrwB, debido a que las dimensiones del canal interno del volumen del mapa de microscopía electrónica (42 Å) están más cercanas a las de FtsK (31 Å) que a las del hexámero de TrwB (8 Å) (Fig. 4.26B).

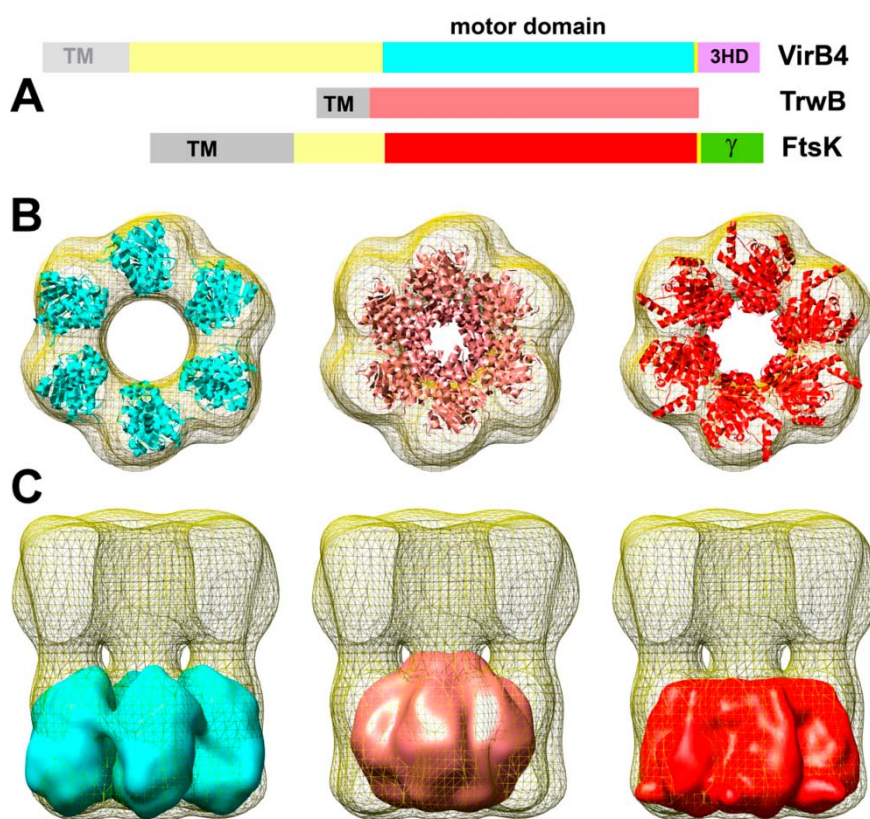


Figura 4.26. Ajuste de las coordenadas atómicas de TrwB y FtsK en el mapa de microscopía electrónica de TrwK.

(A) Representación esquemática de CagE, el homólogo de VirB4 en *H. pylori*, TrwB del plásmido R388, y FtsK de *P. aeruginosa*. Los dominios transmembrana están representados en gris. TrwK de R388 y otros homólogos de VirB4 carecen de dominios transmembrana. El dominio motor en TrwK, TrwB y FtsK está coloreado en cian, salmón y rojo respectivamente.

(B) Las estructuras atómicas obtenidas por cristalografía de TrwB Δ N70 (1e9r.pdb) (salmón) y FtsK_{CTD} de *P. aeruginosa* (2iuu.pdb) (rojo) fueron acopladas en el mapa tridimensional de microscopía electrónica de TrwK. VirB4_{CTD} de *T. pseudethanolicus* fue alineado con FtsK en el modelo de microscopía electrónica. El hexámero resultante (cian) fue también acoplado en el mapa.

(C) Las estructuras atómicas de TrwB Δ N70, FtsK_{CTD} y VirB4_{CTD} de *T. pseudethanolicus* fueron filtradas a 20 Å de resolución y acopladas en el mapa de microscopía electrónica de TrwK.

Teniendo estas diferencias en cuenta, y para poder construir un hexámero de VirB4 compatible con el mapa de microscopía las coordenadas atómicas de VirB4_{CTD} de *T. pseudethanolicus* (4a5g.pdb) [123], se alinearon con FtsK. La estructura resultante fue acoplada en el mapa de microscopía de la misma manera que se hizo con las estructuras cristalográficas de TrwBΔN70 y FtsK_{CTD} (Fig. 4.26B). A su vez, se creó también un modelo hexamérico de TrwK y fue acoplado en el mapa de microscopía (Fig. 4.27A), ajustándose TrwK_{CTD} y VirB4_{CTD} de la misma forma.

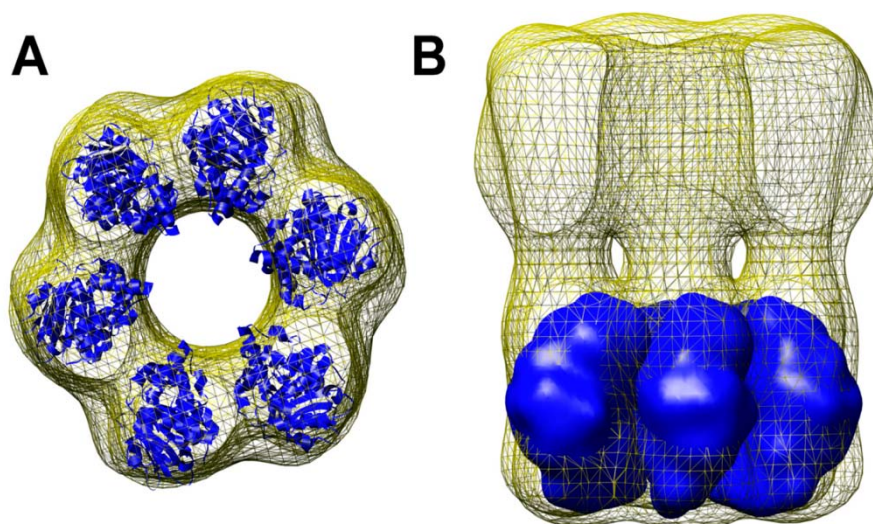


Figura 4.27. Ajuste de las coordenadas atómicas del modelo de TrwK_{CTD} en el mapa de microscopía electrónica.

(A) El modelo monomérico de TrwK_{CTD} fue usado para crear el hexámero usando las coordenadas de FtsK de *P. aeruginosa* como referencia. El hexámero fue ajustado en el volumen de microscopía.

(B) Las coordenadas atómicas del hexámero de TrwK_{CTD} fueron filtradas a 20 Å y el volumen resultante fue ajustado en el mapa de microscopía.

Las estructuras atómicas de los hexámeros de TrwK_{CTD}, VirB4_{CTD}, TrwBΔN70 y FtsK_{CTD} fueron filtradas a 20 Å y acopladas en el mapa de microscopía (Fig. 4.26C y 4.27B). Los volúmenes se ajustan perfectamente en el mapa, ocupando alrededor del 40 % de la densidad. Concretamente, de los 823 residuos que conforman TrwK, sólo 359 forman parte de la estructura del CTD, y lo mismo ocurre con FtsK, la estructura cristalizada tiene 406 residuos de los 811 totales.

4.6. Unión de TrwK al ADN

4.6.1. TrwK une ADN presentando mayor afinidad por G-*quadruplex* que por cadena sencilla

PrgJ, un homólogo de VirB4 en el plásmido pCF10 de *E. faecalis*, ha sido recientemente descrito como capaz de unir ADN de cadena sencilla y doble sin secuencia específica [54]. Esta misma capacidad para unir ADN ha sido también observada en TraB, el homólogo de VirB4 en el plásmido pKM101. Estos resultados se han obtenido usando diferentes sustratos de ADN pero de manera muy inespecífica: productos de PCR de tamaño y estructura desconocidos y secuencias de ADN provenientes de un *oriT*. Teniendo en cuenta estos datos y la similitud estructural entre TrwK y las translocadoras de ADN, TrwB y FtsK, descrita en este trabajo, nos preguntamos si TrwK podría ser capaz de unir ADN. Como se muestra en la figura 4.28, TrwK es capaz de unir ADN de cadena sencilla. Además, al igual que TrwB Δ N70, TrwK muestra preferencia por la unión de ADN con estructura G-*quadruplex*. Estas estructuras secundarias se forman espontáneamente en secuencias ricas en guanina [124]. La afinidad de TrwB Δ N70 al G-*quadruplex* (K_d 0.3 nM) es 100 veces mayor que para el ADN de cadena sencilla [66]. De la misma manera, la afinidad de TrwK a ADN G-*quadruplex* (K_d 56 nM) es mucho mayor que por el ADN de cadena sencilla ($K_d > 500$ nM), pero 200 veces menor que la de TrwB Δ N70 por el G-*quadruplex* (Fig. 4.28).

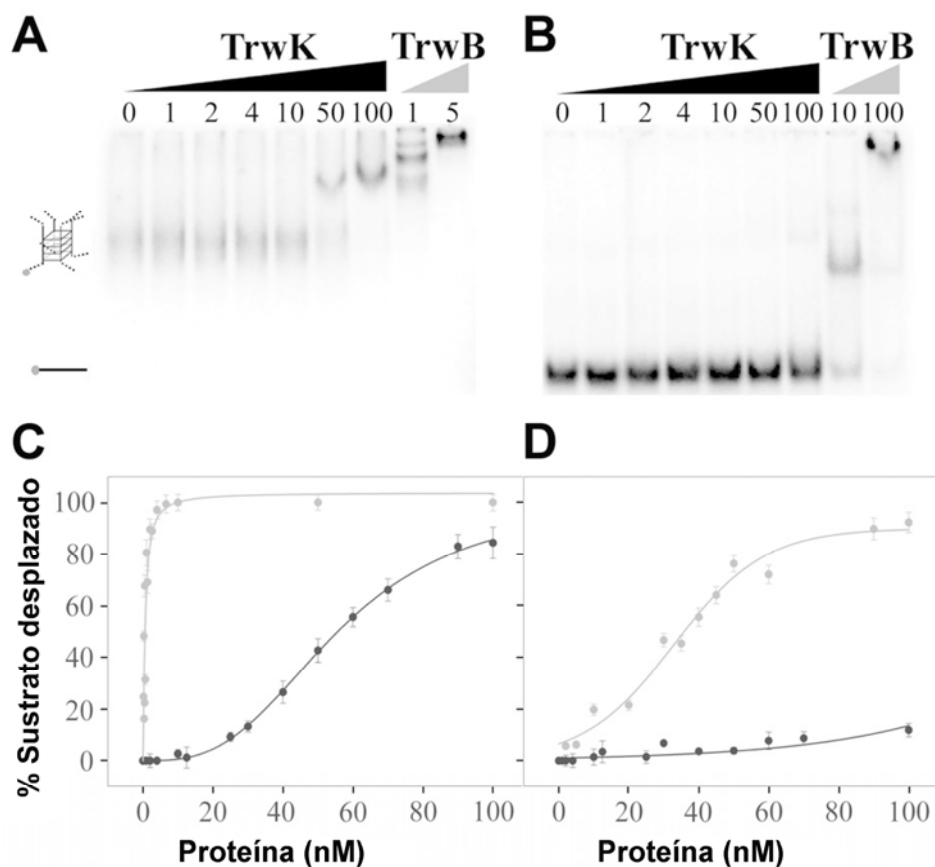


Figura 4.28. Ensayos de retardo en gel de TrwK y TrwBΔN70.

TrwK y TrwBΔN70 en concentraciones entre 0 y 100 nM fueron mezcladas con 0.5 nM de ^{32}P -ADN *G-quadruplex* (A) y ^{32}P -ADN de cadena sencilla (B). Los complejos proteína-ADN fueron cargados en un gel nativo. Marcado a la izquierda de los geles, se representan el *G-quadruplex* y el ADN de cadena sencilla (45-mer), respectivamente. La cuantificación de la movilidad en los geles en presencia de *G-quadruplex* (C) y cadena sencilla (D) revela que la afinidad de TrwK (negro) por el *G-quadruplex* es alrededor de 200 veces menor (K_d 56 nM) que la de TrwB (K_d 0.3 nM) (gris), pero es mucho mayor que para el ADN de cadena sencilla ($K_d > 500$ nM).

4.6.2. Creación de mutantes de TrwK con características similares a un translocador de ADN

Con el fin de obtener mutantes de TrwK con características similares a las de TrwB (unión a ADN, actividad ATPasa dependiente de ADN, cristalización), se crearon distintos mutantes, tanto puntuales como estructurales.

El modelo estructural de TrwK obtenido mediante técnicas bioinformáticas (Fig. 4.10 y 4.11) mostraba que la parte de TrwK con similitud estructural con TrwB se limitaba a la región comprendida entre los residuos 413-772. Por ese motivo se generó la variante truncada de la proteína TrwK_413-772. Desafortunadamente, en el proceso de sobreexpresión de esta proteína se formaban cuerpos de inclusión, así que se clonó con una cola de histidinas en su extremo N-terminal y se purificó siguiendo el método descrito para cuerpos de inclusión (3.4.3 Materiales y métodos). Su actividad ATPasa resultó ser veinte veces mayor que la de la proteína salvaje, con una $V_{\max}$ de $909 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y una $K_m(\text{ap})$ de 0.5.

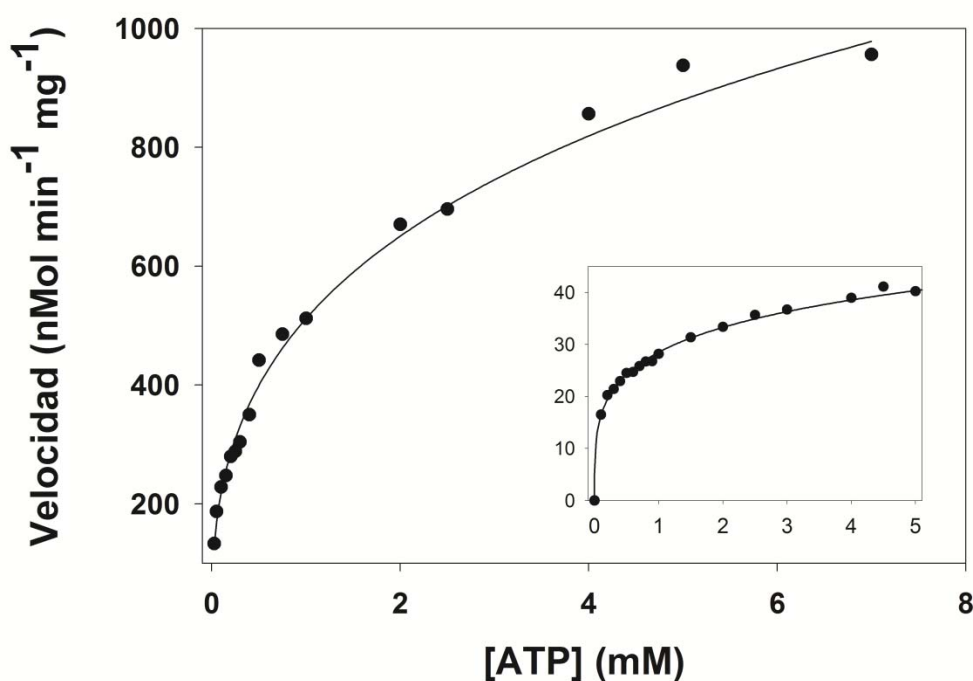


Figura 4.29. Comparación entre la velocidad de hidrólisis de ATP de TrwK salvaje y TrwK_413-772.

El mutante, que posee la secuencia con mayor similitud estructural a TrwB, tiene una velocidad máxima de hidrólisis veinte veces mayor que la proteína salvaje (mostrado en el cuadro insertado). No obstante, sus parámetros de $K_m(\text{ap})$ y coeficiente de Hill no varían respecto a la proteína salvaje.

Esto indicaba que, pese a que su velocidad había aumentado, su constante de unión era muy similar a la proteína salvaje. Datos similares se obtuvieron usando los mutantes en el extremo C-terminal descritos en la figura 4.14, pudiendo deberse este aumento de actividad a la ausencia de sus tres últimas α -hélices (Tabla 4.2). Para discriminar si dicha velocidad se debía solamente a la ausencia de las tres últimas α -hélices o a su similitud estructural con TrwB, se testó su actividad en presencia de ADN, sin obtener cambios en sus valores de velocidad de hidrólisis.

Se creó también el mutante estructural TrwK₄₁₃₋₈₂₃, que carecía del NTD, ausente en TrwB, pero que conservaba las últimas tres α -hélices y en cuya purificación no se formaban cuerpos de inclusión. Los valores de actividad de este mutante fueron similares a los de la proteína salvaje, tanto en ausencia como en presencia de ADN, lo que llevaba a pensar que los valores de actividad ATPasa de TrwK₄₁₃₋₇₇₂ eran debidos únicamente a la ausencia de su dominio regulador en el extremo C-terminal y no a la presencia de nuevas características similares a TrwB.

Por otro lado, conociendo la importancia de determinados residuos (lisinas) en el poro de TrwB, esenciales en la variación de su actividad ATPasa dependiente de ADN [52], se estudió la presencia de dichos residuos o similares en el modelado del CTD de TrwK. Sorprendentemente, dos de los residuos importantes en TrwB estaban también conservados, en cuanto a su posición en el hexámero, tanto en TrwK como en el resto de las VirB4 (Fig. 4.30 y 4.31). Sin embargo, una tercera lisina del poro de TrwB (K275) no estaba presente en TrwK. En su lugar se encontraba un aspártico (D578) y próximo a él, un segundo aspártico (D576). Es decir, la carga positiva de la lisina estaba remplazada por residuos cargados negativamente. Por ello se procedió a cambiar estos dos aspárticos por una lisina y una alanina, TrwK(D576A_D578K) (Fig. 4.30), para caracterizar su actividad ATPasa en ausencia y presencia de ADN. Se obtuvieron unos valores de actividad, con y sin ADN, similares a la proteína salvaje. Estos resultados sugerían que la unión al ADN, tanto de la proteína salvaje como de los mutantes de las lisinas del poro, no tenía efecto alguno en la activación o inhibición de la actividad ATPasa de TrwK.

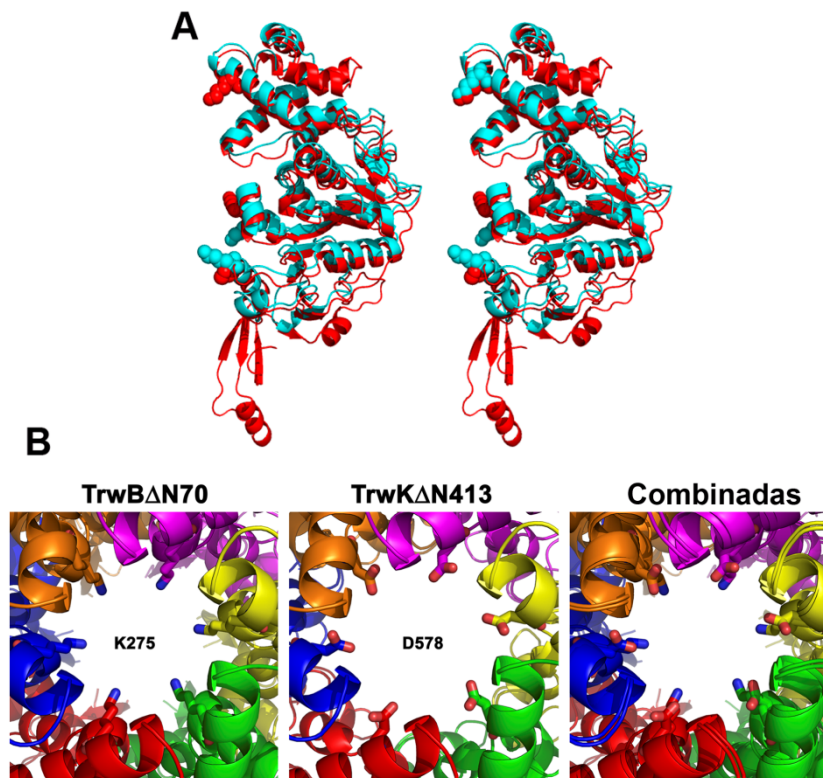


Figura 4.30. Superposición de TrwK_{CTD} y TrwB mostrando las lisinas del poro.

(A) TrwB (rojo) posee tres lisinas de gran importancia en su actividad ATPasa, sin embargo, la primera de ellas (K275) está ausente en TrwK (D578) (cian). La mutación D578K coloca una lisina en el mismo lugar que en TrwB.
(B) Comparación de la posición de la lisina 275, presente en TrwB y ausente en TrwK (D578), en su orientación en el poro de ambos hexámeros.

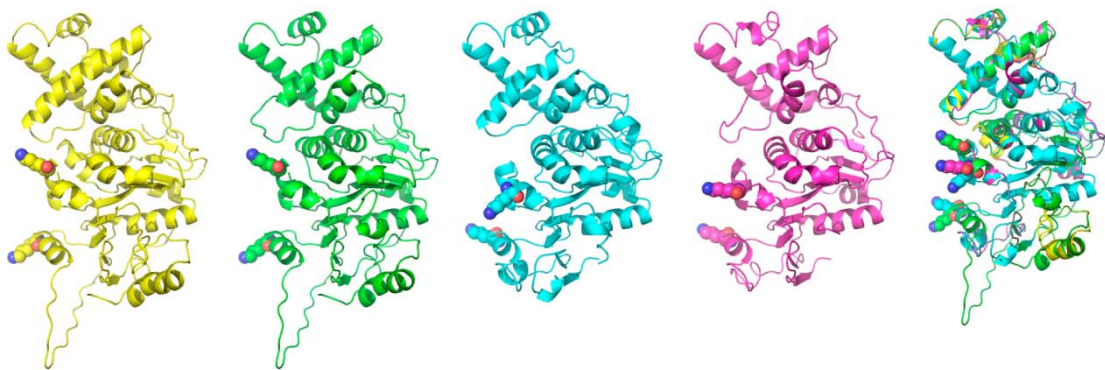


Figura 4.31. Localización de las lisinas, ubicadas en el mismo lugar que en TrwB, en diferentes VirB4.

Ubicación de las lisinas esenciales en TrwB, en varias VirB4: VirB4_{Bartonella} (amarillo), TraC_{Neisseria} (verde), TrwK_{R388} (azul), TrwK_{Bartonella} (magenta) y superposición de todas ellas. Todas ellas muestran un alto grado de conservación en dos lisinas (K700 y K716 de TrwK), ubicadas en su estructura en el mismo lugar que en TrwB (K398 y K421).

4.6.3. Diferentes variables mutantes de TrwK son capaces de unir ADN

Dos de los mutantes descritos anteriormente TrwK_413-823 y TrwK(D575A_D578K) fueron testados también en ensayos de retardo en gel. No se usó el mutante más similar con las predicciones bioinformáticas, TrwK_413-772, dado que la sobreexpresión de esta proteína formaba cuerpos de inclusión.

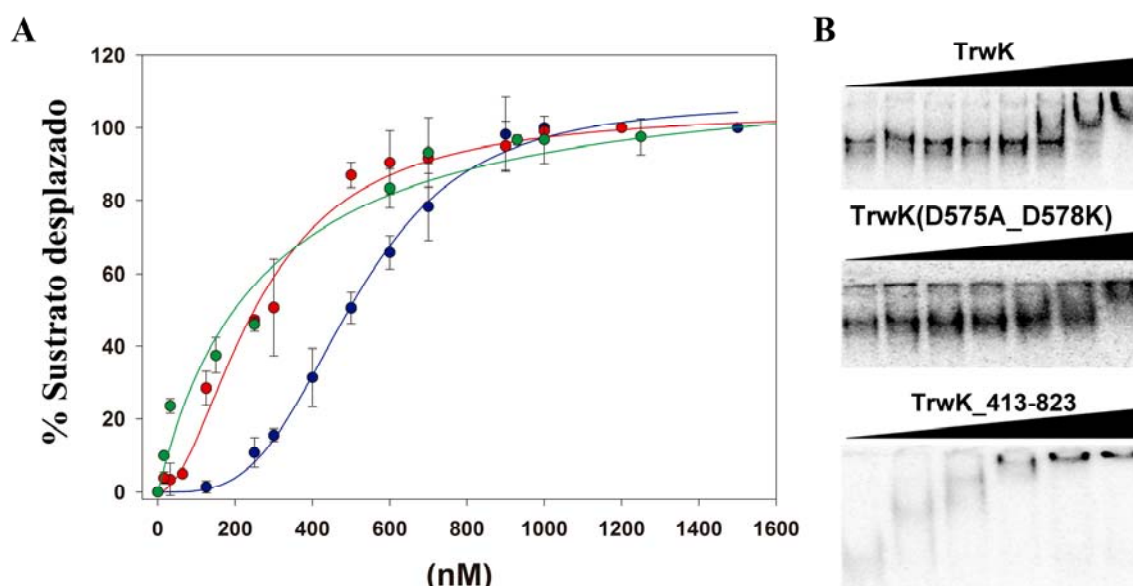


Figura 4.32. Ensayos de retardo en gel de TrwK, TrwK(D575A_D578K) y TrwK_413-823.

Los ensayos fueron realizados en presencia de 0.5 nM de *G-quadruplex*.

(A) Representaciones de Hill de TrwK (azul), TrwK(D575A_D578K) (verde) y TrwK_413-823 (rojo).

(B) Retardos en gel de las tres proteínas con concentraciones crecientes: 0-100 nM en TrwK, 0-100 nM en TrwK(D575A_D578K) y 0-275 nM en TrwK_413-823.

Sorprendentemente, los dos mutantes eran capaces de unir ADN con valores de constantes de unión en el mismo orden de magnitud y con distintos parámetros de cooperatividad (Fig. 4.32). Para el caso de TrwK salvaje, la constante de unión al ADN fue de 56 nM y sus valores de cooperatividad de 3.5. En el caso de los mutantes TrwK_413-823 y TrwK(D575A_D578K), las constantes fueron 29 nM y 36 nM, con valores de cooperatividad de 1.4 y 1.7, respectivamente. Tanto TrwK_413-823 como TrwK(D575A_D578K) tienen mayor afinidad por el ADN que TrwK y una cooperatividad menor, similar a la de TrwB (1.7).

4.6.4. TrwK inhibe la actividad ATPasa ADN dependiente de TrwB

Aunque TrwK es capaz de unirse al ADN, su actividad ATPasa no se ve afectada por la adición de ADN de cadena sencilla o por *G-quadruplex*. Por otro lado, TrwB Δ N70 muestra una actividad ATPasa de 2000 nmoles ATP min⁻¹ mg⁻¹ en presencia de *G-quadruplex* [66]. En las mismas condiciones, la actividad ATPasa de TrwK es baja (50 nmoles ATP min⁻¹ mg⁻¹) [48]. Dada la homología estructural entre TrwB Δ N70 y el extremo C-terminal de TrwK, nos preguntamos si una interacción entre estas dos proteínas podría afectar a la actividad ATPasa ADN dependiente de TrwB Δ N70. Sorprendentemente, encontramos que dicha actividad resulta disminuida en presencia de TrwK, indicando una dominancia negativa (Fig. 4.33). El aumento en la concentración de TrwK se correlaciona con un descenso en los valores de actividad de TrwB.

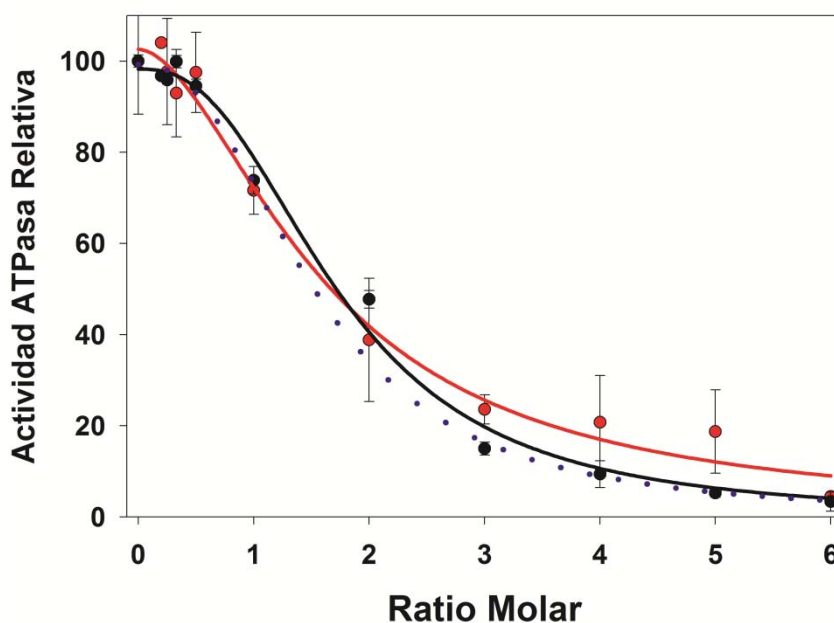


Figura 4.33. Inhibición de la actividad ATPasa de TrwB Δ N70 por TrwK y TrwK_413-823.

La actividad ATPasa de TrwB Δ N70 dependiente de *G-quadruplex* fue medida con concentraciones crecientes de TrwK (negro) y TrwK_413-823 (rojo). Las proteínas fueron incubadas juntas durante 5 minutos y añadidas al buffer ATPasa con *G-quadruplex*. La actividad relativa está expresada como el porcentaje de actividad de TrwB Δ N70 a 0.4 μ M (2000 nmoles ATP min⁻¹ mg⁻¹). El punteado azul corresponde a los valores teóricos de actividad que se obtendrían si se retirase de la mezcla la cantidad de TrwB, en concentración, relativa a su inhibición por TrwK.

La adición de cantidades equimolares de TrwB Δ N70 y TrwK en el ensayo ATPasa resulta en un descenso de la actividad ATPasa de un 30 %. Asimismo, se testó la variante del CTD de TrwK, TrwK_413-823 (Fig. 4.33, línea negra), obteniendo valores de inhibición similares a los obtenidos con TrwK salvaje (Fig. 4.33, línea roja). Valores similares de actividad pueden ser obtenidos si sólo el 70 % de la concentración de TrwB está presente en el ensayo (Fig. 4.33, punteado azul). Estos resultados sugieren que los monómeros de TrwB Δ N70 podrían estar interaccionando específicamente con TrwK, formando heterocomplejos no funcionales. A fin de comprender el alcance de la interacción entre TrwB y TrwK, se realizó un estudio comparativo usando un mutante de TrwB Δ N70, TrwB Δ N70(W216A), del que previamente se había descrito que era capaz de inhibir la actividad ATPasa dependiente de ADN de cadena sencilla de TrwB Δ N70, usando el ADN del bacteriófago M13 (mp18), formando heterocomplejos inactivos [46].

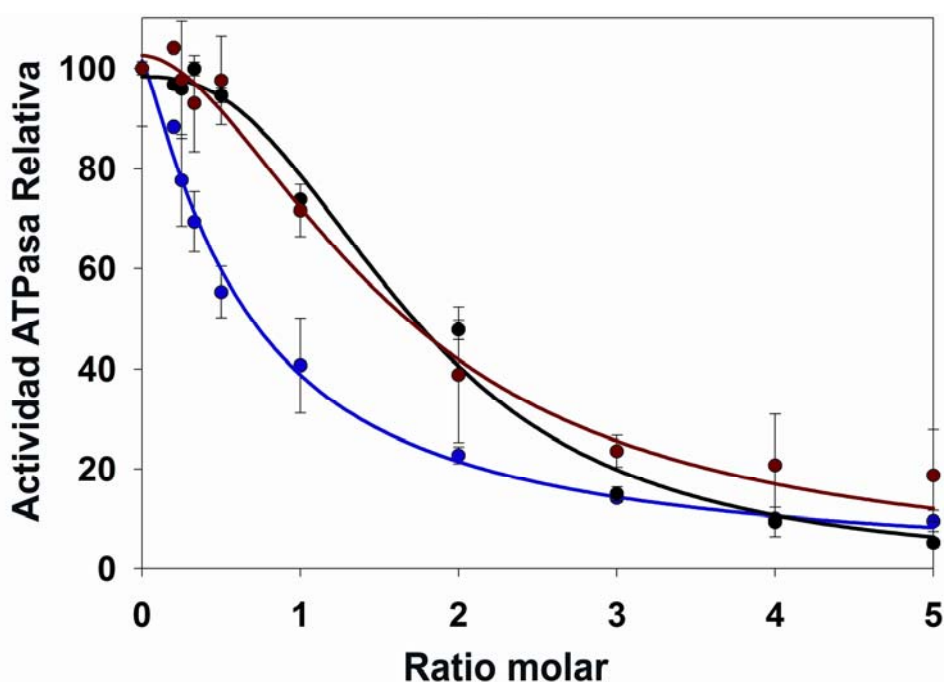


Figura 4.34. Comparación de la inhibición de TrwB Δ N70 por TrwB Δ N70(W216A), TrwK_413-823 y TrwK.

TrwB Δ N70(W216A) es capaz de inhibir la actividad ATPasa de TrwB Δ N70 (azul) en presencia de G-quadruplex, de una manera más fuerte que TrwK y TrwK_413-823 (negro y rojo, respectivamente), alcanzándose valores del 50 % de inhibición cuando un monómero de TrwB Δ N70(W216A) interacciona con dos de TrwB Δ N70.

Este mutante tiene dominancia negativa en la actividad de TrwB *in vitro* e *in vivo* [46]. La comparación entre las cinéticas de inhibición de la actividad ATPasa de TrwB Δ N70 por TrwB Δ N70(W216A) y TrwK (Fig. 4.34) revela que el mutante de TrwB inhibe la actividad de la proteína salvaje a unos ratios molares menores que TrwK. En el caso de la inhibición por TrwK, la forma de la curva sugiere la existencia de una marcada cooperatividad, probablemente debido al hecho de que más copias de TrwK son requeridas para apreciar valores de inhibición iniciales. Dado que la eficiencia de la formación de hexámeros por TrwB Δ N70(W216A) ha de ser similar a la proteína salvaje [46], estos resultados reflejan que TrwB Δ N70 se une a TrwB Δ N70(W216A) con mayor afinidad que TrwK, tal y como se esperaba.

Por otro lado, y para reforzar la idea de la posible formación de heterocomplejos, se llevó a cabo un ensayo inverso de inhibición. Se usó la variante mutada de TrwK a la que se le había suprimido la última α -hélice (TrwK_1-801) que es el mutante soluble de TrwK con mayor valor de actividad ATPasa (Fig. 4.14 y tabla 4.2). Como posible inhibidor, se usó TrwB Δ N70(W216A), que carece de actividad ATPasa y ejerce dominancia negativa sobre TrwB Δ N70 [46]. Los ensayos se efectuaron en presencia y en ausencia de *G-quadruplex*. En ambos casos, y para complementar las anteriores inhibiciones, el mutante de TrwB era capaz de inhibir a TrwK_1-801, aunque con valores menores (Fig. 4.35). En presencia de ADN, el 50 % de inhibición se alcanza en el ratio 1:2 (TrwK_1-801:TrwB Δ N70(W216A)) y, a diferencia de la inhibición sobre TrwB, los valores finales (ratio 1:6) alcanzan valores menores de inhibición llegando sólo al 20 % de la actividad inicial de la proteína. En ausencia de ADN dicha inhibición es menor, necesitando un ratio 1:4 para llegar al 50 % de inhibición y no llegando a bajar del 40 % en el ratio 1:6.

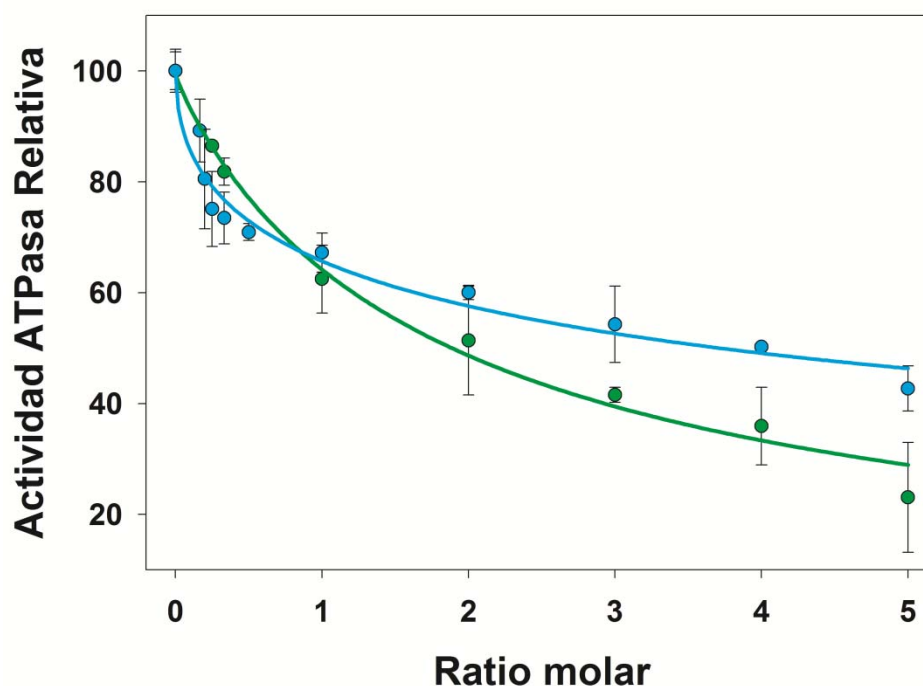


Figura 4.35. Inhibición de la actividad ATPasa de TrwK_1-801 por TrwBΔN70(W216A) en presencia y ausencia de G-quadruplex.

Los valores de actividad fueron medidos con una concentración fija de TrwK_1-801 (0.15 μ M) y variando las concentraciones de TrwBΔN70(W216A). Ambas proteínas se incubaban juntas cinco minutos antes de comenzar la reacción (cian). En el caso de la adición de G-quadruplex (verde), el ADN se añadía a la vez que las proteínas en la reacción.

Atendiendo a los valores de las constantes de inhibición, TrwB inhibida por TrwBΔN70(W216A) tiene los mismos valores en presencia del ADN del virus M13 que en presencia de G-quadruplex, dando un valor relativo de la afinidad a formar hexámeros consigo misma en presencia de ADN [46]. Con estos datos se podría colegir que TrwB y TrwK forman heterocomplejos, aunque con una eficiencia menor que en la formación de heterocomplejos TrwB-TrwB(W216A).

4. Resultados

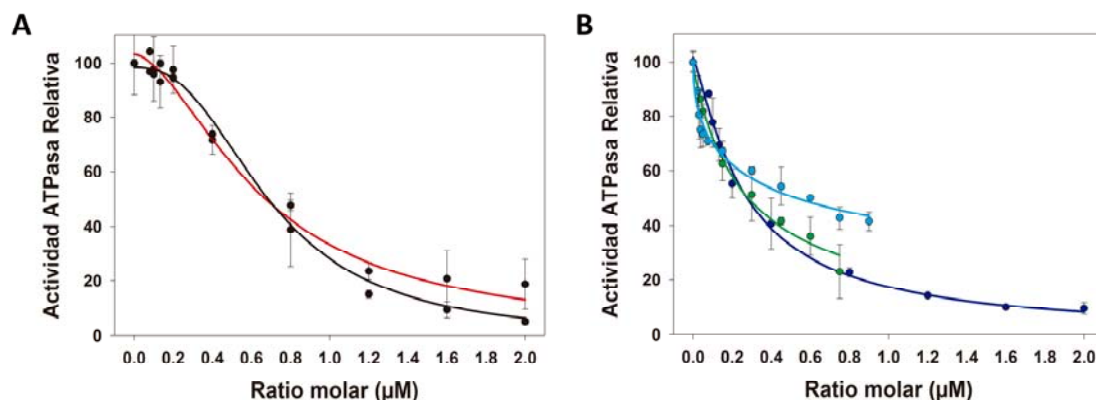


Figura 4.36. Inhibición de la actividad ATPasa de TrwBΔN70 y TrwK_1-801.

(A) Inhibición de TrwBΔN70 por TrwK (negro) y por TrwK_413-823 (rojo) en presencia de G-quadruplex.

(B) Inhibición de TrwBΔN70 y TrwK_1-801 por TrwBΔN70(W216A) (azul y verde, respectivamente) en presencia de G-quadruplex y de TrwK_1-801 por TrwBΔN70(W216A) en ausencia de G-quadruplex (cian).

	<i>TrwBΔN70</i>	<i>TrwK_1-801</i>
	$K_{i(ap)}$	$K_{i(ap)}$
<i>TrwK</i> ^a	0.69 μM	N.D
<i>TrwK_413-823</i> ^a	0.67 μM	N.D
<i>TrwBΔN70(W216A)</i> ^a	0.25 μM	0.55μM
<i>TrwBΔN70(W216A)</i> ^b	0.25 μM	N.D
<i>TrwBΔN70(W216A)</i> ^c	N.D	0.25 μM

Tabla 4.4. Comparación de las $K_{i(ap)}$ de la actividad ATPasa de TrwBΔN70 y TrwK_1-801.

La actividad ATPasa fue medida en presencia de G-quadruplex^a y ADN de cadena sencilla (M13)^b y en ausencia de ADN^c. N.D (no descrito)

En todos los ensayos de inhibición se usó como control TrwD, la otra ATPasa del T4SS, que fue añadida tanto a TrwBΔN70 como a TrwK_1-801, en sus respectivas condiciones óptimas de actividad y variando las concentraciones hasta valores de 1:6. En ninguno de los dos casos se observó efecto alguno sobre sus valores de actividad.

4.6.5. TrwK no compete con TrwB por la unión al ADN

La capacidad de TrwK para inhibir la actividad ATPasa ADN dependiente de TrwB podría explicarse de tres formas, derivadas de los estudios de inhibición: formación de heterocomplejos no funcionales, formación de heterocomplejos hemifuncionales, o que parte del ADN fuera unido por TrwK y, por tanto, no estuviera disponible para TrwB.

Teniendo en cuenta los valores de actividad teóricos de TrwB a diferentes concentraciones (Fig. 4.33, línea punteada azul), la formación de heterocomplejos hemifuncionales es muy improbable. Por otro lado, para estudiar la posibilidad de que parte del ADN de la reacción fuera secuestrado por TrwK, se realizaron ensayos de retardo en gel poniendo ambas proteínas en contacto con el ADN marcado y en ratios molares en los cuales se observaban efectos claros en la inhibición de la actividad ATPasa (1:2). Para ninguna de las mezclas se observó efecto alguno en el patrón de retardo de TrwB, aun poniendo un exceso de TrwK, incluso a ratios molares en los cuales la actividad ATPasa de TrwB disminuía hasta un 5 % (Fig. 4.37). El mismo resultado se obtiene usando la variante del CTD de TrwK: TrwK_413-823.

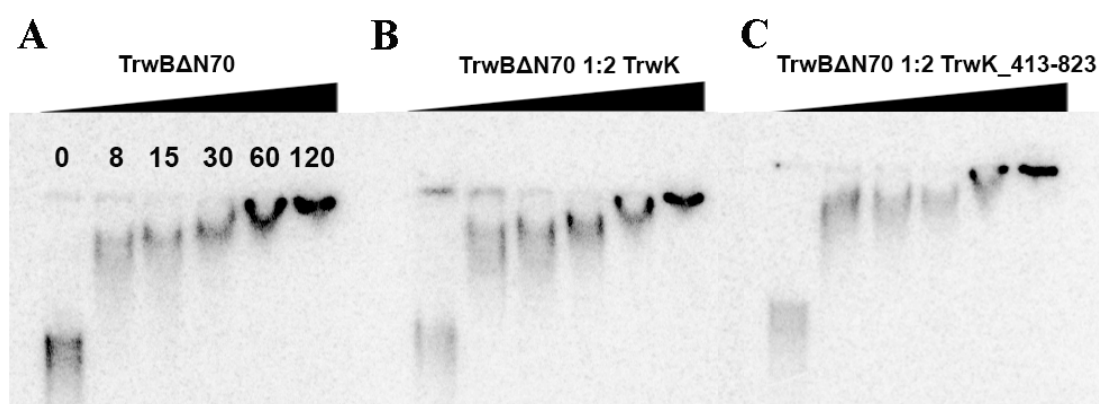


Figura 4.37. Retardos en gel de TrwBΔN70 sola (A), con TrwK (B) y con TrwK_413-823 (C) en relaciones molares 1:2.

Las concentraciones crecientes de TrwBΔN70 fueron las mismas en los tres casos (8-120 μM), las concentraciones de TrwK y TrwK_413-823 fueron 16-240 μM.

Este dato sería entendible atendiendo a la gran diferencia de afinidad de ambas proteínas por el *G-quadruplex*, 200 veces mayor para TrwB (Fig. 4.28).

Asimismo, se testó la capacidad de unión al *G4-quadruplex* de TrwB Δ N70(W216A), para comprobar si la inhibición ejercida en TrwB Δ N70 venía dada por la formación de heterohexámeros no funcionales en su unión y actividad o tan sólo en su actividad (ya que es necesaria la unión al ADN para formar hexámeros en TrwB) [46]. En ambos casos, la unión al ADN es similar en el mismo rango de concentración de proteína (Fig. 4.38).

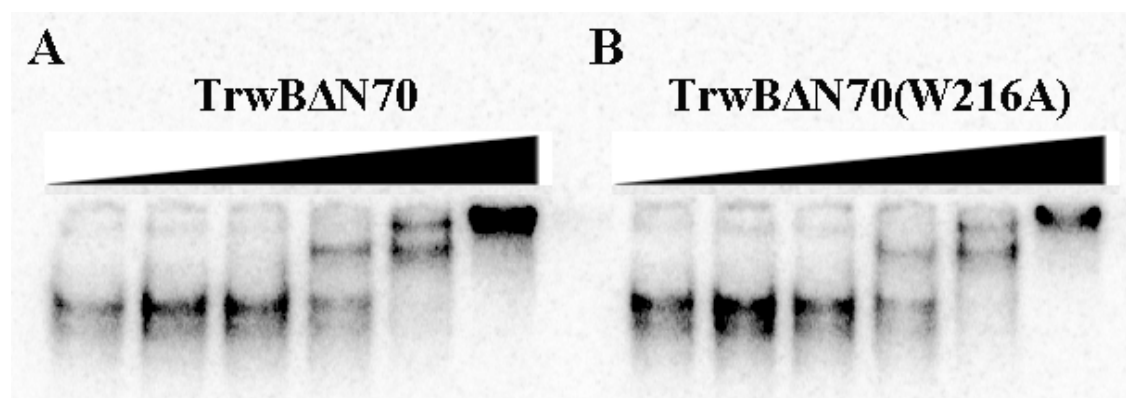


Figura 4.38. Retardos en gel utilizando TrwB Δ N70 y TrwB Δ N70(W216A).
La concentración para ambas proteínas fue de 8-120 μ M

Estos datos y los de inhibición identificarían como dos procesos independientes la capacidad de unión al ADN y la capacidad para hidroliza ATP. Dichos resultados reforzarían la idea de que ambas proteínas (TrwB y TrwK) podrían estar formando heterocomplejos no funcionales.

4.6.6. Estudios de interacción de TrwK y TrwB

Los efectos observados en la actividad ATPasa de TrwB en presencia de TrwK sugerían que ambas proteínas interaccionaban. Para corroborar esta hipótesis, se realizaron pruebas adicionales que consistieron en la estabilización de posibles complejos TrwK-TrwB mediante el uso del agente químico EGS, usado comúnmente para la obtención de complejos proteicos. Se incubaron TrwK y TrwB en ratio 1:1 y a una concentración de 125 mM con 1.5 mM de EGS durante 30 minutos. La mezcla se cargó en una columna Superdex 200 HR 10/30 y las fracciones fueron analizadas por *Western blot* usando anticuerpos anti-TrwK y anti-TrwB. Como se observa en la figura 4.39, las fracciones 14 y 13 eluidas de la columna, con un peso molecular aparente de 48 y 94 kDa, contenían tanto TrwB como TrwK. Sin embargo, en las fracciones de la 12 a la 10 aparece un complejo, reconocido por ambos anticuerpos, con un peso molecular que podría identificarse como la unión de un monómero de cada proteína (142kDa).

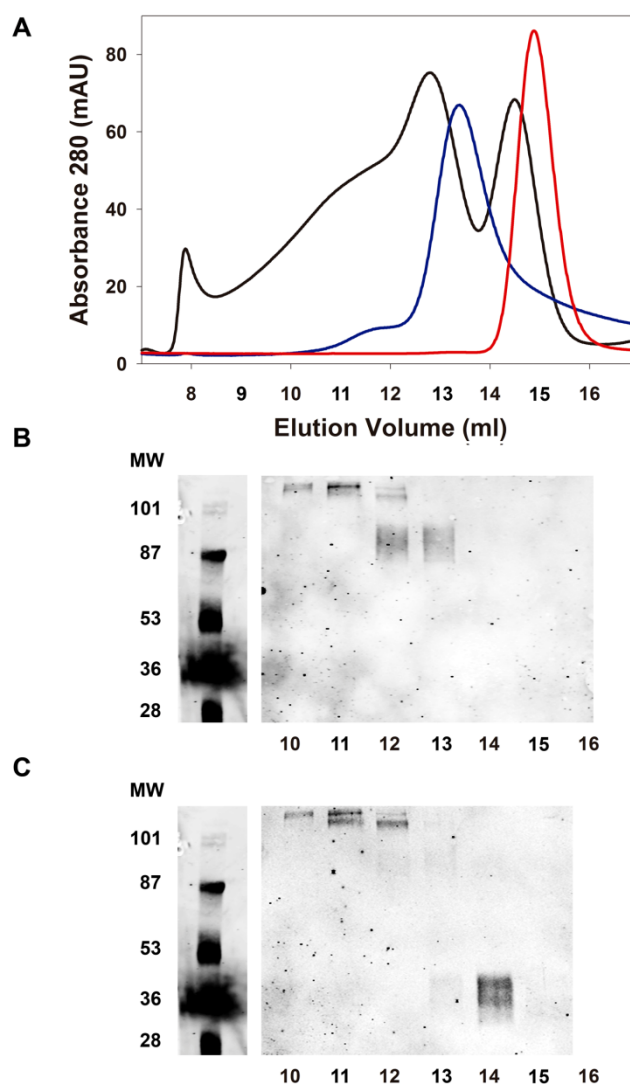
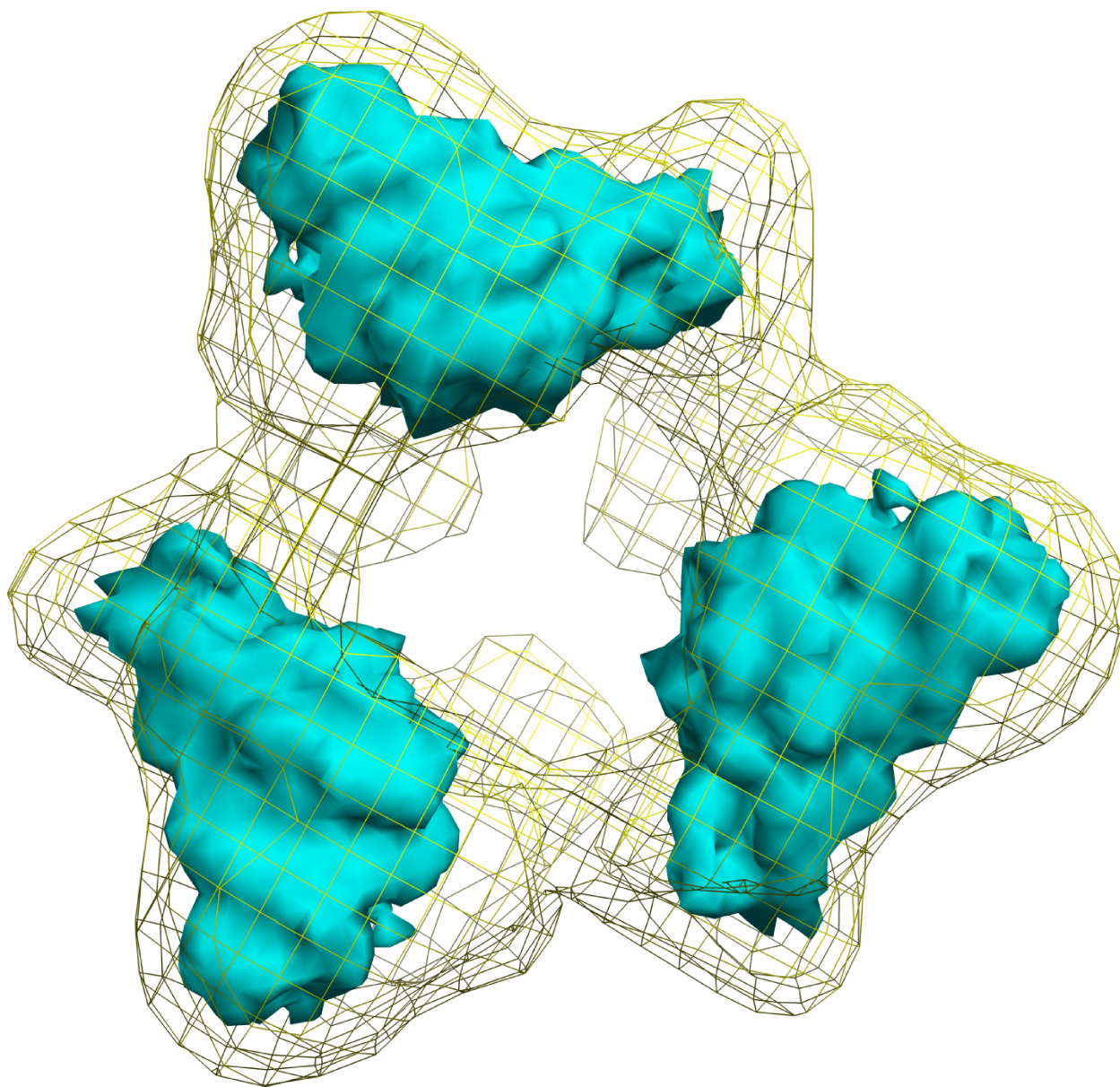


Figura 4.39. Análisis mediante filtración en gel y *Western blot* de complejos TrwK y TrwB formados en presencia de EGS.

(A) Filtración en gel de TrwB (rojo), TrwK (azul) y TrwK-TrwB con EGS (negro). *Western blot* anti-TrwK (B) y anti-TrwB (C) de los complejos inducidos por EGS (negro).

Estos resultados apoyan la idea de que ambas proteínas interaccionan. En ratios equimolares, en los cuales ya se observaba un 30 % de inhibición, ambas proteínas son capaces de formar un complejo. Este ensayo se ha realizado en ausencia de ADN para evitar la formación de complejos macromoleculares de ambas proteínas unidas al ADN y su posible confusión en el perfil de elución, dado que el tamaño de un monómero de TrwK es aproximadamente dos veces mayor que el de TrwB (TrwK monomérica aparecería a la misma altura que un posible dímero de TrwB).



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis era caracterizar bioquímica, funcional y estructuralmente a TrwK, el homólogo de VirB4 en el plásmido conjugativo R388. En ninguno de los tres aspectos se había profundizado mucho en el estudio de TrwK o cualquiera de sus homólogos, existiendo pocos trabajos anteriores focalizados en esta familia de proteínas. Aproximaciones genéticas sugerían interacciones con otros miembros del sistema [29, 45, 50, 53, 89, 117] durante el proceso de biogénesis del sistema, pero sin localizarla en ningún lugar en el tiempo en dicho proceso ni dando una ubicación clara o definitiva en el T4SS [50, 53, 125]. Así mismo, existía controversia acerca de su posible actividad ATPasa, sugerida pero no descrita [82, 125], y acerca de su topología y estructura [50, 87], extremadamente esquiva pese a múltiples esfuerzos. Por ello, este estudio ha tratado de arrojar luz sobre estos aspectos de las VirB4.

La similitud entre esta familia de proteínas es alta [83], siendo las proteínas más conservadas de los T4SS. Poseen varios motivos altamente conservados entre los que destacan dos motivos catalíticos Walker A y B [82, 126]. La presencia de estos motivos inducía a pensar que las proteínas VirB4 tenían actividad ATPasa. Sin embargo, y a pesar de un estudio realizado con la VirB4 de *A. tumefaciens* donde se reportaba una débil actividad [91], trabajos focalizados en la caracterización bioquímica de TrwK y de su homólogo en el plásmido RP4 (TrbE), describían a ambas proteínas como incapaces de hidrolizar ATP o GTP independientemente de las concentraciones de sal y del rango de pH. Además, la adición de ADN de cadena doble o sencilla tampoco inducía la hidrólisis de nucleótidos [82].

En este trabajo, se presentan las primeras evidencias consistentes e inequívocas, que demuestran la capacidad de TrwK para hidrolizar ATP en ausencia de otros miembros del sistema y define a la familia de las VirB4 como ATPasas.

Tras la publicación de nuestros resultados [48], han aparecido estudios en otros homólogos de TrwK que también demuestran la capacidad de las VirB4 para hidrolizar ATP. En concreto, esta actividad ATPasa se ha observado en TraB del plásmido pKM101, TraE de *Aeromonas veronii* y PrgJ de *E. faecalis* [54, 64, 86]. Sorprendentemente, estudios bioquímicos sobre TraB de pKM101 han demostrado que ambas mitades N y C-terminales son capaces de hidrolizar ATP, siendo una característica nueva no descrita en ningún otro homólogo de las VirB4. Por otra parte, PrgJ, un homólogo de VirB4 en la bacteria Gram-positiva *E. faecalis*, es capaz de hidrolizar ATP en la forma dimérica de la proteína. Además, una mutación en su dominio Walker A suprime la actividad ATPasa y la transferencia del plásmido pCF10 [54]. La

caracterización bioquímica de TraE de *A. veronii*, por otro lado, aporta unos parámetros cinéticos en presencia de distintos cationes divalentes, rangos de pH y temperatura similares a los obtenidos para TrwK [64].

La dificultad de encontrar actividad en la familia de las VirB4 viene dada por la especificidad en sus requerimientos de determinadas sales y su concentración, así como de los valores de pH. En el caso de TrwK, la elección de acetato de magnesio y de potasio resultó ser esencial para la determinación de la actividad ATPasa. Hay que señalar que en el citoplasma de *E. coli* el potasio está en altas concentraciones, mientras que las cantidades de sodio son insignificantes [127]. Además, se han descrito efectos negativos en el procesamiento de biopolímeros en *E. coli* en presencia de aniones cloruro [163]. Por todo ello, se optó por sustituirlos, en los ensayos de actividad, por iones de acetato. Este aumento de velocidad en presencia de iones de acetato queda demostrado en el resto de las VirB4 con actividad ATPasa caracterizada, ya que muestran valores de actividad máximos con parámetros de sales y pH similares a TrwK.

De la misma manera que ocurría con su posible actividad ATPasa, existía incertidumbre sobre el estado oligomérico de las VirB4. Distintos grupos habían ofrecido pruebas de diferentes estados oligoméricos de estas proteínas, desde monómeros o dímeros hasta agregados de mayor orden [50, 53, 54, 82, 86, 87, 123, 125]. Para arrojar más luz sobre este asunto, se llevaron a cabo estudios de ultracentrifugación analítica en condiciones de purificación y en las de los ensayos de actividad ATPasa. Dichos estudios mostraron que la proteína purificada se encontraba mayoritariamente en estado monomérico, pero cuando se incubaba en las condiciones del ensayo ATPasa, tendía a formar especies oligoméricas diversas: monómeros, dímeros, trímeros, hexámeros y agregados de mayor orden. Aunque en estas condiciones la proporción de hexámeros era mayor que en condiciones de purificación, ésta seguía siendo baja, entorno al 5 % del total. Este dato explicaría los bajos valores de actividad observados, suponiendo que el estado hexamérico corresponda a la forma activa, y teniendo en cuenta que los valores de hidrólisis de ATP están calculados respecto a la cantidad de proteína total.

Pese a estos resultados, continúa existiendo controversia acerca del estado oligomérico de la familia VirB4. Recientes estudios realizados en TraB del plásmido pKM101, definen a dicha proteína como dimérica en su forma inactiva extraída de la membrana y hexamérica en su forma soluble y activa [86]. Dicho estudio sugiere que existe un equilibrio entre ambas formas: la dimérica, capaz de unir ADN y nucleótidos pero incapaz de hidrolizar

ATP, y la hexamérica, con capacidad de hidrólisis. Los mismos autores, utilizando *small-angle X-ray scattering (SAXS)* [87], obtuvieron modelos de la fracción dimérica de membrana de TraB en los que postulaban que los NTD y CTD están implicados en la dimerización de la proteína. Por otro lado, LvhB4, la homóloga de VirB4 en *L. pneumophila*, ha sido descrita como soluble y monomérica [87]. El homólogo de VirB4 en *H. pylori* aparece también como monómero [82]. Estos estudios sobre el estado oligomérico de las proteínas de esta familia llevan a pensar en un equilibrio dinámico entre diferentes estados, siendo su conformación hexamérica la forma activa capaz de hidrolizar ATP.

Otro aspecto muy controvertido sobre las VirB4 es el referente a su topología. Existen estudios que las describen como proteínas de membrana, conteniendo entre uno y cuatro segmentos transmembrana [117]. Otros estudios llevaron a cabo predicciones de segmentos transmembrana en VirB4, describiendo entre cero [50] y cuatro segmentos [151]. Concretamente, para TrwK, estas predicciones no describían segmento transmembrana alguno. Además, ni en la purificación de TrwK, ni en los ensayos de actividad ATPasa ni en los análisis de ultracentrifugación analítica o de microscopía electrónica, fue necesario el uso de detergentes. Estos datos apuntaban claramente a que TrwK no era una proteína de membrana. Atendiendo a estos resultados, nos propusimos analizar las secuencias de 64 proteínas correspondientes a homólogos de VirB4 que representasen el amplio espectro filogenético descrito en [83]. De este análisis pudimos concluir que, salvo los homólogos de VirB4 de la rama IncX y TrbE del plásmido RP4, todas las proteínas VirB4 carecen de segmentos transmembrana. Reforzando esta idea, recientes estudios han identificado genes de varias VirB4 que codifican un único polipéptido compuesto por VirB3 y VirB4 fusionadas formando una sola proteína [81, 85]. Nosotros hemos observado que, a diferencia de estudios previos [152], el homólogo de VirB4 en el plásmido R6K codifica un solo péptido que contiene PilX3 y PilX4 (VirB3 y VirB4) fusionadas [48]. Además, en estos mismos grupos no se han identificado proteínas de la familia VirB3, las cuales pasarían a estar directamente fusionadas con las VirB4 generando proteínas de mayor tamaño en todas ellas. Por otra parte, en la mayoría de T4SS hay una sintenia conservada de genes en la que *virB3* se encuentra aguas arriba de *virB4*.

VirB3 es una proteína integral de membrana interna [152, 153] cuya estabilidad es dependiente de la presencia de VirB4 [45]. En este trabajo se han realizado fusiones transcripcionales y traduccionales de TrwM (VirB3) y TrwK (VirB4) y se ha analizado su ubicación celular. Ambas construcciones se encuentran en la fracción de membrana interna, reforzando la idea de que la función de las VirB3 es localizar a las VirB4 en la cara citosólica de

la membrana interna, para hacer más fácil su posible interacción con las proteínas del complejo (incluidos los otros dos motores del sistema [29, 50, 51]), así como con los distintos sustratos (ADN, relaxasa o efectores) [54].

Tras la caracterización bioquímica de la proteína, el siguiente objetivo de esta Tesis fue su caracterización estructural. En el momento de acometer este trabajo tan solo existía el modelo bioinformático de la mitad C-terminal de VirB4 de *A. tumefaciens* [50]. Se usó una aproximación similar para crear un modelo del CTD de TrwK, residuos 413-772, usando como molde la estructura cristalográfica de TrwBΔN70 (1e9r.pdb). Un análisis comparativo entre el modelo de TrwK y la estructura de TrwB nos permitió identificar la presencia de tres α -hélices en el extremo C-terminal, residuos del 772 al 823, que no están presentes en TrwB. En un alineamiento de un gran número de secuencias de homólogos de VirB4 pudimos comprobar que este motivo con tres α -hélices está altamente conservado en todas las VirB4. Al estar ausente este motivo en TrwB no fue posible modelar el extremo C-terminal de TrwK (los últimos 56 aminoácidos).

A la vista de estas diferencias en el extremo C-terminal de VirB4 respecto a TrwB, nos propusimos eliminar secuencialmente estas tres α -hélices para determinar si este dominio era el responsable de las diferentes propiedades bioquímicas y funcionales entre ambas proteínas. Las variantes resultantes fueron purificadas y caracterizadas bioquímicamente. Sorprendentemente, los valores de actividad ATPasa de estos mutantes resultaron ser diez veces superiores a la proteína salvaje. A pesar de este incremento en la velocidad de hidrólisis, las constantes cinéticas no variaban con respecto a la proteína salvaje, manteniendo valores de $K_m(ap)$ y coeficientes de Hill similares, lo que sugiere que la eliminación seriada de las tres α -hélices no inducen cambios conformacionales en el sitio de unión a nucleótidos.

El considerable aumento en los valores de actividad ATPasa podría llevar a pensar en una mayor actividad *in vivo* y, por ello, unas frecuencias de conjugación mucho mayores: concretamente, de un orden de magnitud, atendiendo a la diferencia con la actividad ATPasa de la proteína salvaje *in vitro*. Sin embargo, estos mutantes no eran capaces de complementar la actividad *in vivo* de TrwK en los ensayos de conjugación. La ausencia de transconjugantes indica que el extremo C-terminal juega un papel vital en el proceso de conjugación, ya sea en la interacción con el sustrato [27, 47, 54, 89] o con los otros dos motores del sistema [29, 50, 53]

Los efectos de eliminar una, dos o las tres α -hélices, son los mismos en cuanto a los valores de actividad ATPasa y las frecuencias de conjugación obtenidas para los tres mutantes. Este resultado lleva a pensar que tan sólo la última α -hélice, ausente en los tres mutantes, es la responsable de la autoinhibición de la proteína. Apoyando este resultado, trabajos anteriores realizados en TrbE del plásmido RP4, demostraban que mutaciones en los aminoácidos W837 y L838 inactivaban la proteína [82]. Ese triptófano, residuo 808 en TrwK, está altamente conservado en todas las VirB4 [51]. De la misma manera, mutaciones en el CTD de VirB4 de *A. tumefaciens* conducen a su desestabilización [117].

Los datos obtenidos en los ensayos *in vivo* e *in vitro* sugieren que el extremo C-terminal de TrwK actuaría como una región autoinhibitoria de la proteína, previniendo el gasto innecesario de energía en momentos en los que no ejerce ningún tipo de función. Estos datos podrían estar en concordancia con los obtenidos acerca de la regulación del plásmido R388, que permanece inhibido en condiciones basales. Posibles cambios conformacionales en el extremo C-terminal, ya sea al ponerse en contacto con sus posibles sustratos, al interactuar con los otros motores del sistema o con el cese de su autoinhibición, llevarían a un aumento en la actividad de hidrólisis de ATP y, por ende, a una correcta funcionalidad en el transporte de sustratos.

Se han descrito mecanismos similares de autoinhibición en varias familias de proteínas: kinesinas [131, 132], Hsp90 [133, 134], kinasas [135, 136, 137], calcio ATPasas [138, 139, 140, 141] y ATPasas tipo P [142, 143, 144, 145]. Además, en varios casos, péptidos sintéticos constituidos por los aminoácidos correspondientes a sus dominios reguladores han sido utilizados para caracterizar el mecanismo inhibitorio de esas proteínas [138, 141, 146]. En algunas de ellas, la inhibición de la actividad ATPasa e lleva a cabo por un péptido codificado por otro gen, controlando su regulación de manera externa. Este es el caso de la F_1 -ATPasa mitocondrial, inhibida por el péptido externo IF₁ [147]. Esta proteína se une a la interfaz entre las subunidades α y β de la F_1 -ATPasa, bloqueando de este modo el mecanismo de rotación [148, 149]. Por otro lado, y en contraste con la mitocondrial, la inhibición de la F_1 -ATPasa de *E. coli* se realiza mediante cambios conformacionales en el CTD de uno de sus componentes [150] sin la necesidad de codificar una proteína externa específica.

En el caso de TrwK, pudimos observar que la adición de un péptido sintético con una secuencia idéntica a su última α -hélice revertía el incremento en la actividad ATPasa de los mutantes del extremo C-terminal. Por ello, atendiendo a esta similitud en los mecanismos de inhibición, podría especularse como un mecanismo general de inhibición de ATPasas

hexaméricas. Según este modelo, la última α -hélice de TrwK actuaría de modo similar a como lo hace el inhibidor de la F_1 -ATPasa, induciendo cambios conformacionales en su estructura que impedirían el acceso al sitio de unión de nucleótidos obstruyendo los cambios conformacionales provenientes de la hidrólisis de ATP y esenciales para ejercer su trabajo mecánico (Fig. 5.1).

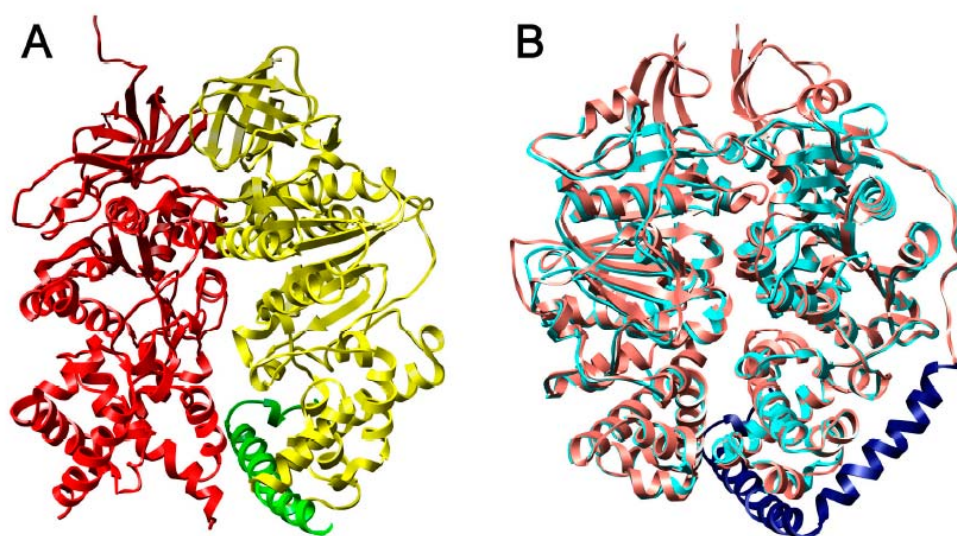


Figura 5.1. Modelo del mecanismo de regulación de la hidrólisis de ATP en la F_1 -ATPasa y en las VirB4.

(A) Representación de la estructura de la F_1 -ATPasa con su proteína inhibitoria IF₁ (2V7Q.pdb). Subunidad α (rojo), β (amarillo) y residuos 8-41 de la IF₁ (verde).

(B) Representación del modelo de la estructura de TrwK (cian), superpuesta en la estructura de TrwB (salmón), (1e9r.pdb). En ausencia de datos estructurales, las tres α -hélices del CTD de TrwK (56 residuos) han sido modeladas (azul oscuro) de manera que la última α -hélice se une en la interfaz entre dos subunidades del hexámero, bloqueando el mecanismo catalítico. El mecanismo de inhibición podría ser similar al de IF₁-ATPasa.

Uno de los objetivos de esta Tesis era la obtención de la estructura tridimensional de TrwK, ya que se desconocían muchos detalles, sobre todo de su mitad N-terminal. En este trabajo se ha obtenido la primera estructura tridimensional de la proteína entera, en su forma hexamérica, mediante microscopía electrónica. La combinación de esta información estructural con análisis bioquímicos y filogenéticos proporciona nuevos conocimientos sobre la función y la evolución de la familia VirB4. Además, arroja luz acerca del estado oligomérico de la proteína en su forma activa. Recientemente, se ha publicado la estructura cristalográfica del dominio C-terminal del homólogo de VirB4 en la bacteria extremófila *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* (4ag6.pdb) [123]. La estructura es similar a los modelados informáticos que se habían descrito previamente [50, 51], reforzando la idea de una alta similitud estructural con la estructura de la proteína acopladora TrwB [71]. En el mismo estudio, se comprobó que

una mutación en el motivo *arginine finger* de VirB4 suprime completamente la actividad ATPasa de la proteína [123], lo cual indica que la proteína necesita oligomerizar para ser activa. Estudios previos en nuestro grupo ya demostraban un aumento en la proporción de hexámeros de TrwK, mediante ultracentrifugación analítica, en condiciones de máxima actividad ATPasa [48]. Este hecho es común en todas las ATPasas de la familia AAA+/RecA, las cuales son activas en su forma hexamérica. Por lo tanto, la estructura hexamérica resuelta en este trabajo corresponde a la forma activa de la proteína.

La estructura tridimensional obtenida está formada por dos anillos hexaméricos conectados por una constricción en la zona central. Los dos anillos tienen diámetros externos distintos, 132 Å y 124 Å, correspondientes a los NTD y CTD, respectivamente. La longitud del hexámero es de 165 Å, en concordancia con el tamaño estimado de un monómero de VirB4 unido al canal periplásmico y descrito previamente mediante microscopía electrónica en pKM101 [123]. Quizás la característica más importante de esta estructura es el tamaño del diámetro interno (42 Å), que es bastante mayor que el de TrwB (8 Å) [71] y se asemeja bastante al de FtsK (31 Å aproximadamente) [72], una ADN translocasa implicada en segregación cromosómica. Es importante señalar que, a pesar de que los modelos bioinformáticos de TrwK y VirB4 fueron generados usando la estructura de TrwB como molde, esos mismos análisis bioinformáticos también ofrecían la posibilidad de usar como molde FtsK. De hecho, existen análisis filogenéticos que han relacionado a las VirB4 con ADN translocasas, como las proteínas acopladoras VirD4/TrwB y con las proteínas de la familia FtsK/SpoIIIE [77, 78]. Estos análisis filogenéticos sugieren que las familias VirB4 y VirD4 podrían haber derivado de bombas de ADN de plásmidos ancestrales, apareciendo tras la primera diversificación entre Archaea y Bacteria [77, 78]. Por el contrario, las proteínas FtsK podrían haber evolucionado a partir de un precursor anterior, una ATPasa encargada del empaquetamiento del ADN de cadena doble de los virus A32 [78].

En este trabajo nos hemos centrado en la evolución del dominio motor de las proteínas VirB4, VirD4 y FtsK. Dicho dominio está altamente conservado en toda la familia de las RecA, lo que puede sugerir un mecanismo de acción común en toda la familia, independientemente del proceso mecánico, derivado de la hidrólisis de ATP, que realice cada proteína. Los datos de análisis filogenéticos sugieren que el dominio motor de las FtsK diverge de las VirD4 y VirB4. Además, se ha incorporado al estudio una translocasa de ADN de cadena doble de un plásmido conjugativo de *Streptomyces* que ha sido descrita como altamente

relacionada con las FtsK [121]. Sorprendentemente, encontramos que el dominio motor de TraB_{pSVH1} parece haber evolucionado de un ancestro común con las VirB4 y VirD4.

Basándonos en la similitud estructural entre los dominios motor de VirB4 y dichas translocasas, procedimos a ajustar las estructuras atómicas de los hexámeros de TrwB y FtsK_{CTD} en el mapa de microscopía electrónica de TrwK. Dado que las dimensiones externas e internas de FtsK se ajustaban mejor en la reconstrucción tridimensional que las de TrwB, se decidió alinear cada monómero de VirB4_{CTD} de *T. pseudethanolicus* [123] y de TrwK en las posiciones relativas de FtsK en el mapa de microscopía. Este hexámero se ajustaba mucho mejor al volumen obtenido, dando una idea más real de la disposición de sus monómeros, mejorando así las aproximaciones realizadas en trabajos anteriores tomando como referencia el hexámero de TrwB [50, 51].

Por otro lado, las estructuras atómicas de los hexámeros de VirB4_{CTD}, TrwB y FtsK_{CTD} fueron filtradas a 20 Å y acopladas en el mapa de microscopía electrónica de TrwK. El ajuste de dichas estructuras ocupa aproximadamente el 40 % del volumen total, apoyando así, la precisión del modelo. Es importante resaltar que TrwK posee 823 residuos y sólo 359 forman parte del modelado estructural del CTD, siendo, en el caso de la estructura cristalográfica de TpsVirB4 [123], 383 residuos los que comprenden dicha estructura. La estructura cristalográfica de FtsK_{CTD} contiene 406 residuos [72] y ocupa un espacio similar en el mapa de microscopía.

Del mismo modo que FtsK, la mayoría de las VirB4 poseen un NTD, mucho menos conservado que la región que contiene el dominio motor y muy poco conocido en cuanto a estructura y función. En TrwK se ha sugerido que el NTD sea responsable de la oligomerización de la proteína, conteniendo un posible dominio de cremallera de leucinas alrededor del aminoácido 300 en muchos de sus homólogos [82]. Otra de las funciones que se han propuesto para el NTD es la de ser una posible zona de unión con otras proteínas del sistema [48, 50]. Una de esas proteínas podría ser VirB3, ya que existen clados en los cuales ambas proteínas están fusionadas [48] y, en el caso de TrwK y TrwM, situándose su fusión en la fracción de membrana interna.

Un reciente estudio por microscopía electrónica en el que se reconstruía un complejo formado por el canal periplásmico y la VirB4 de pKM101, TraB, [123] sitúa a un monómero de TraB embebido en la zona periplásmica del canal y no bajo ella, como cabía esperarse (Fig 5.2). Esta interacción entre VirB4 y el canal periplásmico permitiría, según los autores, que cambios

conformacionales inducidos por la hidrólisis de ATP VirB4 promoviesen la apertura de la cara citosólica del canal periplásmico y el paso del sustrato a través de él. A pesar de que en estas reconstrucciones sólo aparece un monómero de TraB, en esos mismos estudios se puede observar también la presencia de dímeros y trímeros unidos al canal periplásmico [123]. Trabajos anteriores de los mismos autores [86] describen dos localizaciones de la proteína: dimérica asociada a membrana y hexamérica soluble y catalíticamente activa. En cualquier caso, resulta difícil imaginar la ubicación del homólogo de VirB3 (en pKM101, TraA), supuestamente unido al extremo N-terminal de VirB4/TraB. VirB3 es una proteína transmembrana no presente en dicha estructura y siendo una proteína anclada a la membrana interna, resultaría muy complicado que el extremo N-terminal de VirB4 estuviera en el periplasma tal y como proponen en estos estudios.

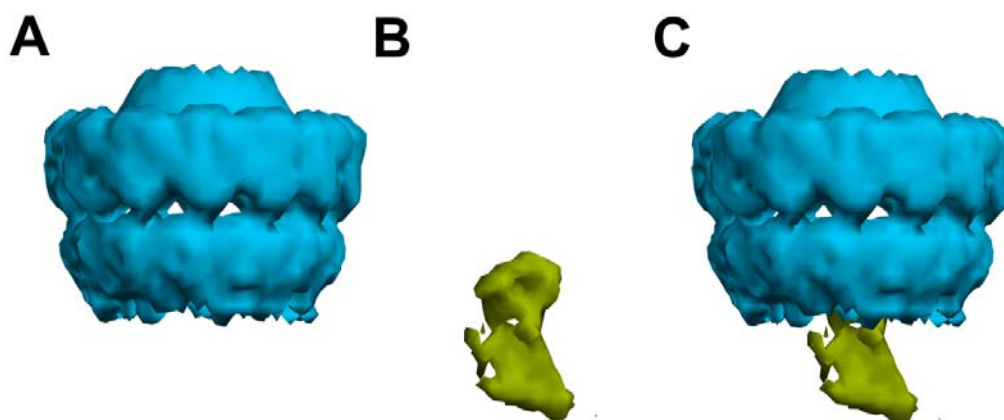


Figura 5.2. Estructura del canal periplásmico de pKM101 en ausencia y en presencia de TraB, el homólogo de VirB4 en pKM101.

(A) Reconstrucción 3D del canal periplásmico tras digestión con elastasa.

(B) Reconstrucción 3D de TraB.

(C) Reconstrucción del complejo canal periplásmico-TraB en el que se observa cómo el dominio N-terminal de monómero de TraB estaría embebido dentro de la pared del canal periplásmico, quedando su CTD en la cara citosólica. La hidrólisis de ATP por TraB provocaría la apertura del canal, permitiendo el transporte de sustratos. Modificada de [123].

Basándonos en estas consideraciones, proponemos un modelo alternativo en el que el hexámero de VirB4 puede interactuar con el canal periplásmico en el lado citosólico de la membrana interna y no con la cara periplásmica de la membrana interna (Fig. 5.3). De hecho, las dimensiones de la estructura hexamérica de TrwK se ajustan perfectamente con la base de la estructura del canal periplásmico del T4SS resuelta por crio-microscopía [39].

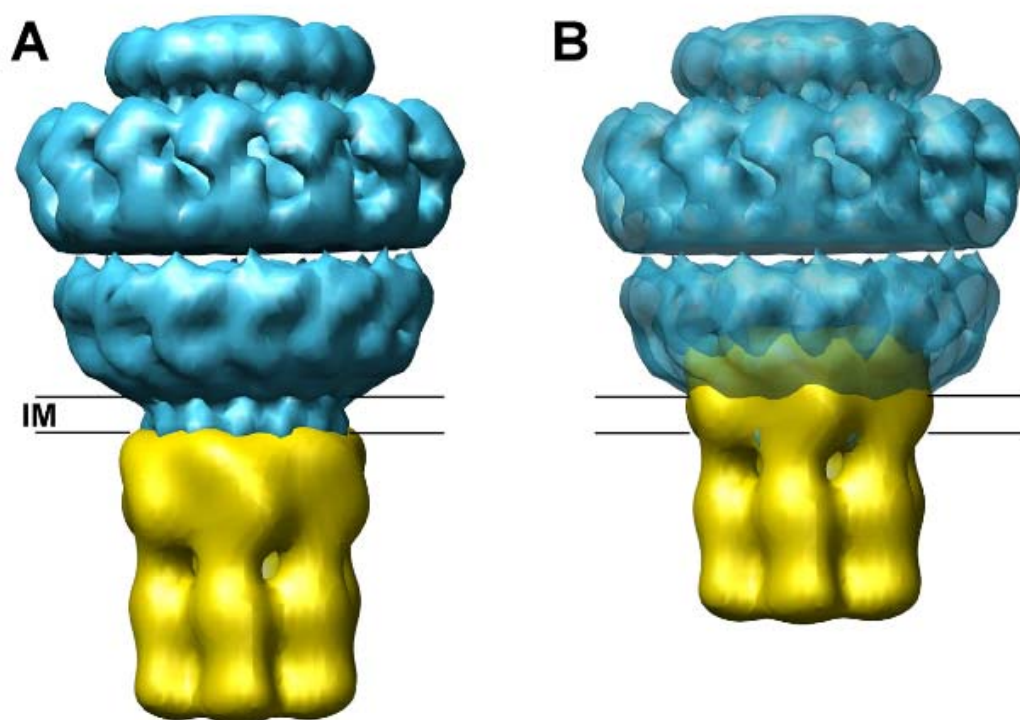


Figura 5.3. Modelo de la interacción de TrwK con el canal periplásmico.

La estructura del canal periplásmico del T4SS obtenida por criomicroscopía (emd_5031.map) fue filtrada a 20 Å (azul) [39]. La estructura hexamérica de TrwK (emd_5505.map) ha sido ajustada al canal periplásmico en dos posibles localizaciones: unida a la cara citoplasmática de la membrana interna (A) o embebida en la membrana interna (B), como ha sido descrito en [123]. El modelo del panel A es más compatible con la presencia de VirB3 unida al NTD de VirB4.

A pesar de numerosos estudios genéticos, estructurales y bioquímicos, la función biológica de las proteínas VirB4 está todavía por determinar. Las VirB4 han sido descritas como vitales en la biogénesis del *pilus* [117], pero también han sido propuestas como participantes directas en la secreción de factores de virulencia [24, 125]. Por otra parte, se ha descrito que VirB4 podría unir ADN de manera inespecífica [22, 54, 86, 126]. Por tanto, y para poder caracterizar estas posibles interacciones de las VirB4 con el ADN, nos propusimos realizar ensayos de unión de TrwK al ADN y comprobamos que, en efecto, TrwK es capaz de unir ADN. Sorprendentemente, observamos que al igual que TrwB [66], TrwK une ADN *G-quadruplex* con mayor afinidad que ADN de cadena sencilla.

Se testó también la capacidad de unión al *G-quadruplex* por parte de mutantes de TrwK estructurales y puntuales, con características similares a TrwB (TrwK₄₁₃₋₈₂₃ y TrwK(D575A_D578K)), obteniéndose constantes de unión del mismo orden de magnitud que con TrwK. Sin embargo, existen diferencias en dichas constantes y en sus parámetros de

cooperatividad. Ambos mutantes poseen afinidades mayores que TrwK salvaje y valores de cooperatividad cercanos a los de TrwB. Si bien la variación en cuanto a las constantes no sufre un cambio significativo, estos resultados refuerzan la idea de que la similitud estructural entre TrwB y TrwK se correlaciona con características funcionales semejantes. Estos datos llevan a pensar que la unión de TrwK al ADN podría no ser inespecífica o artefactual, sino que podría jugar un papel importante, a nivel funcional, durante el proceso de bombeo del ADN a través del canal en la conjugación.

La homología estructural entre TrwK y TrwB, así como la unión de TrwK al ADN, hace especular acerca de la posibilidad de que ambas proteínas podrían interaccionar formando heterocomplejos. A este respecto, cabe señalar la capacidad de PrgJ, el homólogo de VirB4 en *E. faecalis*, para unirse a ADN de cadena simple y doble sin secuencia específica y al plásmido pCF10 *in vivo* con su *oriT* intacto [54]. También es capaz de interaccionar con PcfC, la proteína acopladora, así como con la proteína accesoria y su relaxasa. Estos datos sugieren que PrgJ es capaz de unirse a los miembros del Dtr independientemente de cada uno de ellos y que la formación de los complejos PrgJ-PcfF y PrgJ-PcfG es independiente de la actividad catalítica propia de la proteína, teniendo las mismas capacidades de unión la proteína salvaje que un mutante en el motivo Walker A. Este resultado les permite proponer un modelo en el que la proteína acopladora podría unirse al relaxosoma mediante la relaxasa y la proteína accesoria, PcfF y PcfG (TrwC y TrwA en R388). Tras ello, interaccionaría con VirB4, que, a su vez, podría catalizar la transferencia del sustrato.

Reforzando esta idea, en este trabajo se describe que la actividad ATPasa de TrwB es inhibida por TrwK y que la actividad de TrwK_1-801 es también inhibida por un mutante de TrwB carente de actividad, TrwB Δ N70(W216A). Efectos similares de formación de heterocomplejos defectivos en su actividad puede observarse en TrwB con la adición del mutante TrwB Δ N70(W216A) [46] y en otras ADN translocasas como FtsK [72] o RuvB [154]. Además, mediante estudios de *cross-linking* hemos obtenido un complejo equimolar de TrwB y TrwK, reconocido por ambos anticuerpos. Estos datos indicarían una posible interacción entre ambas proteínas con la posible formación de heterocomplejos de TrwB y TrwK.

La caracterización estructural y bioquímica de TrwK reportada en esta Tesis aporta nuevas e importantes ideas acerca del papel de las VirB4 en los sistemas de secreción de tipo IV, ya sea en el proceso de formación del mismo o de secreción de efectores proteicos y/o ADN. Basándonos en nuestros resultados y en los de otros laboratorios, proponemos el siguiente modelo (Fig. 5.4):

A) Biogénesis del *pilus*:

i) TrwK (VirB4) sería una de las primeras proteínas en ser sintetizadas e incorporadas a la membrana mediante interacciones con TrwM (VirB3). La pilina inmadura o pre-pilina TrwL (VirB2) se incorporaría a la membrana interna gracias a su secuencia señal, que sería posteriormente procesada, posiblemente por la peptidasa LepB [33].

ii) TrwK, en combinación con TrwD (VirB11), expulsaría la pilina madura de la membrana interna hacia el periplasma [47]. La tendencia de la pilina a no exponer sus regiones hidrofóbicas conduciría a la polimerización del *pilus*.

iii) La polimerización del *pilus* y formación del canal deben ir acompañadas por la degradación de la capa de peptidoglicano que se encuentra en el periplasma, posiblemente mediante la acción de TrwN (VirB1), ya que se ha descrito su posible actividad transglicosilasa [44]. No se conoce cuál de los dos procesos sería el primero en suceder, la formación del canal o del *pilus*; en cualquier caso, TrwK sería una de las primeras proteínas en formar parte del T4SS. Se ha descrito que la actividad ATPasa de las VirB4 no es necesaria para la formación del canal periplásmico, aunque sí es necesaria su presencia. En el caso de la translocación de la pilina, su actividad sí es necesaria. Por ello, la autoinhibición descrita en esta tesis podría ocurrir durante el proceso de formación del complejo cuando su actividad no es necesaria. En el momento de la translocación de la pilina, TrwD actuaría de activasa de TrwK [47] provocando el cese de su inhibición, probablemente mediante la interacción entre ambas proteínas [29, 50, 53].

B) Secreción:

i) Una vez formado el aparato secretor, daría comienzo la secreción propiamente dicha. En el modelo de conjugación *shoot & pump* [155], la conjugación comenzaría por la acción de la relaxasa sobre el plásmido. Esta relaxasa (TrwC en R388) quedaría covalentemente unida al extremo 5' del ADN. Este complejo nucleoproteico sería llevado al canal mediante la proteína acopladora TrwB (VirB4) y la proteína accesorio TrwA.

ii) El siguiente paso consistiría en el bombeo del sustrato a través del canal periplásmico. La interacción de VirB4 con el canal periplásmico y los cambios conformacionales asociados a la hidrólisis de ATP, promoverían la apertura del canal. Es posible que la actividad ATPasa de TrwK no esté directamente relacionada con el transporte de sustrato sino con los

pasos previos a dicho transporte y por ello, la energía necesaria para el transporte de sustratos vendría de las otras dos ATPasas del sistema, TrwD y TrwB [29].

iii) TrwD ayudaría a desplazar a TrwK de la base del canal, siendo ésta remplazada por la proteína acopladora TrwB, que estaría unida al complejo nucleoproteico relaxasa-ADN [50]. En este sentido, es importante señalar la posible contribución de TrwD tanto en el proceso de biogénesis como en el transporte, ya que se ha visto que puede interaccionar tanto con TrwK como con TrwB (Ripoll-Rozada J, sin publicar). Asimismo, se ha visto que TrwD es capaz de formar complejos con la proteína acopladora y con VirB6 (TrwI) y VirB8 (TrwG) [29]. Estas interacciones necesitarían la presencia de TrwK. Este complejo interaccionaría con VirB9 (TrwF) y VirB2 (TrwL) (componentes del canal y del *pilus*, respectivamente) en un proceso dependiente de la presencia de VirB3 (TrwM), VirB5 (TrwN), y VirB10 (TrwE) (componentes aledaños al canal, del *pilus* y del canal, respectivamente) [29]. Por otro lado, teniendo en cuenta la capacidad de TrwK de unión al ADN y de formar hetero-complejos con TrwB, podría ocurrir un paso previo al bombeo del sustrato. Este paso intermedio constituiría un estado de transición que ayudaría al desplazamiento de TrwK de la base del canal.

iv) La proteína acopladora TrwB bombearía el sustrato nucleoproteico a través del canal. Para que esto ocurra el sustrato proteico tiene que ser previamente desplegado, ya que es difícil imaginar como una proteína del tamaño de TrwC pueda pasar a través del canal en su estado nativo. En este proceso de desplegamiento, TrwD podría desempeñar un papel esencial. De hecho, TrwD guarda cierta homología estructural con ClpB, una *unfoldasa* de la familia Hsp100 [61].

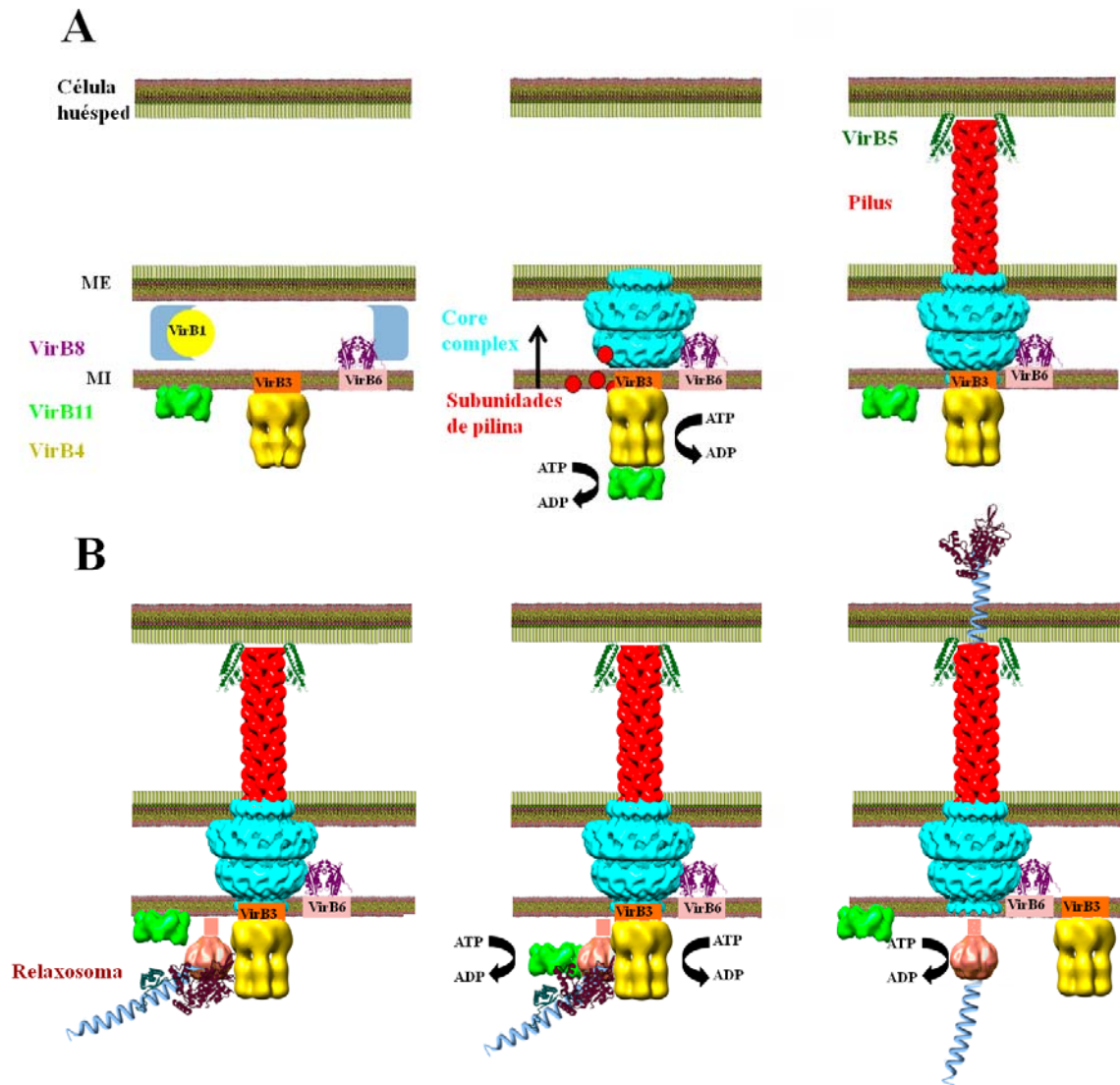
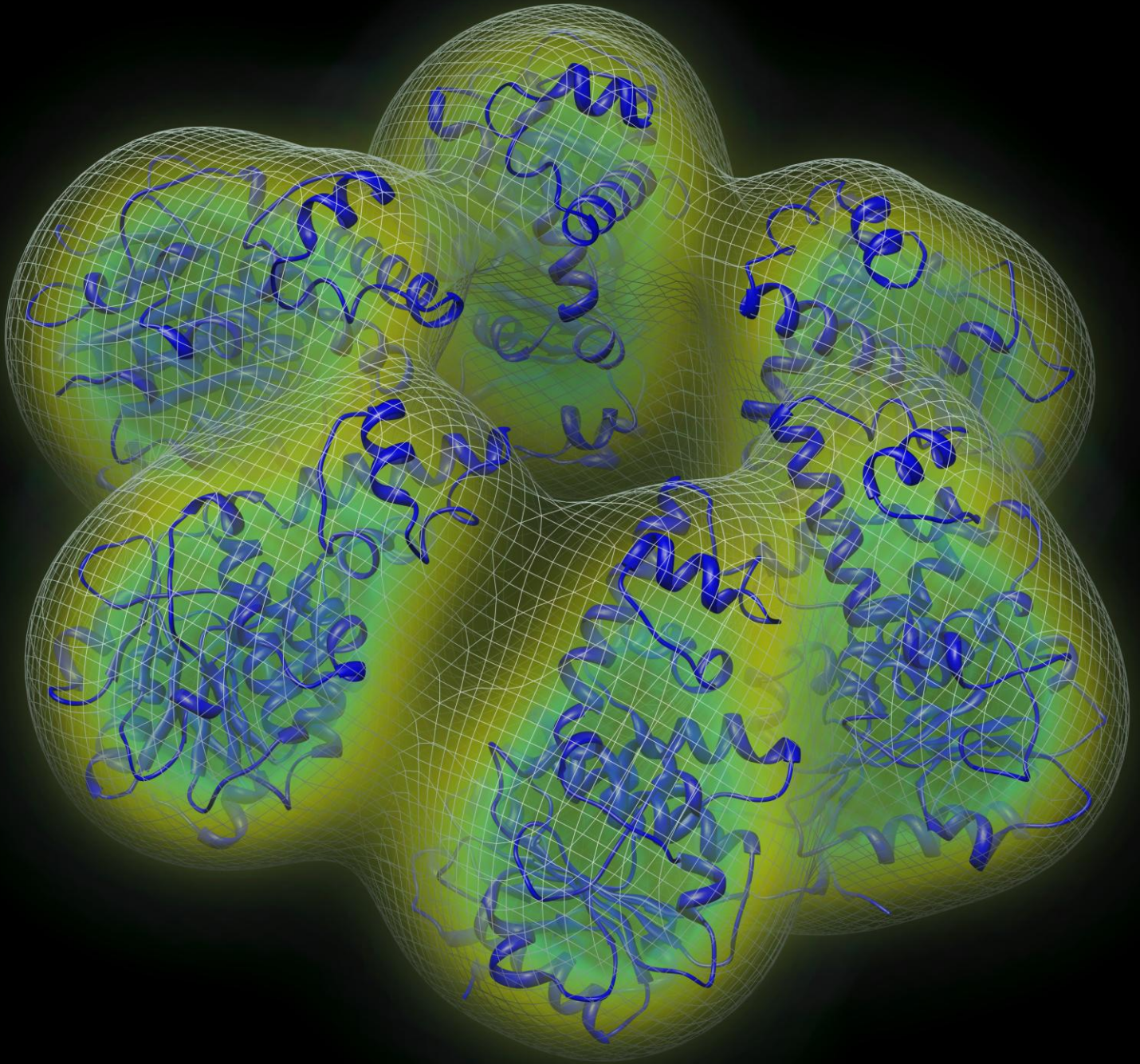


Figura 5.4. Representación esquemática del modelo de formación del canal periplásmico y el *pilus* conjugativo y del proceso de transporte del ADN.

(A) Secuencia esquemática del proceso de formación del *pilus* y el canal periplásmico mediante la interacción TrwD-TrwK y el cese de la inhibición de TrwK, que proporcionan la energía necesaria para la formación del canal periplásmico y el transporte de las subunidades de pilina.

(B) Transporte del ADN a través del *pilus* conjugativo mediante la formación del relaxosoma, la interacción de las tres ATPasas y la formación de heterocomplejos entre TrwB y TrwK para facilitar la colocación de TrwB en la base del canal y el transporte del complejo ADN-relaxasa.

Sin embargo, tanto los diferentes modelos descritos [29, 50, 54], como el propuesto en la figura 5.4, deben ser tomados con cautela. Es posible que la homología estructural entre las VirD4 y las VirB4 tan solo refleje reminiscencias evolutivas y que no tenga ninguna función biológica en los T4SS actuales, pudiéndose explicar por el alto grado de conservación del dominio motor en las RecA ATPasas y su gran similitud entre TrwK y otras ADN translocasas. Los datos de los análisis filogenéticos sugieren la existencia de un antepasado común para esta gran familia de proteínas, teniendo como nexo común el dominio motor y haciendo así comparables los mecanismos de hidrólisis de ATP y los cambios conformacionales derivados de éstos. Por ello, capacidades como la autoinhibición de la proteína mediante su extremo C-terminal, la capacidad de unión al ADN y la posible formación de heterocomplejos con proteínas con un alto grado de conservación en su estructura, podrían ser capacidades generales o reminiscencias evolutivas de proteínas muy relacionadas estructuralmente.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.1. TrwK presenta actividad ATPasa.

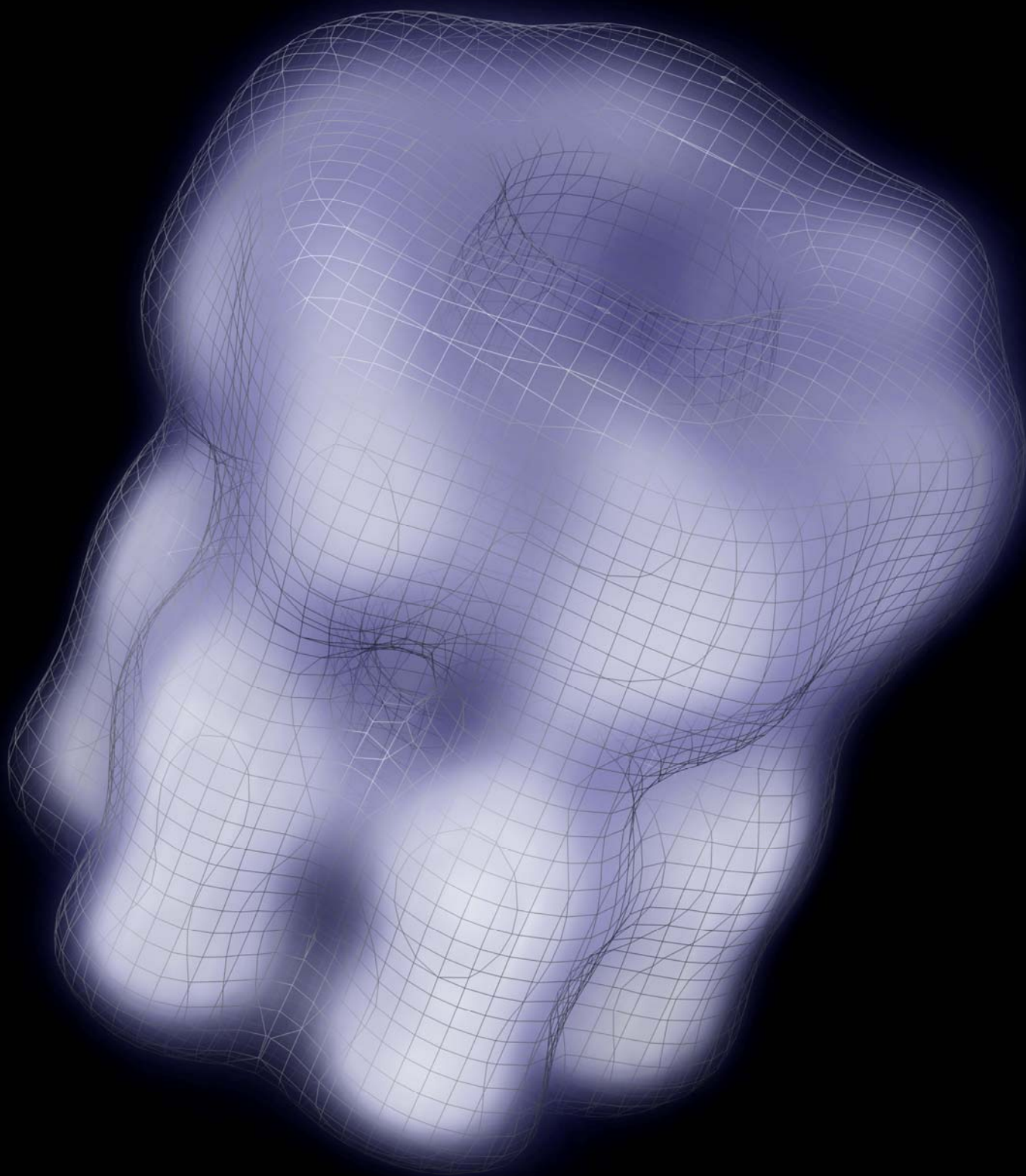
6.2. El estado oligomérico de TrwK es dependiente de las condiciones de sales, pH y concentración.

6.3. Las estructuras α -helicoidales presentes en el extremo C-terminal de TrwK están implicadas en la auto-inhibición de la proteína.

6.4. TrwK es capaz de unir ADN, presentando, al igual que TrwB, una mayor afinidad por estructuras *G-quadruplex* que por cadena sencilla.

6.5. Obtención de la primera estructura tridimensional de TrwK en su estado hexamérico.

6.6. El ajuste de las estructuras cristalográficas de translocasas de ADN en el volumen de TrwK, junto con la capacidad de unión al ADN, refuerza la hipótesis de que las VirB4 están filogenéticamente relacionadas con dichas ATPasas de la familia RecA, compartiendo con ellas un dominio motor altamente conservado.



BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bleves, S., et al., *Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons*. International Journal of Medical Microbiology, 2010. **300**(8): p. 534-543.
2. Economou, A., et al., *Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes*. Molecular Microbiology, 2006. **62**(2): p. 308-319.
3. Tseng, T.T., B.M. Tyler, and J.C. Setubal, *Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology*. BMC Microbiol, 2009. **9 Suppl 1**: p. S2.
4. Michel, G.P.F., et al., *Role of fimV in type II secretion system-dependent protein secretion of Pseudomonas aeruginosa on solid medium*. Microbiology-Sgm, 2011. **157**: p. 1945-1954.
5. Bendtsen, J.D., et al., *Non-classical protein secretion in bacteria*. BMC Microbiol, 2005. **5**: p. 58.
6. Duong, F., et al., *The AprX protein of Pseudomonas aeruginosa: a new substrate for the Apr type I secretion system*. Gene, 2001. **262**(1-2): p. 147-153.
7. Holland, I.B., L. Schmitt, and J. Young, *Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review)*. Molecular Membrane Biology, 2005. **22**(1-2): p. 29-39.
8. Koronakis, V., J. Eswaran, and C. Hughes, *Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 467-89.
9. Filloux, A., *The underlying mechanisms of type II protein secretion*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2004. **1694**(1-3): p. 163-179.
10. Peabody, C.R., et al., *Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella*. Microbiology-Sgm, 2003. **149**: p. 3051-3072.
11. Cornelis, G.R., *The type III secretion injectisome*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(11): p. 811-25.
12. Marlovits, T.C., et al., *Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex*. Science, 2004. **306**(5698): p. 1040-1042.
13. Reichow, S.L., et al., *Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state*. Nature Structural & Molecular Biology, 2010. **17**(10): p. 1226-+.

14. Dautin, N. and H.D. Bernstein, *Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway*. Annual Review of Microbiology, 2007. **61**: p. 89-112.
15. Coutte, L., et al., *Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function*. Molecular Microbiology, 2003. **49**(2): p. 529-539.
16. Fronzes, R., P.J. Christie, and G. Waksman, *The structural biology of type IV secretion systems*. Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(10): p. 703-714.
17. Pukatzki, S., et al., *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, 2007. **104**(39): p. 15508-13.
18. Filloux, A., A. Hachani, and S. Bleves, *The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 6): p. 1570-83.
19. Leiman, P.G., et al., *Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4154-9.
20. Basler, M., et al., *Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure*. Nature, 2012. **483**(7388): p. 182-U78.
21. Baron, C., D.O. Callaghan, and E. Lanka, *Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes*. Molecular Microbiology, 2002. **43**(5): p. 1359-1365.
22. Cascales, E. and P.J. Christie, *The versatile bacterial type IV secretion systems*. Nature Reviews Microbiology, 2003. **1**(2): p. 137-149.
23. Christie, P.J., et al., *Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems*. Annual Review of Microbiology, 2005. **59**: p. 451-485.
24. Christie, P.J. and J.P. Vogel, *Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells*. Trends in Microbiology, 2000. **8**(8): p. 354-360.
25. Hamilton, H.L. and J.P. Dillard, *Natural transformation of Neisseria gonorrhoeae: from DNA donation to homologous recombination*. Molecular Microbiology, 2006. **59**(2): p. 376-385.
26. Seubert, A., et al., *A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis*. Molecular Microbiology, 2003. **49**(5): p. 1253-1266.
27. Alvarez-Martinez, C.E. and P.J. Christie, *Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009. **73**(4): p. 775-808.

28. Cabezon, E., J.I. Sastre, and F. de la Cruz, *Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation*. Mol Gen Genet, 1997. **254**(4): p. 400-6.
29. Atmakuri, K., E. Cascales, and P.J. Christie, *Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion*. Molecular Microbiology, 2004. **54**(5): p. 1199-1211.
30. Christie, P.J., *Type IV secretion: the Agrobacterium VirB/D4 and related conjugation systems*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1694**(1-3): p. 219-34.
31. Backert, S., R. Fronzes, and G. Waksman, *VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems?* Trends in Microbiology, 2008. **16**(9): p. 409-413.
32. Lai, E.M. and C.I. Kado, *Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 1998. **180**(10): p. 2711-7.
33. Eisenbrandt, R., et al., *Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22548-55.
34. Lai, E.M., et al., *Biogenesis of T pili in Agrobacterium tumefaciens requires precise VirB2 propilin cleavage and cyclization*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(1): p. 327-330.
35. Schmidt-Eisenlohr, H., et al., *Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 1999. **181**(24): p. 7485-92.
36. Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke, and C. Baron, *TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1999. **181**(18): p. 5563-71.
37. Yeo, H.J., et al., *Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(26): p. 15947-15952.
38. Aly, K.A. and C. Baron, *The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in Agrobacterium tumefaciens*. Microbiology-Sgm, 2007. **153**: p. 3766-3775.
39. Fronzes, R., et al., *Structure of a Type IV Secretion System Core Complex*. Science, 2009. **323**(5911): p. 266-268.
40. Chandran, V., et al., *Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system*. Nature, 2009. **462**(7276): p. 1011-U66.
41. Baron, C., *From bioremediation to biowarfare: on the impact and mechanism of type IV secretion systems*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **253**(2): p. 163-70.

42. Villamil Giraldo, A.M., et al., *Type IV secretion system core component VirB8 from Brucella binds to the globular domain of VirB5 and to a periplasmic domain of VirB6*. Biochemistry. **51**(18): p. 3881-90.
43. Paschos, A., et al., *Dimerization and interactions of Brucella suis VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7252-7.
44. Zahrl, D., et al., *Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 11): p. 3455-67.
45. Mossey, P., A. Hudacek, and A. Das, *Agrobacterium tumefaciens Type IV Secretion Protein VirB3 Is an Inner Membrane Protein and Requires VirB4, VirB7, and VirB8 for Stabilization*. Journal of Bacteriology, 2010. **192**(11): p. 2830-2838.
46. Tato, I., et al., *TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(23): p. 8156-8161.
47. Kerr, J.E. and P.J. Christie, *Evidence for VirB4-mediated dislocation of membrane-integrated VirB2 pilin during biogenesis of the Agrobacterium VirB/VirD4 type IV secretion system*. J Bacteriol. **192**(19): p. 4923-34.
48. Arechaga, I., et al., *ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(15): p. 5472-5479.
49. Ripoll-Rozada, J., et al., *Regulation of the type IV secretion ATPase TrwD by magnesium: implications for catalytic mechanism of the secretion ATPase superfamily*. J Biol Chem. **287**(21): p. 17408-14.
50. Middleton, R., et al., *Predicted hexameric structure of the Agrobacterium VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(5): p. 1685-1690.
51. Pena, A., et al., *Autoinhibitory Regulation of TrwK, an Essential VirB4 ATPase in Type IV Secretion Systems*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(19): p. 17376-17382.
52. de Paz, H.D., et al., *Functional Dissection of the Conjugative Coupling Protein TrwB*. Journal of Bacteriology, 2010. **192**(11): p. 2655-2669.

53. Draper, O., et al., *Topology of the VirB4 C terminus in the Agrobacterium tumefaciens VirB/D4 type IV secretion system*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(49): p. 37628-37635.
54. Li, F., et al., *Enterococcus faecalis PrgJ, a VirB4-Like ATPase, Mediates pCF10 Conjugative Transfer through Substrate Binding*. J Bacteriol. **194**(15): p. 4041-51.
55. Llosa, M., S. Zunzunegui, and F. de la Cruz, *Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(18): p. 10465-10470.
56. Cascales, E. and P.J. Christie, *Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1170-1173.
57. Machon, C., et al., *TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by plasmid R388, induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles*. J Bacteriol, 2002. **184**(6): p. 1661-8.
58. Hare, S., et al., *A large domain swap in the VirB11 ATPase of Brucella suis leaves the hexameric assembly intact*. Journal of Molecular Biology, 2006. **360**(1): p. 56-66.
59. Savvides, S.N., et al., *VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion*. Embo Journal, 2003. **22**(9): p. 1969-1980.
60. Herdendorf, T.J., D.R. McCaslin, and K.T. Forest, *Aquifex aeolicus PilT, homologue of a surface motility protein, is a thermostable oligomeric NTPase*. J Bacteriol, 2002. **184**(23): p. 6465-71.
61. Doyle, S.M. and S. Wickner, *Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines*. Trends in Biochemical Sciences, 2009. **34**(1): p. 40-48.
62. Krause, S., et al., *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*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(10): p. 2761-2770.
63. Rivas, S., et al., *TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(41): p. 25583-25590.
64. Rangrez, A.Y., et al., *Biochemical characterization of three putative ATPases from a new type IV secretion system of Aeromonas veronii plasmid pAC3249A*. BMC Biochemistry, 2010. **11**.

65. Sagulenko, E., et al., *Role of Agrobacterium VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection*. J Bacteriol, 2001. **183**(20): p. 5813-25.
66. Matilla, I., et al., *The Conjugative DNA Translocase TrwB Is a Structure-specific DNA-binding Protein*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(23): p. 17537-17544.
67. Llosa, M., G. Grandoso, and F. de la Cruz, *Nicking activity of TrwC directed against the origin of transfer of the IncW plasmid R388*. J Mol Biol, 1995. **246**(1): p. 54-62.
68. Bolland, S., et al., *General organization of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids*. J Bacteriol, 1990. **172**(10): p. 5795-802.
69. Moncalian, G., et al., *Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(51): p. 36117-36124.
70. Draper, O., et al., *Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(45): p. 16385-90.
71. Gomis-Ruth, F.X., et al., *The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase*. Nature, 2001. **409**(6820): p. 637-41.
72. Massey, T.H., et al., *Double-stranded DNA translocation: Structure and mechanism of hexameric FtsK*. Molecular Cell, 2006. **23**(4): p. 457-469.
73. Bath, J., et al., *Role of Bacillus subtilis SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum*. Science, 2000. **290**(5493): p. 995-997.
74. Singleton, M.R., et al., *Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides*. Cell, 2000. **101**(6): p. 589-600.
75. Rafferty, J.B., et al., *Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction*. Science, 1996. **274**(5286): p. 415-421.
76. Hormaeche, I., et al., *Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46456-62.
77. Cabezon, E., V.F. Lanza, and I. Arechaga, *Membrane-associated nanomotors for macromolecular transport*. Curr Opin Biotechnol. **23**(4): p. 537-44.
78. Iyer, L.M., et al., *Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases: implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(17): p. 5260-79.
79. Bigot, S., et al., *KOPS: DNA motifs that control E. coli chromosome segregation by orienting the FtsK translocase*. Embo J, 2005. **24**(21): p. 3770-80.

80. Gomis-Ruth, F.X. and M. Coll, *Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(6): p. 744-52.
81. Norman, A., et al., *Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from Escherichia coli which enables biofilm formation and multidrug efflux*. Plasmid, 2008. **60**(1): p. 59-74.
82. Rabel, C., et al., *The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: Common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(3): p. 1045-1058.
83. Fernandez-Lopez, R., et al., *Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(6): p. 942-66.
84. Dang, T.A.T. and P.J. Christie, *The VirB4 ATPase of Agrobacterium tumefaciens is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface*. Journal of Bacteriology, 1997. **179**(2): p. 453-462.
85. Batchelor, R.A., et al., *Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different Campylobacter species*. Microbiology-Sgm, 2004. **150**: p. 3507-3517.
86. Durand, E., C. Oomen, and G. Waksman, *Biochemical Dissection of the ATPase TraB, the VirB4 Homologue of the Escherichia coli pKM101 Conjugation Machinery*. Journal of Bacteriology, 2010. **192**(9): p. 2315-2323.
87. Durand, E., G. Waksman, and V. Receveur-Brechot, *Structural insights into the membrane-extracted dimeric form of the ATPase TraB from the Escherichia coli pKM101 conjugation system*. BMC Structural Biology, 2011. **11**.
88. Hormaeche, I., et al., *Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(48): p. 46456-46462.
89. Yuan, Q., et al., *Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(28): p. 26349-26359.
90. Ward, D.V., et al., *Peptide linkage mapping of the Agrobacterium tumefaciens vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11493-500.
91. Shirasu, K., et al., *An Inner-Membrane-Associated Virulence Protein Essential for T-DNA Transfer from Agrobacterium-Tumefaciens to Plants Exhibits ATPase Activity and*

- Similarities to Conjugative Transfer Genes*. Molecular Microbiology, 1994. **11**(3): p. 581-588.
92. Guzman, L.M., et al., *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4121-30.
 93. Jin, Y.M., et al., *[Cloning and expression of 21.7 kD protein gene of Schistosoma japonicum (Chinese strain)]*. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2002. **18**(6): p. 698-702.
 94. Datta, N. and R.W. Hedges, *R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group*. Ann Inst Pasteur (Paris), 1972. **123**(6): p. 849-52.
 95. Kolter, R. and D.R. Helinski, *Construction of plasmid R6K derivatives in vitro: characterization of the R6K replication region*. Plasmid, 1978. **1**(4): p. 571-80.
 96. Miroux, B. and J.E. Walker, *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, 1996. **260**(3): p. 289-98.
 97. Grant, S.G., et al., *Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4645-9.
 98. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
 99. Sandler, S.J. and A.J. Clark, *Factors affecting expression of the recF gene of Escherichia coli K-12*. Gene, 1990. **86**(1): p. 35-43.
 100. Lee, E., et al., *Chromosomal integration and expression of the Escherichia coli K88 gene cluster in Salmonella enterica ser. Choleraesuis strain 54 (SC54)*. Vet Microbiol, 2001. **83**(2): p. 177-83.
 101. de la Cruz, F. and J. Grinsted, *Genetic and molecular characterization of Tn21, a multiple resistance transposon from R100.1*. J Bacteriol, 1982. **151**(1): p. 222-28.
 102. Osborn, M.J., et al., *Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane*. J Biol Chem, 1972. **247**(12): p. 3962-72.
 103. Kreuzer, K.N. and C.V. Jongeneel, *Escherichia coli phage T4 topoisomerase*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 144-60.
 104. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. Anal Chem, 1996. **68**(5): p. 850-8.

105. Marabini, R., et al., *Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy*. J Struct Biol, 1996. **116**(1): p. 237-40.
106. Scheres, S.H., et al., *Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images*. J Mol Biol, 2005. **348**(1): p. 139-49.
107. Crowther, R.A. and L.A. Amos, *Harmonic analysis of electron microscope images with rotational symmetry*. J Mol Biol, 1971. **60**(1): p. 123-30.
108. Kohonen, T., *Cortical maps*. Nature, 1990. **346**(6279): p. 24.
109. Marabini, R. and J.M. Carazo, *Pattern recognition and classification of images of biological macromolecules using artificial neural networks*. Biophys J, 1994. **66**(6): p. 1804-14.
110. Ludtke, S.J., P.R. Baldwin, and W. Chiu, *EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions*. J Struct Biol, 1999. **128**(1): p. 82-97.
111. Scheres, S.H., et al., *Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 977-90.
112. van Heel, M., et al., *Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution*. Q Rev Biophys, 2000. **33**(4): p. 307-69.
113. Buchan, D.W., et al., *Protein annotation and modelling servers at University College London*. Nucleic Acids Res. **38**(Web Server issue): p. W563-8.
114. Kelley, L.A. and M.J. Sternberg, *Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server*. Nat Protoc, 2009. **4**(3): p. 363-71.
115. Eswar, N., et al., *Protein structure modeling with MODELLER*. Methods Mol Biol, 2008. **426**: p. 145-59.
116. DeLano, W.L., *Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(1): p. 14-20.
117. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
118. Dang, T.A. and P.J. Christie, *The VirB4 ATPase of Agrobacterium tumefaciens is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface*. J Bacteriol, 1997. **179**(2): p. 453-62.
119. Notredame, C., D.G. Higgins, and J. Heringa, *T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment*. J Mol Biol, 2000. **302**(1): p. 205-17.
120. Waterhouse, A.M., et al., *Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*. Bioinformatics, 2009. **25**(9): p. 1189-91.

121. Vogelmann, J., et al., *Conjugal plasmid transfer in Streptomyces resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE*. Embo J. **30**(11): p. 2246-54.
122. Price, M.N., P.S. Dehal, and A.P. Arkin, *FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix*. Mol Biol Evol, 2009. **26**(7): p. 1641-50.
123. Han, M.V. and C.M. Zmasek, *phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 356.
124. Wallden, K., et al., *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**(28): p. 11348-53.
125. Williamson, J.R., *G-quartet structures in telomeric DNA*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1994. **23**: p. 703-30.
126. Dang, T.A., et al., *Dimerization of the Agrobacterium tumefaciens VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter*. Mol Microbiol, 1999. **32**(6): p. 1239-53.
127. Lessl, M., et al., *Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer*. J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 20471-80.
128. Record, M.T., Jr., et al., *Biophysical compensation mechanisms buffering E. coli protein-nucleic acid interactions against changing environments*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(5): p. 190-4.
129. Levitzki, A. and D.E. Koshland, Jr., *The role of negative cooperativity and half-of-the-sites reactivity in enzyme regulation*. Curr Top Cell Regul, 1976. **10**: p. 1-40.
130. Abieliovich, H., *An empirical extremum principle for the hill coefficient in ligand-protein interactions showing negative cooperativity*. Biophys J, 2005. **89**(1): p. 76-9.
131. Weiss, J.N., *The Hill equation revisited: uses and misuses*. Faseb J, 1997. **11**(11): p. 835-41.
132. Seiler, S., et al., *Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 333-8.
133. Hackney, D.D. and M.F. Stock, *Kinesin's IAK tail domain inhibits initial microtubule-stimulated ADP release*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(5): p. 257-60.
134. Weikl, T., et al., *C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle*. J Mol Biol, 2000. **303**(4): p. 583-92.
135. Owen, B.A., et al., *Regulation of heat shock protein 90 ATPase activity by sequences in the carboxyl terminus*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7086-91.

136. Sanchez, V.E. and G.M. Carlson, *Isolation of an autoinhibitory region from the regulatory beta-subunit of phosphorylase kinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 17889-95.
137. Zu, Y.L., Y. Ai, and C.K. Huang, *Characterization of an autoinhibitory domain in human mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*. J Biol Chem, 1995. **270**(1): p. 202-6.
138. Smith, M.K., et al., *Functional determinants in the autoinhibitory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Role of His282 and multiple basic residues*. J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1761-8.
139. Reddy, L.G., et al., *An autoinhibitory peptide from the erythrocyte Ca-ATPase aggregates and inhibits both muscle Ca-ATPase isoforms*. Biophys J, 1999. **76**(6): p. 3058-65.
140. Curran, A.C., et al., *Autoinhibition of a calmodulin-dependent calcium pump involves a structure in the stalk that connects the transmembrane domain to the ATPase catalytic domain*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30301-8.
141. Enyedi, A. and J.T. Penniston, *Autoinhibitory domains of various Ca²⁺ transporters cross-react*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17120-5.
142. Malmstrom, S., H.E. Akerlund, and P. Askerlund, *Regulatory role of the N terminus of the vacuolar calcium-ATPase in cauliflower*. Plant Physiol, 2000. **122**(2): p. 517-26.
143. Palmgren, M.G., et al., *Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase*. J Biol Chem, 1991. **266**(30): p. 20470-5.
144. Eraso, P. and F. Portillo, *Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10393-9.
145. Ekberg, K., et al., *A Novel Mechanism of P-type ATPase Autoinhibition Involving Both Termini of the Protein*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(10): p. 7344-7350.
146. Baekgaard, L., A.T. Fuglsang, and M.G. Palmgren, *Regulation of plant plasma membrane H⁺- and Ca²⁺-ATPases by terminal domains*. J Bioenerg Biomembr, 2005. **37**(6): p. 369-74.
147. Yonekura, H., et al., *Mechanism of tail-mediated inhibition of kinesin activities studied using synthetic peptides*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(2): p. 420-7.
148. Walker, J.E., *The regulation of catalysis in ATP synthase*. Curr Opin Struct Biol, 1994. **4**(6): p. 912-8.

149. Cabezon, E., et al., *The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1*. Nature Structural Biology, 2003. **10**(9): p. 744-750.
150. Gledhill, J.R., et al., *How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15671-6.
151. Tsunoda, S.P., et al., *Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6560-4.
152. Cao, T.B. and M.H. Saier, Jr., *Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 12): p. 3201-14.
153. Nunez, B., P. Avila, and F. de la Cruz, *Genes involved in conjugative DNA processing of plasmid R6K*. Mol Microbiol, 1997. **24**(6): p. 1157-68.
154. Beijersbergen, A., S.J. Smith, and P.J. Hooykaas, *Localization and topology of VirB proteins of Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid, 1994. **32**(2): p. 212-8.
155. Grahm, A.M., et al., *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, 2000. **182**(6): p. 1564-74.
156. Hishida, T., et al., *Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9573-7.
157. Llosa, M., et al., *Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport*. Mol Microbiol, 2002. **45**(1): p. 1-8.
158. Yeo, H.J., et al., *Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system*. Molecular Cell, 2000. **6**(6): p. 1461-1472.
159. Planet, P.J., et al., *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, 2001. **98**(5): p. 2503-8.
160. Mueller-Cajar, O., et al., *Structure and function of the AAA+ protein CbbX, a red-type Rubisco activase*. Nature. **479**(7372): p. 194-9.
161. Yamagata, A. and J.A. Tainer, *Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism*. Embo J, 2007. **26**(3): p. 878-90.
162. Garcillan-Barcia, M.P. and F. de la Cruz, *Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids?* Plasmid, 2008. **60**(1): p. 1-18.

7. Bibliografía

163. Schleich, T. and P.H. von Hippel, *Ion-induced water-proton chemical shifts and the conformational stability of macromolecules*. Biochemistry, 1970. **9**(5): p. 1059-66.
164. Smillie, C., et al., *Mobility of Plasmids*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010. **74**(3): p. 434-+.
165. Garcillan-Barcia, M.P., M.V. Francia, and F. de la Cruz, *The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(3): p. 657-87.
166. Guglielmini, J., et al., *The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation*. PLoS Genet. **7**(8): p. e1002222.
167. Guglielmini, J., F. de la Cruz, and E.P. Rocha, *Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems*. Mol Biol Evol.

TrwK

R300

PUBLICACIONES

ATPase Activity and Oligomeric State of TrwK, the VirB4 Homologue of the Plasmid R388 Type IV Secretion System[†]

Ignacio Arechaga,^{1*} Alejandro Peña,¹ Sandra Zunzunegui,¹ María del Carmen Fernández-Alonso,² Germán Rivas,² and Fernando de la Cruz¹

Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria (UC) and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, IBBTEC (CSIC-UC-IDICAN), c/Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain,¹ and Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain²

Received 4 March 2008/Accepted 23 May 2008

Type IV secretion systems (T4SS) mediate the transfer of DNA and protein substrates to target cells. TrwK, encoded by the conjugative plasmid R388, is a member of the VirB4 family, comprising the largest and most conserved proteins of T4SS. VirB4 was suggested to be an ATPase involved in energizing pilus assembly and substrate transport. However, conflicting experimental evidence concerning VirB4 ATP hydrolase activity was reported. Here, we demonstrate that TrwK is able to hydrolyze ATP in vitro in the absence of its potential macromolecular substrates and other T4SS components. The kinetic parameters of its ATPase activity have been characterized. The TrwK oligomerization state was investigated by analytical ultracentrifugation and electron microscopy, and its effects on ATPase activity were analyzed. The results suggest that the hexameric form of TrwK is the catalytically active state, much like the structurally related protein TrwB, the conjugative coupling protein.

Gram-negative bacteria use type IV secretion systems (T4SS) to transport protein and DNA substrates to phylogenetically diverse eukaryotic and prokaryotic target cells, resulting in pathogenesis and conjugative DNA transfer, respectively (2, 8, 9). Conjugation is a significant medical concern because it is responsible for the widespread transmission of antibiotic resistance genes and virulence factors among pathogenic bacteria (16, 42). A subfamily of T4SS transports only effector proteins to eukaryotic target cells, resulting in bacteria pathogenesis that causes many human diseases, such as gastric ulcers, Legionnaires' disease, brucellosis, and whooping cough (10).

T4SS in conjugative systems are macromolecular assemblies composed of 11 mating pair subunits (VirB1 to VirB11) and a coupling protein (VirD4) that span inner and outer bacterial membranes (18). Three of these subunits, VirB11, VirB4, and VirD4, are putative ATPases that energize DNA and protein substrate transfer as well as pilus assembly. In the conjugative (IncW) plasmid R388, the coupling protein is called TrwB and was shown to be a DNA-dependent ATPase (41). VirB11 (TrwD in R388) was also reported to display ATPase activity (32). However, there is no concluding evidence concerning the potential ATPase activity of VirB4-like proteins.

VirB4 proteins are the largest and most evolutionarily conserved proteins in T4SS (14). An important feature of VirB4 proteins is the presence of Walker A and Walker B motifs (23, 30), found to be essential for virulence and plasmid transfer

(5). Interestingly, the VirB4 NTPase activity was reported to be dispensable for T4SS stabilization and pilus formation, suggesting that its role is to energize substrate translocation (45). However, there are conflicting experimental reports on the NTPase activity in VirB4 proteins (30, 38), and the unequivocal demonstration of such activity is needed.

Here, we demonstrate that TrwK, the VirB4 homologue in the conjugative plasmid R388, is able to hydrolyze ATP in vitro. The kinetic properties of this ATPase activity under the conditions tested (i.e., in the absence of macromolecular substrates and other T4SS subunits) were investigated. An analysis of the TrwK oligomeric state by analytical ultracentrifugation and electron microscopy has shown a dependency on salts, pH, and protein concentration. A fraction of the total protein present in the solution is in hexameric form, which is likely to be the catalytically active state, much like VirB11 (44) and VirD4 (17).

MATERIALS AND METHODS

Cloning of TrwK and mutants. The R388 *trwK* gene was amplified by PCR and cloned into a pET3a expression vector (Novagen, Madison, WI). The Walker B mutant (D654A) was produced in two PCR steps, using the PCR product of the first reaction (174 bp) containing the mutation (TCCAGAACTCGGCAAACA CGTACA) as a primer for a second PCR. The fragment was digested and ligated into the original vector containing the wild-type protein. The plasmids were transformed into *Escherichia coli* strain C41(DE3) (27).

In vivo complementation assays. Derivatives of *E. coli* K12 strain DH5 α carrying the plasmid pSU4133, a pR388 variant with a knockout mutation of the *trwK* gene (6), were transformed together with expression plasmid pET3a containing either the wild-type *trwK* gene or the *trwK*(D654A) mutant and mated with UB1637 as described by Moncalian et al. (28). Transconjugants were selected on trimethoprim and streptomycin plates.

Protein purification. Protein expression was induced by the addition of 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). After 6 h of induction, cells were harvested and suspended in a buffer consisting of 20 mM spermidine, 200 mM NaCl, and 1 mM EDTA and stored at -20°C . Thawed cells were lysed as described by Tato et al. (41). Lysates were collected by centrifugation, diluted four times in buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA,

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain. Phone: 34 942 202033. Fax: 34 942 201945. E-mail: arechagai@unican.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 6 June 2008.

0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and applied to a HiTrap SP-Sepharose (5-ml) column (Amersham, GE). TrwK-containing fractions were collected in the flowthrough and applied to a HiTrap Q-Sepharose (5-ml) column. TrwK was eluted from this column in a linear gradient of NaCl at a 250 mM salt concentration. The enriched fractions were pooled and diluted to a final concentration of 50 mM NaCl and applied to a second HiTrap Q-Sepharose (5-ml) column. TrwK-containing fractions were pooled, concentrated, and loaded onto a Superdex200 GL10_30 column. After isocratic elution in a buffer consisting of 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 150 mM NaCl, 10% (wt/vol) glycerol, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, the fractions with the richest content in TrwK were pooled and stored at -20°C. For the ATP hydrolysis assays, NaCl and MgCl₂ were replaced with potassium acetate and magnesium acetate, respectively. The TrwK(D654A) mutant was purified exactly as the wild-type protein.

Mass spectrometry analysis. Selected protein bands were excised manually from the gel and subjected to in-gel digestion with trypsin (Roche, Basel, Switzerland) according to the method of Shevchenko et al. (37) with minor modifications. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) spectra were acquired using a Q-ToF Micro mass spectrometer (Waters, Milford, MA) interfaced with a CapLC capillary chromatography system (Waters). Aliquots (8 μ l) were loaded onto a Symmetry 300 C18 NanoEase Trap precolumn (Waters) connected to an XBridge BEH130 C18 column (Waters) equilibrated in 5% acetonitrile, 0.1% formic acid. Peptides were eluted with a linear gradient of 10 to 60% acetonitrile directly onto a NanoEase emitter (Waters). Obtained spectra were processed using the ProteinLynx global server (Waters) and searched against NCBI databases using the MASCOT search engine (Matrix-science).

ATP hydrolysis assays. TrwK ATPase activity was measured by a coupled-enzyme assay (21). To analyze ATP concentration dependency, TrwK (1.85 μ M) was incubated with 150 μ l of ATP assay buffer, consisting of 50 mM PIPES [piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)]-NaOH (pH 6.45), 75 mM potassium acetate, 5% (wt/vol) glycerol, 10 mM magnesium acetate, 1 mM potassium chloride, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phosphoenolpyruvate, 0.25 mM NADH, 60 μ g/ml pyruvate kinase, 60 μ g/ml lactate dehydrogenase, and 0.1 to 10 mM ATP. The reactions were started by the addition of TrwK. Activity was measured by the decrease in NADH absorbance at 340 nm for 15 min at 37°C in a UV-1603 spectrophotometer (Shimadzu). The same procedure was repeated at pH 5.0 to pH 9.5 using as buffers sodium citrate (pH 5.0), MES (morpholineethanesulfonic acid)-NaOH (pH 5.5 to 5.9), PIPES-NaOH (pH 6.1 to 6.5), HEPES-NaOH (pH 6.8 to 7.25), Tris-HCl (pH 7.5 to 8.5), and sodium borate-NaOH (pH 9 to 9.5).

Analytical ultracentrifugation. Analysis of the TrwK protein was performed at two protein concentrations (0.4 mg/ml and 0.2 mg/ml) in either HEPES (50 mM HEPES [pH 7.25], 300 mM KAc, 5 mM MgAc, 1 mM Tris[2-carboxyethyl]phosphine [TCEP], 0.1 mM EDTA) or PIPES buffer (50 mM PIPES [pH 6.45], 75 mM KAc, 5 mM MgAc, 1 mM TCEP, 0.1 mM EDTA). Sedimentation velocity runs were carried out at 40,000 rpm and 20°C in an XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman-Coulter, Inc.) with UV-visible and interference optics detection systems, using an An50 rotor and 12-mm double-sector centerpieces. Sedimentation profiles were registered every 5 min at the appropriated wavelength (280 nm). The sedimentation coefficient distributions were calculated by least-squares boundary modeling of sedimentation velocity data using the sedimentation coefficient distribution method (36), as implemented in the SEDFIT program. Apparent molar masses associated with each peak were estimated based on the best-fit frictional ratio ($f/f_0 = 1.42$).

Electron microscopy and image analysis. Aliquots of TrwK (5 μ l, 0.1 mg/ml) were applied onto freshly glow-discharged carbon-coated grids. Samples were negatively stained with 2% (wt/vol) uranyl acetate. Electron micrographs were recorded at $\times 50,000$ nominal magnification on Kodak SO-163 film using a JEOL 1200EX-II electron microscope operated at 100 kV. The micrographs were digitized in a Zeiss SCAI scanner with a final sampling rate of 2.33 $\text{\AA}/\text{pixel}$. A total of 4,907 TrwK particles were selected and normalized using XMIPP image processing software (39). The alignment and classification were performed by maximum likelihood multireference refinement methods (34). The final classes consisted of averages of 200 to 300 particles.

RESULTS

TrwK displays an ATPase activity in vitro. The TrwK protein was purified to homogeneity (Fig. 1). Sample purity was confirmed by MS/MS. Each of the two bands in Fig. 1, lane e, was extracted from the gel and subjected to MS analysis as

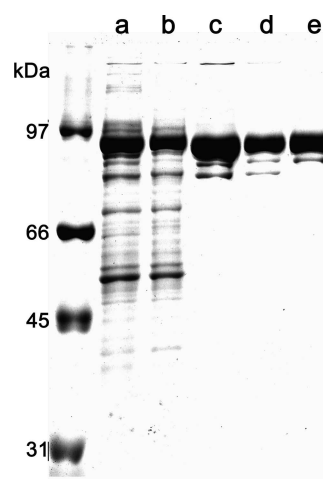


FIG. 1. Purification of TrwK. Aliquots of pooled fractions corresponding to the different stages of the purification were resolved in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (10%) and stained with Coomassie blue. Lane a, cell lysates; lane b, SP-Sepharose flowthrough; lane c, Q-Sepharose elution; lane d, second Q-Sepharose elution; lane e, isocratic Superdex-200 elution. Both bands in lane e were excised manually from the gel and subjected to in-gel digestion with trypsin and analyzed by LC-MS/MS. Peptide fragment fingerprinting identified the larger band as TrwK and the smaller band as a TrwK N-terminal deletion (see the supplemental material).

described in Materials and Methods. The upper, more intense band with an apparent molecular weight (MW_{app}) of 94 was identified as TrwK (see Fig. S1 in the supplemental material). The band with an MW_{app} of 80 below the TrwK band was unambiguously identified by peptide fragment fingerprinting as a TrwK deletion product. Comparison of the sequence coverage of both bands revealed that the band with an MW_{app} of 80 was missing four peptides corresponding to the TrwK N terminus, suggesting an N-terminal deleted protein with a cleavage site in the region close to Arg¹⁷³ (see Fig. S1 in the supplemental material). ATPase activity was analyzed by the coupled-enzyme method (Fig. 2A). We initially tested reaction conditions similar to those used to assay the ATPase activity of protein TrwB (40, 41), a structural homologue of VirB4 (26). However, because of the low velocity rates obtained in the presence of MgCl₂ and NaCl (Fig. 2A, trace b), chloride salts were replaced by the corresponding acetate salts, magnesium acetate and potassium acetate (KAc), respectively. In the presence of these salts, the rate of ATP hydrolysis increased to values of 45 nmol ATP hydrolyzed $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Fig. 2A, trace c). ATP hydrolysis rates decreased with increasing concentrations of salt (Fig. 2B), being reduced to 50% at 300 mM KAc and to 5% at 600 mM KAc. In the presence of 75 mM NaCl, ATP hydrolysis rates were 85% lower than those at the same concentration of KAc and negligible at a high NaCl concentration. These findings suggest an inhibitory effect of chloride salts on TrwK ATP hydrolysis. TrwK ATPase activity was at its maximum at a pH of 6.5 and inhibited at a pH of <6 or >7.5 (Fig. 2C).

In vivo and in vitro analysis of a Walker B mutation in TrwK. In order to discriminate the observed ATPase activity from possible contaminants that could be present in the puri-

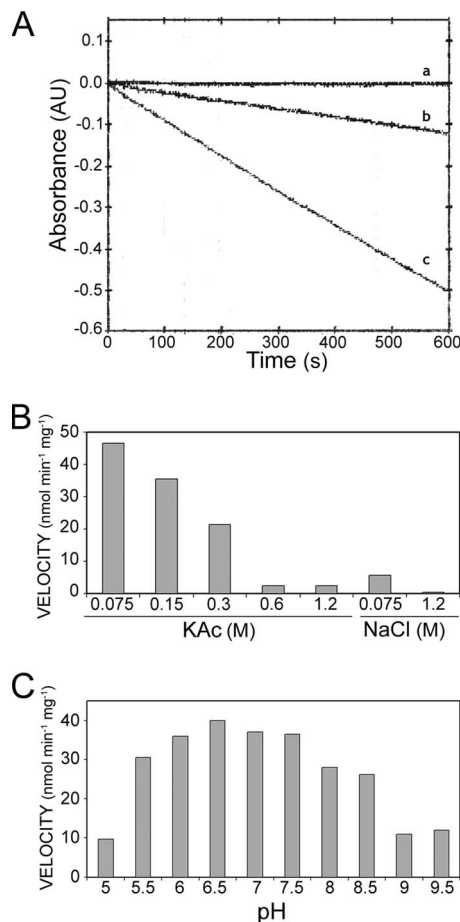


FIG. 2. TrwK ATPase activity. TrwK ATPase activity was monitored by the decrease of NADH absorbance at 340 nm (A) in the presence of 75 mM NaCl (trace b) or 75 mM KAc (trace c). The control is shown in trace a. The effects of salt concentrations (B) and pH (C) are represented.

fied protein sample, an essential aspartic residue in the TrwK Walker B motif was mutated. This mutant [TrwK(D654A)] was subjected to the same purification protocol, and the mutant enzyme behaved exactly as the wild-type enzyme. The ATPase activity of the TrwK(D654A) mutant protein, measured under the same conditions as that of the wild-type TrwK, was undetectable (<1 nmol ATP hydrolyzed min⁻¹ mg⁻¹). These results were corroborated by in vivo complementation assays of cells carrying the plasmid pSU4133 containing the knockout mutation of the *trwK* gene (6). As shown in Table 1, while wild-type *trwK* complemented the *trwK* knockout mutation at a frequency similar to the wild-type situation, the plasmid containing the *trwK*(D654) mutation was unable to complement the mutation at all (at least a 4-log decrease). This result indicates that the TrwK mutant protein is inactive in conjugation because it lost its ATPase activity.

Kinetic analysis of TrwK ATPase activity. TrwK kinetic parameters for ATP hydrolysis were determined by analyzing the effect of ATP concentration on ATPase activity rates (Fig. 3). Fitting the data to either a Michaelis-Menten (Fig. 3A, dashed line) or a Hill (Fig. 3A, solid line) equation resulted in a better fit for the latter. An empirical Hill equation with an apparent

TABLE 1. Conjugation frequencies of R388 and *trwK* mutants in the presence of complementing proteins

Plasmids in donor ^a	Variant of TrwK in donor	Conjugation frequencies ^b
R388	TrwK	4×10^{-1}
pSU4133	R388::Δ <i>trwK</i>	1×10^{-6}
pSU4133 + pET3a	None	4×10^{-7}
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK</i>	TrwK	2×10^{-2}
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK</i> _D654A	TrwK(D654A)	7×10^{-6}

^a Donor cells (*E. coli* K12 strain DH5α) carrying the plasmids shown in the first column were mated with strain UB1637.

^b Transfer frequencies of transconjugants selected on streptomycin and trimethoprim plates.

negative cooperativity (Hill, $n = 0.5$) accounts for the dependence of the ATP hydrolysis rate on ATP concentration. A rough estimate of V_{max} , calculated by plotting the double reciprocal of $1/v$ versus $1/[ATP]^{0.5}$, was 48.4 nmol min⁻¹ mg⁻¹, and the $K_{0.5}$ was 0.82 mM ($K_{m\ app} = 0.7$ mM). Then, assuming that the reaction rate is proportional to the fractional saturation of the enzyme, the Hill plot ($\log[v/(V_{max} - v)]$ versus $\log[ATP]$) was drawn and Hill coefficients (n_H) of 0.5 and 0.75 were calculated for low (<1 mM) and high (>1 mM) ATP

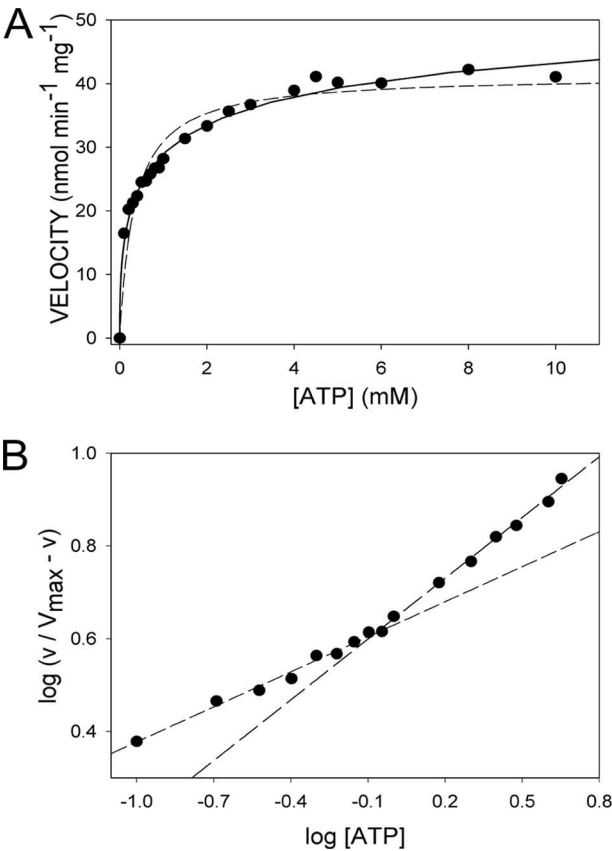


FIG. 3. Kinetic analysis of TrwK ATP hydrolysis. (A) ATP hydrolysis rates represented as a function of ATP concentration fit better with a Hill equation (solid line) than with a Michaelis-Menten equation (dashed line). (B) Hill plot for ATP hydrolysis by TrwK. The slope of the line for the low ATP concentrations (<1 mM) and medium ATP concentrations (>1 mM) were estimated as apparent Hill coefficients of 0.5 and 0.75, respectively.

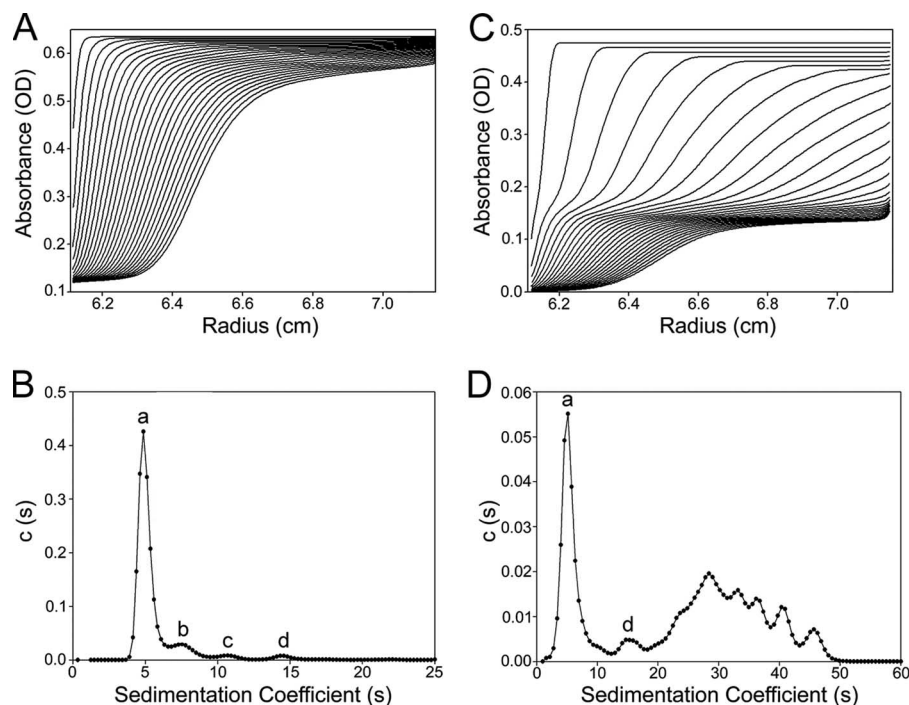


FIG. 4. Sedimentation velocity analysis of TrwK. The sedimentation velocity profiles and distribution of sedimentation coefficients were obtained from experiments conducted either in HEPES buffer at pH 7.25 (A, B) or PIPES buffer at pH 6.45 (C, D). The labeled peaks in panels B and D correspond to monomers (a), dimers (b), trimers (c), and hexamers (d). OD, optical density [c(s)].

concentrations, respectively (Fig. 3B). This could be an indication of negative cooperativity for ATP hydrolysis if all the binding sites were identical and the quaternary structure was unique.

Effect of salts and pH on the ATPase activity and oligomeric state of TrwK. The oligomeric state of TrwK and its relationship with its ATPase activity was investigated. The state of association and degree of homogeneity of TrwK was determined by sedimentation velocity. In HEPES buffer (pH 7.25), the most predominant TrwK species (84.1% of the loading concentration) sedimented with an s value of 5.1 S and an estimated molar mass of $\sim 89,000$, which is compatible with the monomer mass (Fig. 4A and B). The remaining species observed had s values of 8 S (9.6% of the total protein), 11 S ($\sim 3\%$), and ~ 15 S ($\sim 3\%$), with estimated masses of $\sim 176,000$, $\sim 282,000$, and $\sim 452,000$, that could be identified as dimers, trimers, and hexamers of TrwK, respectively. Interestingly, a sedimentation velocity analysis of TrwK in PIPES buffer (pH 6.45) under conditions similar to those used in the ATPase assays (Fig. 4C and D) revealed the formation of large-size oligomers. Under these conditions only, $\sim 32\%$ of the protein remained as monomers and $\sim 5\%$ as hexamers, which could explain the relatively low ATP hydrolysis rates. On the other hand, this polydispersity could also explain the apparent negative cooperativity observed in the kinetic analysis of TrwK ATPase activity.

A size exclusion analysis of TrwK by chromatography in a Superdex200 column (Fig. 5A) showed the existence of a peak of MW_{app} of ~ 500 , which fits the expected mass of a TrwK hexamer. Aliquots of TrwK corresponding to this fraction were analyzed by electron microscopy. As shown in Fig. 5B, TrwK

does in fact form oligomers of round shape and similar size. Image analysis and classification of 4,907 images in class averages of 200 to 300 particles (Fig. 5C) allowed the visualization of ring-shaped structures with dimensions of ~ 113 Å in diameter consistent with a hexameric ring similar to that formed by TrwB (17, 19).

TrwK does not behave as an integral membrane protein. Since VirB4 proteins have been proposed to be integral inner membrane proteins (11), we decided to study the effect of phospholipids on TrwK ATPase activity under conditions similar to those described for TrwD (VirB11), another hexameric ATPase in T4SS (32). TrwK ($1.8 \mu\text{M}$) was incubated with phosphatidylcholine–cardiolipin–Triton X-100 (1:1:3) ternary mixtures ($50 \mu\text{M}$), and its ATPase activity was measured by the coupled-enzyme assay. No effect was observed on the rate of ATPase hydrolysis after the addition of lipids or detergents (0.01 to 2 mM Triton X-100) (data not shown). These results and, moreover, the fact that no detergent was needed to maintain TrwK in solution suggest that TrwK might not be an integral membrane protein.

To further investigate the membrane association of VirB4 proteins, the amino acid sequences of various members of the VirB4 family were analyzed by several programs that predict transmembrane segments (Sosui, HMMTOP, DAS, TMHMM, and TopPred). Proteins corresponding to widely spread branches of the phylogenetic tree of the VirB4 family (14) were chosen for this analysis. As shown in Table 2, with the exception of IncX members and TrbE of the IncP plasmid RP4, all the analyzed sequences were negative for predicted transmembrane regions. These findings underscore the fact that TrwK behaves as a soluble protein in solution, suggesting that most

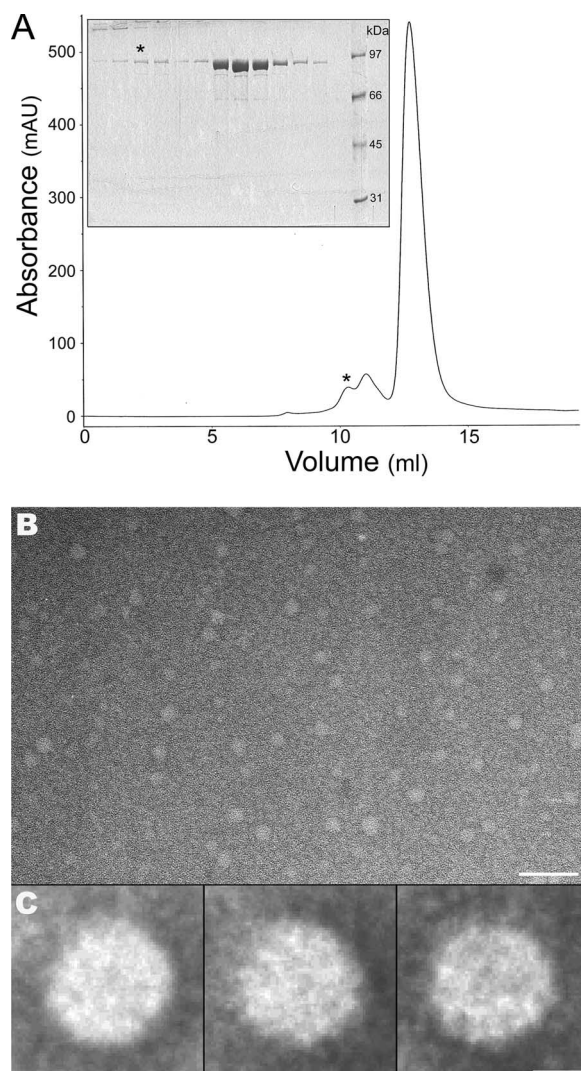


FIG. 5. Electron microscopy of TrwK oligomers. Protein eluted from a size exclusion chromatography column (GL 10/30 Superdex200) at an MW_{app} of ~ 500 (indicated by the asterisk in panel A; insert, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of fractions from the chromatogram) were stained with uranyl acetate and analyzed by electron microscopy (B; scale bar, 50 nm). Particles (4,907) were selected, aligned, and classified by maximum likelihood multireference alignment methods. Three of the class averages (200 to 300 particles) are represented in panel C (scale bar, 5 nm).

TrwK-like proteins might not be integral membrane proteins, as previously reported.

DISCUSSION

This study demonstrates that TrwK, the VirB4 homologue of the conjugative plasmid R388, displays an ATP hydrolytic activity in the absence of other T4SS subunits or additional cofactors. The similarity among members of the VirB4 protein family is striking (14), with four conserved motifs (including the Walker A and B motifs) and one conserved domain (23, 30). However, previous reports on the biochemical analysis of RP4 TrbEHN Δ 2 and R388 TrwK concluded that these pro-

teins were not able to hydrolyze ATP or GTP (30), which is in contrast to the very weak ATPase activity reported for *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 VirB4 (38). Here, we present strong evidence that demonstrates that TrwK is able to hydrolyze ATP. TrwK ATPase activity cannot be due to a contaminant present in the purified protein preparation, since a protein containing a D654A mutation in the Walker B motif, purified in exactly the same way, was void of in vitro ATPase activity (as well as in vivo complementing activity). A previous report showed that the equivalent residue to D654 in TrbE of RP4 (D694) is essential for in vivo function (30). Interestingly, the choice of magnesium and potassium acetate proved to be essential for the determination of ATPase activity. It is worth noting that in the *E. coli* cytoplasm, potassium is at high concentrations, whereas sodium amounts are negligible (31). On the other hand, chloride anions can significantly perturb biopolymer processes in *E. coli* (35), hence, the convenience of replacing them with other univalent anions, such as acetate.

Characterization of the ATPase activity of TrwK revealed that this activity did not fit with classical Michaelis-Menten kinetics but with a Hill equation. Analysis of the kinetic parameters of the reaction showed an n_H of less than one, which could imply negative cooperativity for ATP hydrolysis (15, 24, 25). However, a mixture of nonidentical binding sites will also yield n_H values of <1 . Therefore, negative cooperativity systems should not be identified using only the fact that n_H is <1 , unless evidence is obtained to prove that all the binding sites are identical (1, 43). To explore the relationship between the oligomeric state of TrwK and its ATPase activity, we analyzed the aggregation properties of the purified protein by analytical ultracentrifugation and electron microscopy. These analyses revealed the presence of a mixture of oligomeric species in the preparation, which could explain the kinetic properties determined for TrwK ATP hydrolysis, rather than negative cooperativity.

VirB4 proteins have been previously reported to form dimers or higher aggregates (12). A model, based on the structural similarities among the *Agrobacterium* VirB4 C terminus and TrwB, suggests that VirB4 assembles as a hexamer (26). Our experimental analysis indicates that purified TrwK is present mainly as a monomer in solution, which is in agreement with previously reported results (30). However, our sedimentation velocity analysis also revealed the presence of dimers, trimers, and hexamers. Interestingly, an analysis of the oligomeric state of TrwK under conditions similar to those of the ATPase enzymatic assays favored the formation of higher-order oligomers. These multimeric forms have also been observed in analyses by gel filtration and blue native polyacrylamide gel electrophoresis of *A. tumefaciens* VirB4 (45). It is thus likely that VirB4 proteins function as homohexameric complexes much like VirB11 (33, 44) and VirD4 (17).

VirB4 proteins have been reported to contain four trans-membrane domains (11). However, one of the most surprising findings in our studies was the observation that no detergent was needed in the purification of TrwK, neither in the analytical centrifugation analysis nor in the ATP hydrolysis assays. Since the presence of detergents is essential to prevent the aggregation of membrane proteins, we decided to further investigate the putative membrane nature of TrwK. Previous sequence analysis predictions for VirB4 have found from zero

TABLE 2. Membrane topology predictions for VirB4 proteins^a

Family or source	Protein	Organism	Predicted transmembrane region	Size (aa)
PilF/PilH	TrhC R27	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	No	887
	TraC F	<i>Escherichia coli</i>	No	875
	TraC R100	<i>E. coli</i>	No	876
TrbE family	TrbE RP4 (IncP)	<i>E. coli</i>	Yes (2)	852
	TrbE pTi	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	No	822
	LvhB4	<i>Legionella pneumophila</i>	No	826
	VirB4	<i>Caulobacter crescentus</i>	No	794
Tol plasmids, <i>Xanthomonas</i>	MpfC	<i>Pseudomonas putida</i>	No	894
	VirB4 pXcB	<i>Xanthomonas citri</i>	No	877
	VirB4	<i>Wolbachia endosymbiont</i>	No	801
	VirB4	<i>Rickettsia felis</i>	No	810
<i>Agrobacterium</i> VirB4	VirB4	<i>A. tumefaciens</i>	No	789
	VirB4 p42D	<i>Rhizobium etli</i>	No	795
	VirB4 pSYMA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	No	792
	VirB4	<i>Bartonella henselae</i>	No	784
PilW/PilN	TraB pKM101	<i>E. coli</i>	No	866
	TrwK R388	<i>E. coli</i>	No	823
	TrwK	<i>Bartonella quintana</i>	No	823
PilX, <i>Helicobacter</i>	CagE	<i>Helicobacter pylori</i>	Yes (2)	981
	VirB4 pCL46	<i>Campylobacter lari</i>	Yes (1)	924
	CmgB3/4	<i>Campylobacter jejuni</i>	Yes (1)	922
	TriC	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yes (2)	915
	VirB4 pCRY	<i>Yersinia pestis</i>	Yes (1)	894
	PilX3/4 R6K	<i>E. coli</i>	Yes (1)	919
<i>Brucella</i> and cryptic plasmids from soil	PtlC	<i>Bordetella pertussis</i>	No	824
	TraC pIPO2T		No	826
	VirB4	<i>Brucella suis</i>	No	831
	VirB4	<i>Xanthomonas campestris</i>	No	817
	VirB4	<i>Dichelobacter nodosus</i>	No	796
	VirB4 pXF51	<i>Xylella fastidiosa</i>	No	815
	TraE pF3028	<i>Haemophilus influenzae</i>	No	807

^a Amino acid sequences of representative members of widely separated branches of the VirB4 phylogenetic tree analyzed by transmembrane-predicting programs (Sosui, HMMTOP, DAS, TMHMM, and TopPred). DNA sequencing of the intergenic region between PilX3 and PilX4 has revealed that both proteins are fused together in plasmid R6K (unpublished data). Proteins listed below those of a given family but separated from them by a space are evolutionarily close to that family but not members of it.

(26) to four transmembrane domains (7). Our analyses indicate that with the exception of VirB4 homologues belonging to the IncX branch and TrbE of RP4 plasmid, all the VirB4 proteins were negative for transmembrane segment predictions. Interestingly, a recent sequence analysis in related T4SS identified genes in members of this branch of the VirB4 family coding a unique polypeptide composed of the VirB3 and VirB4 domains fused together (3), and so far, eight of such chimeric proteins have been found in the databases (9). On the other hand, it is worth noting the absence of VirB3-like protein

homologues among members of this subgroup of proteins. Furthermore, we resequenced the *pilX3* to *pilX4* region of the most representative member of the IncX branch, conjugative plasmid R6K, and found that the sequences of PilX3 and PilX4 correspond to a single polypeptide (see Fig. S2 in the supplemental material), in contrast to the reported R6K annotation (29).

VirB3 is an integral membrane protein originally suggested to be located at the periplasmic face of the outer membrane (20). However, recent analyses demonstrate that VirB3 is lo-

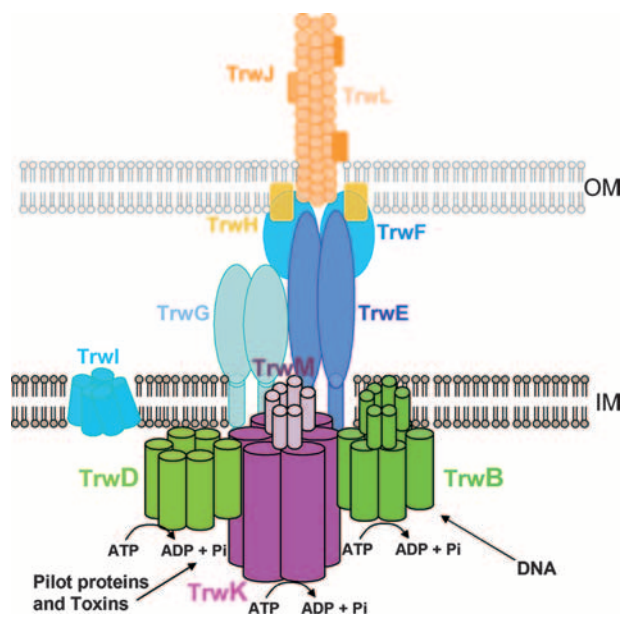


FIG. 6. A model showing the three hexameric ATPases in conjugative T4SS. T4SS in conjugative bacteria contain three hexameric ATPases on the cytoplasmic side of the inner membrane. According to our model, TrwK (VirB4) will be anchored to the membrane by interactions with TrwM (VirB3) and will be involved in energizing substrate transport. TrwK oligomerization will also promote pilus assembly and stabilization of the core components, TrwG and TrwE (VirB8 and VirB10, respectively). TrwD (VirB11) might interact directly with the membrane and/or with TrwK (VirB4) and will provide energy to unfold protein substrates so they can be transported through the membrane. TrwB (VirD4) will be directly attached to the membrane by its transmembrane region at its N-terminal domain and will provide the energy to pump DNA. OM, outer membrane; IM, inner membrane.

cated at the inner bacterial membrane (4, 18, 22). Therefore, it is possible that VirB4-like proteins lacking membrane-spanning segments will localize at the inner membrane by interactions with VirB3. In the present work, as TrwK was overproduced in large quantities, most of the recombinant protein was recovered in the soluble fraction. However, in physiological conditions, it is likely that TrwK will be anchored to the inner membrane by interactions with TrwM (VirB3).

According to our model (Fig. 6), TrwK (VirB4) will be localized at the cytosolic side of the inner membrane assembled as a functional complex with TrwM (VirB3). TrwK oligomerization will promote pilus assembly and stabilization of the core components, TrwG and TrwE (VirB8 and VirB10, respectively), in an ATPase-independent process (45). Once anchored to the membrane, VirB4 (TrwK) will interact with VirB11 (TrwD) (13, 45). TrwD (VirB11) is a hexameric ATPase that could be involved in the unfolding of the proteins or toxins to be transported (33, 44), whereas TrwK will energize substrate transport (45). In conjugative T4SS, the coupling protein TrwB (VirD4) will pump DNA in an ATP-dependent fashion (41).

In summary, this report is the first rigorous demonstration of an ATP hydrolase activity for a VirB4-like protein. This ATPase activity might be essential to energize substrate translocation. On the other hand, our work also provides important insights into the dynamics of TrwK oligomeriza-

tion, which could be essential in pilus assembly and T4SS stabilization. Finally, the fact that no detergent is needed to keep TrwK in solution suggests that it does not contain membrane-spanning segments and, therefore, under physiological conditions will be anchored to the membrane by interactions with other components of the T4SS.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to J. M. Arizmendi and K. Aloria for MS analysis performed in the proteomics facility at the University of the Basque Country and to R. Fernández-López and M. P. Garcillán-Barcía for their help with the amino acid sequence analysis.

This work was supported by grants BFU2005-03477/BMC (Spanish Ministry of Education) and LSHM-CT-2005_019023 (European VI Framework Program) to F.C.

REFERENCES

- Abeliovich, H. 2005. An empirical extremum principle for the hill coefficient in ligand-protein interactions showing negative cooperativity. *Biophys. J.* **89**:76–79.
- Baron, C., D. O'Callaghan, and E. Lanka. 2002. Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Mol. Microbiol.* **43**:1359–1365.
- Batchelor, R. A., B. M. Pearson, L. M. Friis, P. Guerry, and J. M. Wells. 2004. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology* **150**:3507–3517.
- Beijersbergen, A., S. J. Smith, and P. J. Hooykaas. 1994. Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **32**:212–218.
- Berger, B. R., and P. J. Christie. 1993. The *Agrobacterium tumefaciens* virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J. Bacteriol.* **175**:1723–1734.
- Bolland, S., M. Llosa, P. Avila, and F. de la Cruz. 1990. General organization of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids. *J. Bacteriol.* **172**:5795–5802.
- Cao, T. B., and M. H. Saier, Jr. 2001. Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology* **147**:3201–3214.
- Cascales, E., and P. J. Christie. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**:137–149.
- Christie, P. J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski, and E. Cascales. 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:451–485.
- Christie, P. J., and J. P. Vogel. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**:354–360.
- Dang, T. A., and P. J. Christie. 1997. The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* **179**:453–462.
- Dang, T. A., X. R. Zhou, B. Graf, and P. J. Christie. 1999. Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter. *Mol. Microbiol.* **32**:1239–1253.
- Draper, O., R. Middleton, M. Doucleff, and P. C. Zambryski. 2006. Topology of the VirB4 C terminus in the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4 type IV secretion system. *J. Biol. Chem.* **281**:37628–37635.
- Fernandez-Lopez, R., M. P. Garcillán-Barcia, C. Revilla, M. Lazaro, L. Vielva, and F. de la Cruz. 2006. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:942–966.
- Fersht, A. 1999. Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman & Company, New York, NY.
- Fischer, W., R. Haas, and S. Odenbreit. 2002. Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:159–168.
- Gomis-Ruth, F. X., G. Moncalian, R. Perez-Luque, A. Gonzalez, E. Cabezon, F. de la Cruz, and M. Coll. 2001. The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**:637–641.
- Grahn, A. M., J. Haase, D. H. Bamford, and E. Lanka. 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.
- Hormaeche, I., I. Alkorta, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goni, and F. De La Cruz. 2002. Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation. *J. Biol. Chem.* **277**:46456–46462.
- Jones, A. L., K. Shirasu, and C. I. Kado. 1994. The product of the *virB4* gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein. *J. Bacteriol.* **176**:5255–5261.

21. Kreuzer, K. N., and C. V. Jongeneel. 1983. Escherichia coli phage T4 topoisomerase. *Methods Enzymol.* **100**:144–160.
22. Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins, and L. S. Frost. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**: 1–15.
23. Lessl, M., D. Balzer, W. Pansegrau, and E. Lanka. 1992. Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J. Biol. Chem.* **267**:20471–20480.
24. Levitzki, A., and D. E. Koshland, Jr. 1969. Negative cooperativity in regulatory enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**:1121–1128.
25. Levitzki, A., and D. E. Koshland, Jr. 1976. The role of negative cooperativity and half-of-the-sites reactivity in enzyme regulation. *Curr. Top. Cell Regul.* **10**:1–40.
26. Middleton, R., K. Sjolander, N. Krishnamurthy, J. Foley, and P. Zambryski. 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. USA* **102**:1685–1690.
27. Miroux, B., and J. E. Walker. 1996. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**:289–298.
28. Moncalian, G., E. Cabezon, I. Alkorta, M. Valle, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goni, and F. de la Cruz. 1999. Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J. Biol. Chem.* **274**:36117–36124.
29. Nunez, B., P. Avila, and F. de la Cruz. 1997. Genes involved in conjugative DNA processing of plasmid R6K. *Mol. Microbiol.* **24**:1157–1168.
30. Rabel, C., A. M. Grahm, R. Lurz, and E. Lanka. 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.
31. Record, M. T., Jr., E. S. Courtenay, S. Cayley, and H. J. Guttman. 1998. Biophysical compensation mechanisms buffering E. coli protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem. Sci.* **23**:190–194.
32. Rivas, S., S. Bolland, E. Cabezon, F. M. Goni, and F. de la Cruz. 1997. TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. *J. Biol. Chem.* **272**:25583–25590.
33. Savvides, S. N., H. J. Yeo, M. R. Beck, F. Blaesing, R. Lurz, E. Lanka, R. Buhrdorf, W. Fischer, R. Haas, and G. Waksman. 2003. VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J.* **22**:1969–1980.
34. Scheres, S. H., M. Valle, R. Nunez, C. O. Sorzano, R. Marabini, G. T. Herman, and J. M. Carazo. 2005. Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. *J. Mol. Biol.* **348**:139–149.
35. Schleich, T., and P. H. von Hippel. 1970. Ion-induced water-proton chemical shifts and the conformational stability of macromolecules. *Biochemistry* **9**:1059–1066.
36. Schuck, P. 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**:1606–1619.
37. Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**: 850–858.
38. Shirasu, K., Z. Koulikova-Nicola, B. Hohn, and C. I. Kado. 1994. An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from Agrobacterium tumefaciens to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol. Microbiol.* **11**:581–588.
39. Sorzano, C. O., R. Marabini, J. Velazquez-Muriel, J. R. Bilbao-Castro, S. H. Scheres, J. M. Carazo, and A. Pascual-Montano. 2004. XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **148**:194–204.
40. Tato, I., I. Matilla, I. Arechaga, S. Zunzunegui, F. de la Cruz, and E. Cabezon. 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.
41. Tato, I., S. Zunzunegui, F. de la Cruz, and E. Cabezon. 2005. TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:8156–8161.
42. Waters, V. L. 1999. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front. Biosci.* **4**:D433–D456.
43. Weiss, J. N. 1997. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* **11**:835–841.
44. Yeo, H. J., S. N. Savvides, A. B. Herr, E. Lanka, and G. Waksman. 2000. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the Helicobacter pylori type IV secretion system. *Mol. Cell* **6**:1461–1472.
45. Yuan, Q., A. Carle, C. Gao, D. Sivanesan, K. A. Aly, C. Hoppner, L. Krall, N. Domke, and C. Baron. 2005. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* **280**:26349–26359.

SUPPLEMENTARY DATA

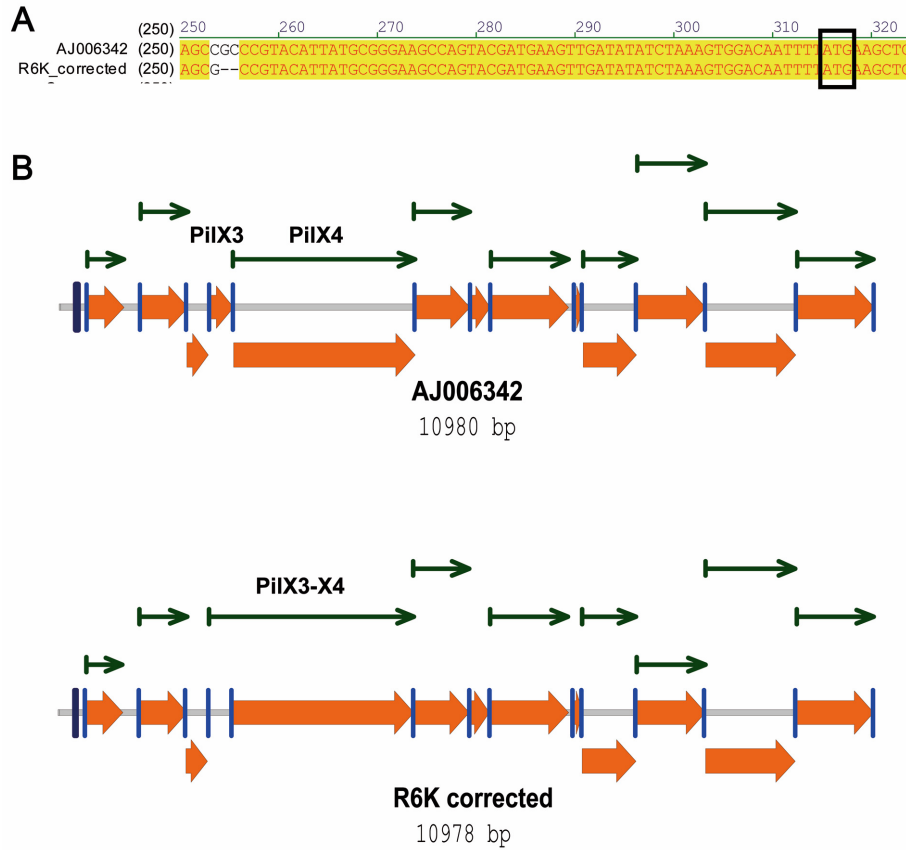
Supplementary Figure 1

A	1	MGAIESRKLL	ASETPVGQFI	PYSHHVTDTI	ISTKNAEYLS	VWKIDGRSHQ
	51	SASEADVQW	IRELNNTLRG	ISSANLSLWT	HIVRRRVYFY	PDAEFDNVFC
	101	RQLDEKYRES	FTGYNLMVND	LYLTVVYRPV	SDKVLSFFAK	RERETPDQKK
	151	HRQESCIKAL	EDINRTLQGS	FKRYGAELLS	VYEKGGHAFS	APLEFLARLV
	201	NGEHIPMPIC	RDRFSDYMAV	NRPMFSKWGE	VGELRSLTGL	RRFGMLEIRE
	251	YDDATEPGQL	NVLLESDFEF	VLTHSFSVLS	RPAAKEYLQR	HQKNLIDARD
	301	VATDQIEEID	EALNQLISGH	FVMGEHHCTL	TVYGETVQQV	RDNLAHASAA
	351	MLDVAVLPKP	VDLALEAGYW	AQLPANWQWR	PRPAPITSLN	FLSFSFPFHF
	401	MSGKPTGNPW	GPAVTILKTV	SGTPLYFNH	ASKEEDATD	KRLLGNTMLI
	451	GQSSSGKTVL	LGFLLAQAQK	FKPTIVAFDK	DRGMEISIRA	MGGRYLPLKT
	501	GEPSGFNPFQ	LPPTHANLIF	LKQFVKKLAA	AGGEVTHRDE	EEIDQAITAM
	551	MSDSIDKSLR	RLSLLLQFLP	NPRSDDMDAR	PTVHARLVKW	CEGGDYGWLF
	601	DNPTDALDLS	THQIYGFDT	EFLDNPEART	PVMYLLYRT	ESMIDGRFRM
	651	YVFDEFWKPL	QDEYFEDLAK	NKQKTIRKQN	GIFVFATQEP	SDALESNIAK
	701	TLIQQCATYI	FLANPKADYE	DYTQGFKLTD	SEFELVRGLG	EFSRRFLIKQ
	751	GDQSALAEMN	LGKFRITVDG	ETVERDFDDE	LLVLSGTPDN	AEIAESIIAE
	801	VGDDPAVWLP	IFLDRVKAER	SDV		

B	1	MGAIESRKLL	ASETPVGQFI	PYSHHVTDTI	ISTKNAEYLS	VWKIDGRSHQ
	51	SASEADVQW	IRELNNTLRG	ISSANLSLWT	HIVRRRVYFY	PDAEFDNVFC
	101	RQLDEKYRES	FTGYNLMVND	LYLTVVYRPV	SDKVLSFFAK	RERETPDQKK
	151	HRQESCIKAL	EDINRTLQGS	FKRYGAELLS	VYEKGGHAFS	APLEFLARLV
	201	NGEHIPMPIC	RDRFSDYMAV	NRPMFSKWGE	VGELRSLTGL	RRFGMLEIRE
	251	YDDATEPGQL	NVLLESDFEF	VLTHSFSVLS	RPAAKEYLQR	HQKNLIDARD
	301	VATDQIEEID	EALNQLISGH	FVMGEHHCTL	TVYGETVQQV	RDNLAHASAA
	351	MLDVAVLPKP	VDLALEAGYW	AQLPANWQWR	PRPAPITSLN	FLSFSFPFHF
	401	MSGKPTGNPW	GPAVTILKTV	SGTPLYFNH	ASKEEDATD	KRLLGNTMLI
	451	GQSSSGKTVL	LGFLLAQAQK	FKPTIVAFDK	DRGMEISIRA	MGGRYLPLKT
	501	GEPSGFNPFQ	LPPTHANLIF	LKQFVKKLAA	AGGEVTHRDE	EEIDQAITAM
	551	MSDSIDKSLR	RLSLLLQFLP	NPRSDDMDAR	PTVHARLVKW	CEGGDYGWLF
	601	DNPTDALDLS	THQIYGFDT	EFLDNPEART	PVMYLLYRT	ESMIDGRFRM
	651	YVFDEFWKPL	QDEYFEDLAK	NKQKTIRKQN	GIFVFATQEP	SDALESNIAK
	701	TLIQQCATYI	FLANPKADYE	DYTQGFKLTD	SEFELVRGLG	EFSRRFLIKQ
	751	GDQSALAEMN	LGKFRITVDG	ETVERDFDDE	LLVLSGTPDN	AEIAESIIAE
	801	VGDDPAVWLP	IFLDRVKAER	SDV		

Supplementary Figure 1. Tandem Mass Spectrometry of TrwK. Selected protein bands were excised manually from the gel and subjected to in-gel digestion with trypsin and analyzed by LC-MS/MS. Obtained spectra were processed using ProteinLynx Global Server and searched against NCBI databases using MASCOT search engine. Amino acid sequences of the bands with MW_{app} 94 kDa (Panel A) and MW_{app} of 80 kDa (Panel B) in the SDS-PAGE (Fig.1) were identified by peptide fragment fingerprinting as *E. coli* TrwK. Comparison of sequence coverage in Panels A and B shows that fragment B is missing peptides in its N-terminus, suggesting a cleavage site of the protein in aac. 173.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. PilX3-PilX4 gene fusion in R6K. The intergenic region between PilX3 and PilX4 in R6K (accession number AJ006342) was sequenced. An error was found resulting in a bad annotation of the R6K genome (*Panel A*). As a result two genes were annotated instead of only one (*Panel B*). The ATG codon (boxed in Panel A)) indicates the N-terminus of PilX4 in previous annotations.

Autoinhibitory Regulation of TrwK, an Essential VirB4 ATPase in Type IV Secretion Systems^{*[5]}

Received for publication, December 3, 2010, and in revised form, February 16, 2011. Published, JBC Papers in Press, March 24, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.208942

Alejandro Peña¹, Jorge Ripoll-Rozada, Sandra Zunzunegui, Elena Cabezón, Fernando de la Cruz, and Ignacio Arechaga²

From the Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), UC-IDICAN-CSIC, Santander 39011, Spain

Type IV secretion systems (T4SS) mediate the transfer of DNA and protein substrates to target cells. TrwK, encoded by the conjugative plasmid R388, is a member of the VirB4 family, comprising the largest and most conserved proteins of T4SS. In a previous work we demonstrated that TrwK is able to hydrolyze ATP. Here, based on the structural homology of VirB4 proteins with the DNA-pumping ATPase TrwB coupling protein, we generated a series of variants of TrwK where fragments of the C-terminal domain were sequentially truncated. Surprisingly, the *in vitro* ATPase activity of these TrwK variants was much higher than that of the wild-type enzyme. Moreover, addition of a synthetic peptide containing the amino acid residues comprising this C-terminal region resulted in the specific inhibition of the TrwK variants lacking such domain. These results indicate that the C-terminal end of TrwK plays an important regulatory role in the functioning of the T4SS.

Type IV secretion systems (T4SSs)³ translocate DNA and protein substrates across the cell envelope of bacteria to a wide number of eukaryotic and prokaryotic target cells (1, 2). Conjugative T4SSs are used by bacteria to mediate the transfer of DNA and proteins to conjugation recipient cells, resulting in the widespread transmission of antibiotic resistance genes among pathogenic bacteria (3, 4). Other T4SSs are used by several plant and human pathogens, such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Brucella suis*, etc., to deliver virulence-related effectors to eukaryotic target cells (5–7).

T4SSs are macromolecular assemblies composed of 11 mating pair proteins (VirB1 to VirB11) and a coupling protein (VirD4) that span inner and outer bacterial membranes. Three of these proteins, VirB11, VirB4, and VirD4, are ATPases that energize DNA and protein substrate transfer as well as pilus assembly (8–10). VirB4 proteins are the largest and most evo-

lutionarily conserved proteins in T4SS (11) and are essential for virulence and for plasmid transfer (12). They contain consensus Walker A and B NTP binding motifs and have been suggested to energize substrate translocation across the T4SS (13). VirB4 and VirB11 ATPases have been shown to influence the disposition of VirB2, the T4SS membrane-integrated pilin (14). Recently, we demonstrated that TrwK, the VirB4 homologue in the R388 conjugative system, is able to hydrolyze ATP in the absence of potential substrates (8). The ability to hydrolyze ATP by VirB4 proteins has been later confirmed for other TrwK homologues (15) (16).

Little is known about the atomic structure of VirB4 proteins. Based on computer predictions using the atomic coordinates of the coupling protein TrwB of plasmid R388 as a template, a model of the C terminus (residues 426–787) of *A. tumefaciens* VirB4 was created (17). This finding suggested the possibility that VirB4 subunits might assemble as higher order homohexamers and work as docking sites for substrate transport. TraB, the VirB4 homologue in the conjugative plasmid pKM101, also assembles in hexameric form in solution, although it is dimeric when extracted from the membranes (15). Recently, structural studies by small angle x-ray scattering (SAXS) of the membrane-extracted dimeric form of TraB have provided insights into the size and form of this protein (18).

Here, we used a bioinformatic approach to generate a model of the C-half domain of TrwK_R388. Secondary structure predictions of TrwK and TrwB revealed the presence of three α -helices in the C terminus that are conserved in all VirB4 proteins but absent in TrwB. Therefore, we decided to generate truncated variants of TrwK where these α -helical structures were sequentially removed and their *in vitro* and *in vivo* properties were analyzed. Enzymatic analysis of these mutants revealed that removal of the C-terminal α -helices of TrwK induced a large increase in ATP turnover relative to wild-type TrwK. Interestingly, this ATPase increment could be specifically reverted upon addition of an exogenous peptide consisting of the amino acid residues Gly⁸⁰²-Val⁸²³ of the C terminus of TrwK. The results suggest that the C-terminal end of VirB4 proteins plays a key functional regulatory role in the biological activity of T4SS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning of TrwK and Mutants—The DNA of R388 gene *trwK* was amplified by PCR and cloned into a pET3a expression vector (Novagen, Madison, WI). The *trwK*_1–772, *trwK*_1–787, and *trwK*_1–801 mutants were generated by PCR using the same forward primer (5'-TATCATATGGGGCAATTGAA-

^{*} This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN, Spain) Grants BFU2008-00806 and BFU2008-00995/BMC, RD06/0008/1012 from Instituto de Salud Carlos III (Spain) and LSHM-CT-2005_019023 from the European VI Framework Program.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S3.

¹ Supported by a predoctoral fellowship from the MCINN.

² To whom correspondence should be addressed: Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), UC-IDICAN-CSIC, 39011 Santander, Spain. Tel.: 34-942-202033; Fax: 34-942-201945; E-mail: arechagai@unican.es.

³ The abbreviations used are: T4SS, type IV secretion system; SAXS, small angle x-ray scattering.

TCCC) and the reverse primers 5'-TTTGGATCCT-CACGTCTCACCATCGA, 5'-TAAGGATCCCGTGCCCGA-CAGCAC and 5'-TTTGGATCCGACTTCGCAATAATG, respectively. The relevant DNA fragments were digested with NdeI and BamHI restriction enzymes and ligated into the corresponding sites in the MCS of vector pET3a (or in vector pET28a in the case of TrwK_1-772). Plasmid DNAs were used to transform *Escherichia coli* strain C41(DE3) (19).

Antibodies and Reagents—A polyclonal antibody recognizing TrwK was raised by injecting purified TrwK mixed with incomplete Freund's adjuvant in New Zealand White rabbits. The primary anti-TrwK antiserum was affinity purified using antigen immobilized on nitrocellulose filters as described in Ref. 20. Donkey anti-rabbit IR-Dye 800 CW was purchased from LI-COR Biosciences.

Peptides—Peptides comprising amino acid residues corresponding to the C terminus of TrwK (residues 802–823) and TrwC (residues 947–966) of the conjugative plasmid R388 were purchased to Peptide-2.0 (Chantilly, VA). The amino acid sequences of TrwK and TrwC C terminus peptides were GDDPAVWLPIFLDRVKAERSDV and PAHDRQKAAREAE-RGMEAGR, respectively. Peptides were dissolved in 50 mM Pipes-NaOH, pH 7.0, to a final concentration of 10 mM, aliquoted, and stored at -20°C .

In Vivo Complementation Assays—Conjugation donor strains were derivatives of *Escherichia coli* K12 strain DH5 α carrying either wt plasmid R388 or plasmid pSU4133 (a R388 variant with a knock-out mutation of the *trwK* gene (21)), plus derivatives of vector plasmid pET3a containing either the wild-type *trwK* gene or the C-ter *trwK* mutants. These strains were mated with recipient strain UB1637 as described previously (22). Transconjugants were selected on L-agar plates containing trimethoprim (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and streptomycin (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Protein Purification—Protein overexpression was induced by the addition of 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). After 6 h induction, cells were harvested and suspended in a buffer consisting of 20 mM spermidine, 200 mM NaCl, and 1 mM EDTA and stored at -20°C . Thawed cells were lysed as described by Tato *et al.* (10). For TrwK wt, TrwK_1-787, and TrwK_1-801, lysates were collected by centrifugation, diluted four times in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and applied to a HiTrap SP-Sepharose (5 ml) column (Amersham Biosciences, GE). TrwK-containing fractions were collected in the flow-through and applied to a HiTrap Q-Sepharose (5 ml) column. TrwK was eluted from this column in a linear gradient of NaCl at a 250 mM salt concentration. The enriched fractions were pooled, diluted to 50 mM NaCl final concentration and applied to a second HiTrap Q-Sepharose (5 ml) column. TrwK-containing fractions were pooled, concentrated, and loaded onto a Superdex200 GL10_30 column. After isocratic elution in a buffer consisting of 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 150 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, fractions were pooled and stored at -20°C .

Overexpression of the TrwK_1-772 mutant resulted in the formation of inclusion bodies. Therefore, a strategy to refold

this mutant variant was investigated. Highly purified inclusion bodies were obtained after centrifugation of the lysate at $27,000 \times g$. The pellet was solubilized in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 6 M guanidine hydrochloride (Gn-HCl), and applied to a HisTrap HP (5 ml) column (Amersham Biosciences, GE). A decreasing gradient to slowly remove the Gn-HCl was applied in the presence of a buffer containing 25 mM imidazole, 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 mM EDTA, and 0.5 mM PMSF. TrwK_1-772 was eluted from this column in a linear gradient of imidazole at a 200 mM. The subsequent steps of the purification were similar to those of wt TrwK purification.

Membrane Fractionation and Immunodetection of TrwK—Membrane fractions were obtained by the method of Osborn *et al.* (23) with some modifications. Cells were harvested by centrifugation at $5,000 \times g$. Pellets were resuspended in a buffer containing 50 mM Tris, pH 7.6, 20% sucrose, 2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 200 g/ml lysozyme. After incubation in ice for 30 min, an equal volume of deionized water with 5 mM EDTA was slowly added. The mixture was sonicated and centrifuged for 10 min at $5,000 \times g$ and then at $20,000 \times g$ (10 min) to eliminate any possible inclusion body. Finally, membranes were obtained by centrifugation for 30 min at $220,000 \times g$. The pellet (membrane fraction) was resuspended in 50 mM Tris, pH 7.6, 0.5 mM PMSF, 5 mM EDTA, 2% SDS, and clarified by sonication and centrifugation at $220,000 \times g$. Protein samples were run in a SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter and incubated with anti-TrwK rabbit antiserum. Images were obtained after incubation with an IRDye anti-rabbit IgG (goat) antibody conjugate using an Odyssey scanner (Li-Cor Biosciences).

ATP Hydrolysis Assays—TrwK_1-772, TrwK_1-787, and TrwK_1-801 ATPase activity was measured by a coupled enzyme assay (24). To analyze ATP concentration dependence, TrwK mutants were incubated in 150 μl of ATP assay buffer, consisting of 50 mM PIPES pH 6.45, 75 mM potassium acetate, 5% (w/v) glycerol, 10 mM magnesium acetate, 1 mM potassium chloride, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phosphoenolpyruvate, 0.25 mM NADH, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pyruvate kinase, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lactate dehydrogenase, and 0.1–10 mM ATP. Reactions were started by the addition of TrwK. Activity was measured by the decrease in NADH absorbance at 340 nm for 15 min at 37°C in a UV-1603 spectrophotometer (Shimadzu).

Molecular Modeling—An atomic model of TrwK was generated by molecular threading using the protein homology and recognition engine Phyre (25). A model of the C-half of TrwK (residues 413–772) was generated using the atomic coordinates of TrwB (1e9r.pdb) (26) as template. Based on the hexameric structure of TrwB, a model of TrwK hexamer was built using the UCSF Chimera package (27).

RESULTS

Structural Comparison between TrwB and TrwK Proteins—A bioinformatic analysis of full-length TrwK amino acid sequence (823 aac) was used to generate a model of the C-half domain of the protein (residues 413–772; Fig. 1). The model created by molecular threading of TrwK sequence on

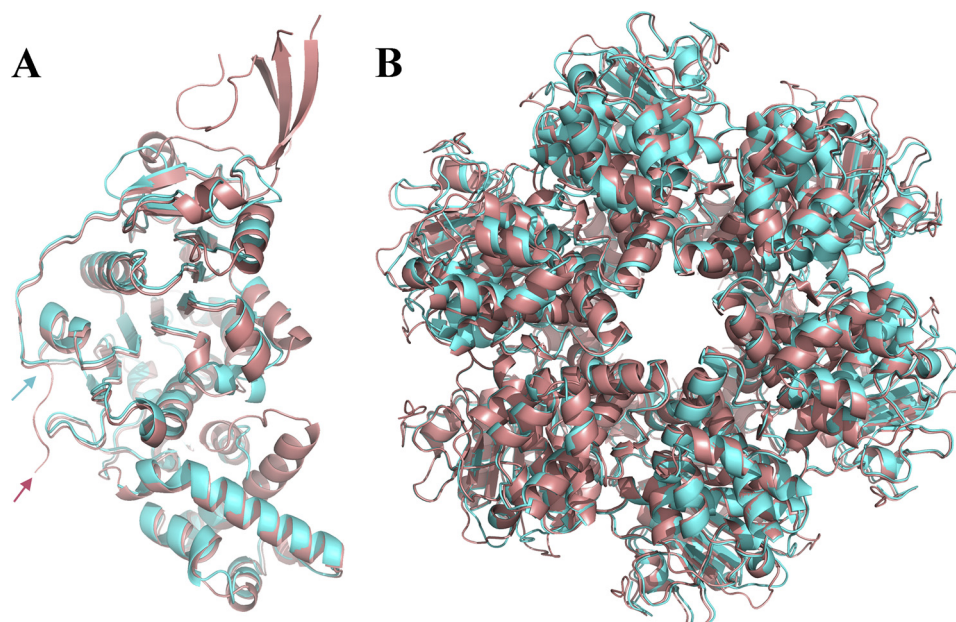


FIGURE 1. **Molecular modeling of TrwK.** A model of the C-half of TrwK (cyan) comprising amino acid residues Ala⁴¹³ to Thr⁷⁷² was generated by molecular threading using the atomic structure of the coupling protein TrwB (*salmon*, PDB code: 1e9r.) as a template. The monomeric model of TrwK was assembled as an hexamer by fitting its coordinates with the hexameric TrwB (left) using Chimera software. Arrows pointing at the C terminus of both, the TrwK model and TrwB structure, indicate that these C-ends are formed by unstructured tails. Images were rendered with PyMol.

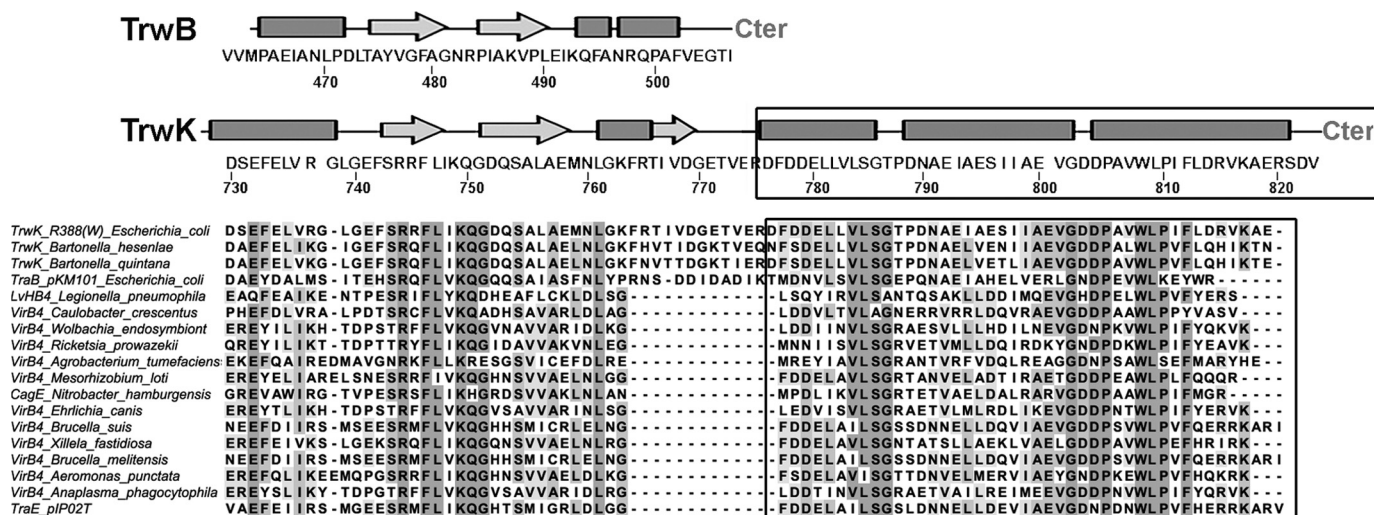


FIGURE 2. **VirB4 proteins contains a C terminus consisting of three α -helices that are absent in TrwB.** Secondary structure predictions for TrwB and TrwK (top panel) reveals the presence in TrwK of three α -helical structures that are absent in TrwB. Sequence alignment of a representative number of VirB4 proteins (bottom panel) shows that this C-terminal region is highly conserved in this family of proteins. Amino acids with 100% identity are represented by dark gray boxes. Alignment was performed using T-Coffee (55) and represented using Jalview (56).

a template consisting of the atomic structure of TrwB coupling protein (1e9r.pdb) (26) is very similar to a previously reported model of a TrwK homologue, the VirB4 protein of *A. tumefaciens* (17). In both cases, the template was TrwB, an hexameric integral membrane protein encoded by the conjugative plasmid R388 that is involved in the movement of the relaxosome DNA-binding complex toward the T4SS (28). TrwB belongs to the RecA protein-like family (26) and it displays a DNA-dependent ATPase activity (10, 29, 30). Likewise, TrwK, also encoded by plasmid R388, is also able to hydrolyze ATP (8).

Comparison between the atomic model of TrwB and the C-terminal half of TrwK revealed a striking structural simi-

larity (Fig. 1). The main differences among both structures were found in their C termini. The structure of TrwB (Fig. 1, *salmon*) finishes by an unstructured tail. On the other hand, the model of TrwK ends in residue Glu-772. It was not possible to model the remaining 51 amino acid residues at the C terminus of TrwK since the template (TrwB) does not have equivalent residues at this position. Secondary structure prediction (31) for both proteins suggests that TrwK contains three α -helices at its C-end that are not present in TrwB (Fig. 2). Interestingly, this C-terminal domain is highly conserved in all VirB4 homologues (Fig. 2 and supplemental Fig. S1). Therefore we decided to investigate if the α -helices which are present in TrwK but absent in TrwB could play a role in

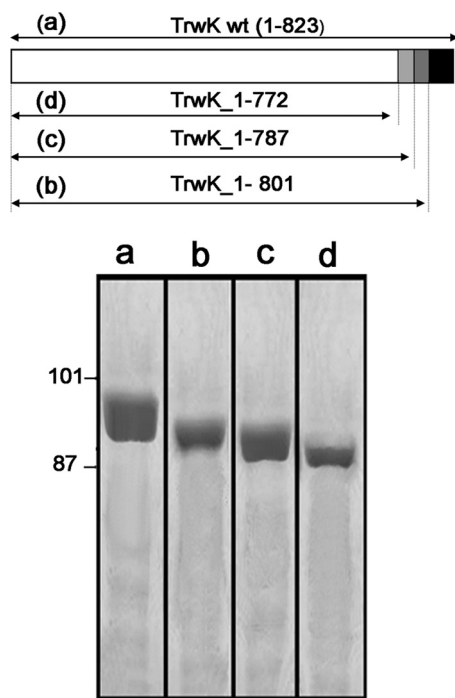


FIGURE 3. Isolation of TrwK-truncated mutants. Top, schematic representation of TrwK and the α -helical structures of the C-terminal end indicated in Fig. 2. The C-terminal α -helices were sequentially removed, thus generating three different truncated forms of the protein. Bottom, SDS-PAGE of purified proteins after gel filtration. Lane a, full-length TrwK (93 kDa); lane b, TrwK 1–801 (91 kDa); lane c, TrwK 1–787 (89.8 kDa); lane d, TrwK 1–772 (88 kDa).

the different biological functions suggested for both proteins (effector transport/pilus assembly and DNA translocation, respectively).

Removal of the α -Helices at the C Terminus of TrwK Increases the *in Vitro* ATPase Activity—Based on the structural homology of the C-half of TrwK with the coupling protein TrwB we designed truncated variants of TrwK where the three α -helices at the C-end were sequentially removed. These mutants comprised amino acid residues 1–801, 1–787, and 1–772, respectively. Each mutant was purified (Fig. 3) and tested for its ability to hydrolyze ATP in the same conditions than wt TrwK. As observed in Fig. 4, removal of the C-terminal helices of TrwK resulted in a dramatic increase of the rate of ATP hydrolysis. The $V_{\max}$ of ATP hydrolysis rose from 48 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ for wt TrwK to 467, 476, or 591 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ for TrwK 1–772, 1–787, and 1–801, respectively. Interestingly, the $K_m(\text{app})$ did not change significantly (Table 1), suggesting that removal of these regions did not affect the conformational structure of the nucleotide binding site (and thus its nucleotide binding affinity).

Addition of a Complementing Synthetic Peptide Reverts the ATP Turnover Increase of TrwK-truncated Variants—The increase in the ATP turnover upon removal of the C-terminal domain of TrwK opened the question if the α -helical structure of this domain was the only requirement to exert the observed regulatory function or, on the contrary, the specific amino acid sequence of this domain was essential for such a function. Alignment of 25 VirB4 sequences (supplemental Fig. S1), belonging to distant branches of the VirB4 phylogenetic tree (11), shows a high degree of conservation

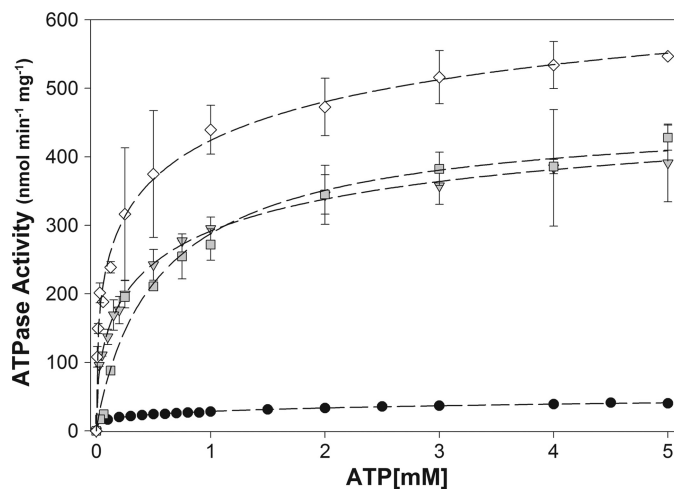


FIGURE 4. Kinetic analysis of ATP hydrolysis by TrwK C-terminal-truncated variants. Isothermal titration response of TrwK and mutant variants as a function of ATP concentration monitored by a coupled enzyme assay. Data were fitted to a Hill equation in each case. The different data sets represent TrwK full-length (filled circles), TrwK^{1–772} (gray filled circles), TrwK^{1–787} (gray filled squares), and TrwK^{1–801} (open diamonds).

TABLE 1

Kinetic parameters of TrwK and truncated mutant variants

Mutant variant	$V_{\max}^a$ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	$K_m(\text{app})^b$ mM
TrwK	48.1 ± 1.9	0.41 ± 0.07
TrwK ^{1–772}	467.8 ± 54.4	0.49 ± 0.03
TrwK ^{1–787}	476.2 ± 22.6	0.60 ± 0.16
TrwK ^{1–801}	591.5 ± 23.7	0.38 ± 0.08

^a Values of $V_{\max}$ were calculated by using the modified representation of the Hill equation $\log(v/V_{\max} - v)$ vs $\log(\text{ATP})$.

^b Values of $K_m(\text{app})$ were obtained by direct data fitting to a Hill equation.

in the C-terminal end (residues Gly⁸⁰²–Val⁸²³ in TrwK), with a consensus sequence G-D/X-D/X-P-X-X-W-L/I-P/X-X-F/Y. Based on this homology we designed a synthetic peptide comprising the amino acids G⁸⁰² to V⁸²³ of TrwK, thus complementary to the truncated variant TrwK^{1–801}. The ATPase activity of all TrwK truncated variants was inhibited upon addition of this peptide to the enzyme reaction (Fig. 5). In contrast, wt TrwK, that already contains this sequence covalently bound, was unaffected. The inhibitory effect of TrwK^{802–823} peptide did not change significantly the K_m^{ATP} value (supplemental Fig. S2), and it was specific for TrwK, as we found that the ATPase activity of TrwB and TrwD, the other two essential ATPases in T4SS, was unaffected by this peptide (data not shown). A peptide with a different amino acid sequence, equivalent to the last 20 amino acids of the R388 relaxase, TrwC, (residues Pro⁹⁴⁷ to Arg⁹⁶⁶, see “Experimental Procedures”), used as a control, did not affect ATP turnover in any case (Fig. 5).

TrwK C-terminal-truncated Mutants Are Unable to Complement the *in Vivo* Function of R388:: $\Delta trwK$ —The effect of truncating C-terminal sequences of TrwK on the rate of ATP hydrolysis suggested that this region could play an important role in the regulation of TrwK function. Therefore, we studied the effect of removing this C-terminal region of TrwK on bacterial conjugation. Donor cells carrying a modified version of the conjugative plasmid R388 with a knock-out mutation in gene *trwK* (R388:: $\Delta trwK$) were transformed with plas-

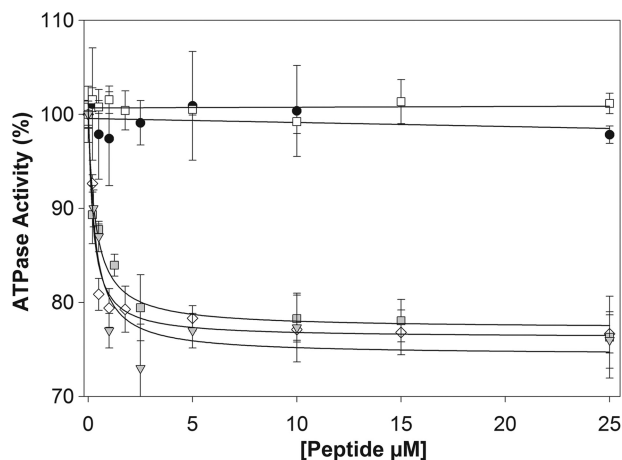


FIGURE 5. Inhibition of the ATPase activity of TrwK mutant variants by addition of a synthetic peptide corresponding to the C terminus. ATPase activity of wt TrwK (filled circles), TrwK¹⁻⁷⁷² (gray filled triangles), TrwK¹⁻⁸⁰¹ (gray filled squares), and TrwK¹⁻⁷⁸⁷ (open diamonds) incubated with a synthetic peptide comprising amino acids Gly⁸⁰²-Val⁸²³ of TrwK. A peptide comprising amino acids Pro⁹⁴⁷-Arg⁹⁶⁶ of TrwC (open squares) was used as a control.

TABLE 2

Conjugation frequencies of R388 and *trwK* mutants in the presence of complementing proteins

Plasmids in donor ^a	Variant of TrwK in donor	Conjugation frequencies ^b
R388	TrwK	4.76×10^{-1}
pSU4133	R388::Δ <i>trwK</i>	$<1 \times 10^{-7}$
R388 + pET3a_ <i>trwK</i>	<i>trwK</i>	2.21×10^{-2}
R388 + pET3a_ <i>trwK1-801</i>	<i>trwK1-801</i>	1.84×10^{-2}
R388 + pET3a_ <i>trwK1-787</i>	<i>trwK1-787</i>	1.37×10^{-2}
R388 + pET3a_ <i>trwK1-772</i>	<i>trwK1-772</i>	1.21×10^{-2}
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK</i>	<i>trwK</i>	2×10^{-3}
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK1-801</i>	<i>trwK1-801</i>	$<1 \times 10^{-7}$
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK1-787</i>	<i>trwK1-787</i>	$<1 \times 10^{-7}$
pSU4133 + pET3a_ <i>trwK1-772</i>	<i>trwK1-772</i>	$<1 \times 10^{-7}$

^a Donor cells (*E. coli* K12 strain DH5α) carrying the plasmids shown in the first column were mated with strain UB1637.

^b Transfer frequency of transconjugants selected in streptomycin and trimethoprim plates.

mids containing either wt *trwK* or the C-terminal *trwK* mutants. The capability to complement the activity of the *trwK* gene in bacterial conjugation was monitored by the number of transconjugants obtained in recipient cells. As observed in Table 2, none of the mutants was able to restore the activity of wt TrwK. The expression levels of these TrwK variants in donor cells and the subcellular location on the membrane indicated that these mutant variants were expressed and targeted in a way similar to the wt protein (Fig. 6). Interestingly, conjugation frequencies from donor cells carrying plasmid R388 together with plasmids encoding either the mutant variants or wt TrwK were similar in all cases, indicating that the expression of these mutants was not affecting the function of TrwK in R388 conjugation.

DISCUSSION

In a previous report we demonstrated that TrwK, a VirB4 homologue of the conjugative plasmid R388 was able to hydrolyze ATP (8), thus settling down an old debate on the ability of these proteins to perform such a task. These results were later confirmed in similar studies carried out with TraB, the VirB4 homologue of the conjugative plasmid pKM101 (32) and TraE

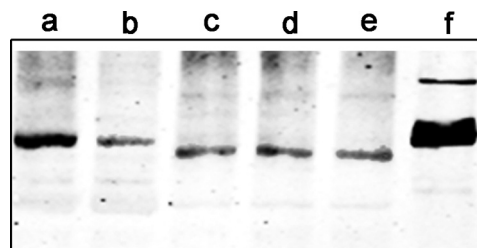


FIGURE 6. Western blot analysis of expression and sub-cellular location of TrwK and truncated mutant variants. Donor cells (*E. coli* DH5α) used in bacterial conjugation experiments were lysed as described in "Experimental Procedures." Membranes were isolated by differential centrifugation, run in SDS-PAGE and transferred into a nitrocellulose filter. After incubation with rabbit anti-TrwK antiserum, bands were immunodetected with an infrared conjugated anti-rabbit antibody using an Odyssey scanner. Lane a, membranes from cells containing R388 plasmid; lane b, pSU4133 + pET3a_ *trwK*; pSU4133 + pET3a_ *trwK1-801* (lane c); pSU4133 + pET3a_ *trwK1-787* (lane d), and pSU4133 + pET3a_ *trwK1-772* (lane e). Lane f, purified TrwK (50 ng).

of *Aeromonas veronii* (16). To gather further understanding of the role of ATP hydrolysis by VirB4 proteins in effector transport and/or pilus assembly, the study of its activity and regulation is essential. In the work presented here we have identified a region of TrwK that could be crucial in the regulation of its activity.

A previous model of the C-half of *A. tumefaciens* VirB4 (17) suggested that these proteins assemble as hexamers much like VirD4 (26) and VirB11 (33). In addition, the oligomeric state in solution of TraB of pKM101, has been shown to be predominantly hexameric, although it is dimeric when extracted from membranes (15). The *A. tumefaciens* VirB4 model, obtained by a bioinformatic approach, was generated using the atomic structure of TrwB, the R388 ATPase involved in DNA transfer, as a template (26). Here, we used a similar approach to create a model of the C-half of TrwK (residues 413–772). However, it was not possible to extend this model to the last 51 amino acid residues of TrwK since the template, TrwB, lacked this C-terminal region. Secondary structure predictions revealed that this C-terminal region, which is present in TrwK but absent in TrwB, consisted of three α-helices. These terminal α-helical structures seem to be a general feature in all VirB4 proteins.

Sequential removal of the three α-helices of the C-terminal domain of TrwK resulted in mutant variants with ATP hydrolysis rates over 10 times higher than those obtained with wt TrwK. The remaining kinetic parameters (K_m (app) and Hill coefficient) were not affected by these mutations suggesting that these deletions did not induce conformational changes in the nucleotide binding site. In contrast, these mutants were unable to complement the *in vivo* activity of TrwK in bacterial conjugation experiments, indicating that this C-terminal domain must play an essential role in conjugation. Interestingly, experiments where both wt TrwK and mutant variants were co-expressed within the donor cells, showed that expression of the mutants was not affecting the function of TrwK, suggesting that either these truncated variants are unable to associate with the wild-type protein or, if they do so, the absence of the C-terminal region in one monomer does not affect the activity of the putative heterohexamer.

The results shown here suggest that the C-terminal domain of TrwK acts as an autoinhibitory region that prevents futile ATP hydrolysis in the resting state. Interaction with specific effectors and/or with other partners of the transport machinery would produce a conformational change in this C-terminal region, resulting in stimulation of ATP hydrolysis. Similar autoinhibitory mechanisms have been found in a large variety of proteins, including kinesin (34, 35), Hsp90 (36, 37), protein kinases (38–40), Ca-ATPase. (41–45), and other P-type ATPases (46–49). Moreover, in some of these cases, synthetic peptides consisting of amino acid sequences corresponding to the respective regulatory domains have been used to characterize the inhibitory mechanism of these proteins (41, 44, 45, 50). In some other cases, ATPase inhibition is carried out by a peptide encoded by a different gene, so regulation is controlled externally. That is the case of mitochondrial F_1 -ATPase, which is inhibited by an α -helical peptide called IF₁ (51). This inhibitor protein binds to the interface between the α - and β - subunits of F_1 -ATPase, thereby blocking rotary catalysis (52, 53). Interestingly, and in contrast to the mitochondrial enzyme, *E. coli* F_1 -ATPase inhibition is carried out by large conformational changes of the C-terminal domain of one of its components, the ϵ subunit (54), thus regulation is controlled internally without the need of encoding a specific external protein. Here, we show that the observed increase in ATP turnover upon removal of its C-terminal region is reverted upon exogenous addition of a synthetic peptide comprising the amino acid residues previously removed. It is enticing to speculate that the well characterized mechanism of inhibition of ATPase activity by IF₁ is a general feature shared among a large family of hexameric ATPases (see [supplemental Fig. S3](#)).

In summary, this work suggests a regulatory mechanism in Type IV secretion systems, based on modulation of the ATPase activity of VirB4, the largest and most conserved component of the translocation machinery. As discussed above, the auto-inhibitory mechanism of TrwK ATPase activity seems to be a general feature in a large variety of ATPases to prevent energy waste at a resting state.

REFERENCES

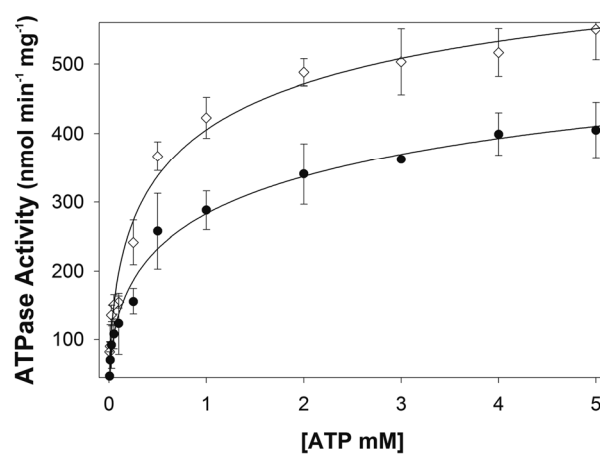
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 451–485
- Fronzes, R., Christie, P. J., and Waksman, G. (2009) *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 703–714
- Fischer, W., Haas, R., and Odenbreit, S. (2002) *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 159–168
- Waters, V. L. (1999) *Front Biosci.* **4**, D433–456
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. (1999) *Science* **284**, 1328–1333
- Burns, D. L. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 29–34
- Baron, C., OCallaghan, D., and Lanka, E. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**, 1359–1365
- Arechaga, I., Peña, A., Zunzunegui, S., del Carmen Fernández-Alonso, M., Rivas, G., and de la Cruz, F. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 5472–5479
- Rivas, S., Bolland, S., Cabezon, E., Goñi, F. M., and de la Cruz, F. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25583–25590
- Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 8156–8161
- Fernández-López, R., Garcillán-Barcia, M. P., Revilla, C., Lázaro, M., Vuelta, L., and de la Cruz, F. (2006) *FEMS. Microbiol. Rev.* **30**, 942–966
- Berger, B. R., and Christie, P. J. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 1723–1734
- Rabel, C., Grah, A. M., Lurz, R., and Lanka, E. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 1045–1058
- Kerr, J. E., and Christie, P. J. (2010) *J. Bacteriol.* **192**, 4923–4934
- Durand, E., Oomen, C., and Waksman, G. (2010) *J. Bacteriol.* **192**, 2315–2323
- Rangrez, A. Y., Abajy, M. Y., Keller, W., Shouche, Y., and Grohmann, E. (2010) *BMC. Biochem.* **11**, 10
- Middleton, R., Sjölander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J., and Zambryski, P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 1685–1690
- Durand, E., Waksman, G., and Receveur-Brechot, V. (2011) *BMC. Struct. Biol.* **11**, 4
- Miroux, B., and Walker, J. E. (1996) *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Bolland, S., Llosa, M., Avila, P., and de la Cruz, F. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 5795–5802
- Moncalián, G., Cabezon, E., Alkorta, I., Valle, M., Moro, F., Valpuesta, J. M., Goñi, F. M., and de La Cruz, F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36117–36124
- Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E., and Carson, J. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3962–3972
- Kreuzer, K. N., and Jongeneel, C. V. (1983) *Methods Enzymol.* **100**, 144–160
- Kelley, L. A., and Sternberg, M. J. (2009) *Nat. Protoc.* **4**, 363–371
- Gomis-Rüth, F. X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., and Coll, M. (2001) *Nature* **409**, 637–641
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
- Cabezon, E., Sastre, J. I., and de la Cruz, F. (1997) *Mol. Gen. Genet.* **254**, 400–406
- Tato, I., Matilla, I., Arechaga, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 25569–25576
- Matilla, I., Alfonso, C., Rivas, G., Bolt, E. L., de la Cruz, F., and Cabezon, E. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 17537–17544
- Jones, D. T. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202
- Durand, E., Oomen, C., and Waksman, G. (2010) *J. Bacteriol.* **192**, 2315–2323
- Yeo, H. J., Savvides, S. N., Herr, A. B., Lanka, E., and Waksman, G. (2000) *Mol. Cell.* **6**, 1461–1472
- Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G., and Schliwa, M. (2000) *Nat. Cell. Biol.* **2**, 333–338
- Hackney, D. D., and Stock, M. F. (2000) *Nat. Cell. Biol.* **2**, 257–260
- Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J., and Buchner, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **303**, 583–592
- Owen, B. A., Sullivan, W. P., Felts, S. J., and Toft, D. O. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 7086–7091
- Sanchez, V. E., and Carlson, G. M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17889–17895
- Zu, Y. L., Ai, Y., and Huang, C. K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 202–206
- Smith, M. K., Colbran, R. J., Brickey, D. A., and Soderling, T. R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1761–1768
- Reddy, L. G., Shi, Y., Kutchai, H., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., and Thomas, D. D. (1999) *Biophys. J.* **76**, 3058–3065
- Curran, A. C., Hwang, I., Corbin, J., Martinez, S., Rayle, D., Sze, H., and Harper, J. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30301–30308
- Enyedi, A., and Penniston, J. T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17120–17125
- Malmström, S., Akerlund, H. E., and Askerlund, P. (2000) *Plant Physiol.* **122**, 517–526
- Hwang, I., Sze, H., and Harper, J. F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6224–6229
- Palmgren, M. G., Sommarin, M., Serrano, R., and Larsson, C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 20470–20475
- Portillo, F., de Larrinoa, I. F., and Serrano, R. (1989) *FEBS Lett.* **247**, 381–385
- Ekberg, K., Palmgren, M. G., Veierskov, B., and Buch-Pedersen, M. J.

Autoinhibitory Regulation of TrwK ATPase Activity

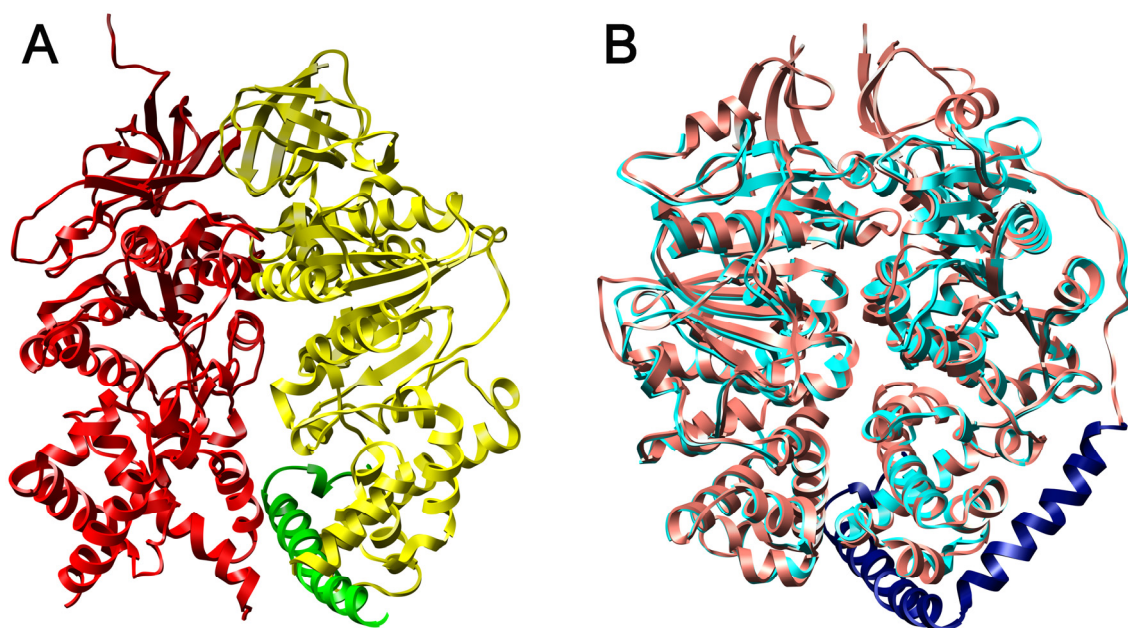
- (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 7344–7350
49. Baekgaard, L., Fuglsang, A. T., and Palmgren, M. G. (2005) *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 369–374
50. Yonekura, H., Nomura, A., Ozawa, H., Tatsu, Y., Yumoto, N., and Uyeda, T. Q. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 420–427
51. Walker, J. E. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 912–918
52. Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10**, 744–750
53. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 15671–15676
54. Tsunoda, S. P., Rodgers, A. J., Aggeler, R., Wilce, M. C., Yoshida, M., and Capaldi, R. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6560–6564
55. Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **302**, 205–217
56. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009) *Bioinformatics* **25**, 1189–1191

<i>LvHB4_Legionella_pneumophila</i>	GHDPELWLPV F YERSKK-----
<i>VirB4_Caulobacter_crescentus</i>	GDDPAAWLPPYVASVSEHR-----
<i>VirB4_Wolbachia_endosymbiont</i>	GDNPKVWLPIFYQVKKNV-----
<i>VirB4_Rickettsia_prowazekii</i>	GNDPDKWLPIFYEAVKTL-----
<i>VirB4_Agrobacterium_tumefaciens</i>	GDNPSAWLSEFMARYHEAKD-----
<i>TraB_pKM101_Escherichia_coli</i>	GNDPEVWLKEYWRLTA-----
<i>TrwK_R388(W)_Escherichia_coli</i>	GDDPAVWLPIFLDRVKAERSDV-----
<i>TrwK_Bartonella_Heseniae</i>	GDDPALWLPVFLQHIKTNRRTT-----
<i>TrwK_Bartonella_quintana</i>	GDDPAVWLPVFLQHIKTERRVI-----
<i>VirB4_Mesorhizobium_lotii</i>	GDDPEAWLPLFQQQRSAG-----
<i>CagE_Nitrobacter_hamburgensis</i>	GDDPAAWLPIFMGRAQG-----
<i>VirB4_Erwinia_carotovora</i>	GMQPDWDKDAFLEIAL-----
<i>TriC_Yersinia_enterocolitica</i>	GMKPDWLERYLQLAL-----
<i>VirB4_Yersinia_pestis</i>	GMQPHEWLDTYLAKAL-----
<i>VirB4_Ehrlichia_canis</i>	GDDPNTWLPIFYERVKHV-----
<i>VirB4_Xillela_fastidiosa</i>	GDDPAVWLPEFHRIRKGAIA-----
<i>VirB4_Brucella_melitensis</i>	GDDPSVWLPVFQERRKARIASSKSTGR-----
<i>VirB4_Brucella_suis</i>	GDDPSVWLPVFQERRKARIASSKSTGR-----
<i>VirB4_Burkholderia_vietnamiensis</i>	GDMPKDWLPVFHERLAKRRAAQASSRLS-PAP
<i>VirB4_Aeromonas_punctata</i>	GNDPKEWLPVFHQKRKYGQ-----
<i>VirB4_Vibrio_fischeri</i>	GENPIDWIPILFLQKVREEKERKQGVNEQHHP
<i>VirB4_Anaplasma_phagocytophilum</i>	GDDPNVWLPIFYQVRKNA-----
<i>TraE_pIP02T</i>	GDNPDNWLPVFHERRKARVASSKLHMVR----
<i>TraE_Haemophilus_influenza</i>	GDNPNDWIEPFLARMKELKQLQAAAKAAKAA-
consensus	G-(D/X)-(D/X)-P-X-X-W-L/I-P/X-X-F/Y

Supplementary Figure S1. Sequence alignment of the C-terminal end of VirB4 proteins. Twenty five sequences corresponding to members belonging to diverse branches of the VirB4 family were aligned using T-Coffee and represented using Jalview. Amino acids with 100% identity are represented by dark blue boxes.



Supplementary Figure S2. Titration curve of TrwK¹⁻⁸⁰¹ ATPase activity in the absence (*open diamonds*) and in the presence (*filled circles*) of 25 μ M TrwK⁸⁰²⁻⁸²³ peptide.



Supplementary Figure S3. Model for a mechanism to regulate ATP hydrolysis in RecA protein-like ATPases. (A) Ribbon representation of the structure of F₁-ATPase in complex with its inhibitory protein, IF₁ (pdb 2V7Q). For clarity, only subunits α_{DP} (red) and β_{DP} (yellow) of the hexamer have been represented (note that the γ-subunit is also missing in this representation). IF₁ protein is depicted in green (residues 8-41), at the interface between the α- and β-subunits. (B) Ribbon representation of the modeled structure of TrwK (cyan), superimposed on the structure of TrwB (salmon, pdb 1E9R). For clarity again, only two subunits of the hexamers have been depicted. In the absence of structural data, the three α-helices at the C-terminal domain of TrwK (56 residues), have been modeled (dark blue) so the last two bind at the interface between two subunits of the hexamer, blocking the catalytic mechanism. The mechanism of inhibition could be similar to that of IF₁ –ATPase.

Structure representations have been generated with Chimera program.

Regulation of the Type IV Secretion ATPase TrwD by Magnesium

IMPLICATIONS FOR CATALYTIC MECHANISM OF THE SECRETION ATPase SUPERFAMILY^{*[5]}

Received for publication, March 2, 2012 Published, JBC Papers in Press, March 30, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.357905

Jorge Ripoll-Rozada⁺¹, Alejandro Peña⁺², Susana Rivas^{§3}, Fernando Moro[§], Fernando de la Cruz[†], Elena Cabezón⁺⁴, and Ignacio Arechaga⁺⁵

From the [†]Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria (UC) e Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, IBBTEC (CSIC-UC-IDICAN), 39011 Santander and the [§]Unidad de Biofísica (CSIC-UPV/EH) y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad del País Vasco, Apartado 644, 48080 Bilbao, Spain

Background: A universal mechanism for the secretion ATPase superfamily has been proposed.

Results: Magnesium regulates the catalytic cycle of the type IV secretion ATPase TrwD.

Conclusion: Physiological magnesium concentrations maintain the enzyme at slow ATP turnover, preventing a futile ATP hydrolysis cycle.

Significance: The regulatory role of magnesium provides new insights into the catalytic mechanism of the secretion ATPase superfamily.

TrwD, the VirB11 homologue in conjugative plasmid R388, is a member of the large secretion ATPase superfamily, which includes ATPases from bacterial type II and type IV secretion systems, type IV pilus, and archaeal flagellae assembly. Based on structural studies of the VirB11 homologues in *Helicobacter pylori* and *Brucella suis* and the archaeal type II secretion ATPase GspE, a unified mechanism for the secretion ATPase superfamily has been proposed. Here, we have found that the ATP turnover of TrwD is down-regulated by physiological concentrations of magnesium. This regulation is exerted by increasing the affinity for ADP, hence delaying product release. Circular dichroism and limited proteolysis analysis indicate that magnesium induces conformational changes in the protein that promote a more rigid, but less active, form of the enzyme. The results shown here provide new insights into the catalytic mechanism of the secretion ATPase superfamily.

Type IV secretion systems (T4SSs)⁶ are used by Gram-negative bacteria to transport DNA between bacteria and protein effectors into host cells (1). T4SSs are macromolecular assemblies formed at least by 12 different proteins, named after their

homologues in *Agrobacterium tumefaciens*: VirB1–11 and VirD4 (2). Three of these proteins (VirD4, VirB4, and VirB11) are hexameric ATPases that provide the energy for substrate transport and for T4SS biogenesis (3–6). VirB11 proteins are thought to belong to a large family of AAA+ hexameric traffic ATPases, which also includes ATPases from type II secretion systems, type IV pili and archaeal flagellar biogenesis systems (7). The atomic structures of two nonconjugative VirB11 homologues, *Helicobacter pylori* HP0525 (8, 9) and *Brucella suis* VirB11 (10), revealed that these proteins form hexameric ring structures in which the N-terminal domain likely interacts with the bacterial membrane, whereas the C-terminal domain, containing a RecA-like domain, is involved in ATP hydrolysis. Although there is not a crystal structure of TrwD, which is the VirB11 homolog in plasmid R388, electron microscopy analysis of this protein revealed that it also forms hexameric ring assemblies (11).

Despite the structural information, little is known about the structure-function relationship and the biological function of the different components of T4SSs. In an effort to gain a further biological understanding of T4SSs, we have characterized the biochemical and genetic properties of the conjugative ATPases of the model plasmid R388 (3, 4, 6, 12, 13). VirB11 is thought to play a chaperone role in the traffic of effectors through T4SSs, using energy from ATP hydrolysis to assemble/disassemble type IV components for biogenesis of the secretion system and/or for substrate translocation across the membrane (14). However, this role, inferred mainly through structural and comparative genomics analysis, is not matched by biochemical evidence. Therefore, the purpose of this work is to provide biochemical evidence that supports the functional placement of VirB11 proteins among the AAA+ traffic ATPase superfamily. To this end, we developed a new purification protocol that renders pure TrwD protein with much higher ATP hydrolase rates than in any previously reported VirB11 analysis (6, 11, 15). Interestingly, we found that the ATP turnover of the enzyme is decreased in the presence of physiological concentrations of

^{*} This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN, Spain) Grant BFU2008-00806 (to E. C. and I. A.), Grant BFU2008-00995/BMC from the MCINN, Grant RD06/0008/1012 from the Instituto de Salud Carlos III, and Grant LSHM-CT-2005_019023 from the European VI Framework Program (to F. d. I. C.), and Grant BFU2010-15443 (to F. M.) from the MCINN.

^[5] This article contains supplemental text and equations and Figs. 1 and 2.

¹ Supported by a predoctoral fellowship from the University of Cantabria.

² Supported by a predoctoral fellowship from the MCINN.

³ Present address: INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441 and CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

⁴ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 34-942202033; Fax: 34-942201945; E-mail: cabezone@unican.es.

⁵ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 34-942202033; Fax: 34-942201945; E-mail: arechagai@unican.es.

⁶ The abbreviations used are: T4SS, type IV secretion system; TNP-ATP, 2'(3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate; CTD, C-terminal domain; NTD, N-terminal domain; CD, circular dichroism.

Mg²⁺. Inhibition is not coupled to ATP concentration but to an increase in the affinity for ADP, which in turn results in a delay of product release. Thermal denaturation analysis by circular dichroism spectroscopy showed that magnesium is able to induce conformational changes to the apo-, nucleotide-free form of the enzyme, resulting in a cooperative transition. Limited proteolysis with papain allowed us to discriminate a region within the C terminus of the protein that could promote the closing and aperture of the nucleotide binding pocket. Altogether, these observations could help to gain a further understanding of the catalytic mechanism of this large secretion ATPase superfamily.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning—R388 *trwD* gen was cloned by PCR using plasmid R388 as template and primers AAAATCATATGTCTACAGTCTCGAAAGC and AAAATGGATCCTAAGCATCTTGGAC (forward and reverse, respectively). The resulting 1,076-bp fragment was digested with NdeI and BamHI and inserted into the same sites of the pET3a expression vector (Novagen, Madison, WI).

Overexpression and Purification—TrwD was expressed into *Escherichia coli* C41(DE3) strain (16). Cells were isolated and solubilized as reported (4). Lysates were precipitated in a saturated ammonium sulfate solution (60% w/v) and centrifuged at 100,000 × *g* for 30 min at 4 °C. Pellets were resuspended in buffer A (20 mM Hepes/NaOH, pH 6.8, 0.1 M NaCl, 10% glycerol (w/v), 1 mM DTT, 1 mM PMSF), dialyzed, and applied to a HiTrap Q-Sepharose (5-ml) column (GE Healthcare). The flow-through was dialyzed in buffer A at pH 7.6 and applied to a Resource Q-Sepharose (6-ml) column. Protein was eluted in a linear gradient of NaCl, concentrated, and loaded onto a HiLoad 16/60 Superdex 200 column. Fractions were eluted in 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.6, 0.2 mM NaCl, 1 mM PMSF, and 5% glycerol (w/v) and stored at –80 °C.

ATP Hydrolysis Assays—ATP hydrolysis activity was measured by using the EnzCheckTM kit (Invitrogen), in a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 75 mM potassium acetate, and 10% glycerol (w/v). The reactions were started by the addition of TrwD. ATP and Mg²⁺ were added at the concentrations indicated in the text, prior to the initiation of the reaction by the addition of TrwD.

Fluorescence Measurements—Nucleotide binding to TrwD was characterized using TNP-ATP, a fluorescent analog of ATP (Molecular Probes, Inc.) (17). Fluorescence emission spectra were recorded at 21 °C using a PerkinElmer Life Sciences MPF-66 spectrofluorometer with the excitation wavelength set at 407 nm and the emission wavelength scanned from 465 to 625 nm. TNP-ATP and TrwD were added at the indicated concentrations in 20 mM Hepes (pH 7.6), 0.2 M NaCl, 5% glycerol (w/v), and 10 μM or 2 mM magnesium acetate.

Circular Dichroism Measurements—Thermal stability experiments were made in the presence or the absence of 2 mM magnesium acetate. Ellipticity was measured at 222 nm on a JASCO (Tokyo, Japan) J-810 spectropolarimeter in the temperature range 20–80 °C at a rate of 60 °C/h, using cells with a 0.1-cm path length. TrwD was added at 5 μM in 50 mM Hepes (pH 8.5), 75 mM potassium acetate, 5% glycerol (w/v) without added

magnesium. Magnesium acetate (2 mM) or MgADP (1 mM) was added to the buffer accordingly. Following the acquisition of the measurements at 222 nm, the signal was subtracted from the buffer, and the ellipticity θ (millidegrees) was converted to a residue molar ellipticity $[\theta]$ (degree cm² dmol^{–1}).

Electron Microscopy and Image Analysis—Aliquots (5 μl) of TrwD in the presence of 2 mM magnesium and in its absence were applied to glow-discharged carbon-coated grids and stained for 1 min with 2% uranyl acetate. Images were recorded on Kodak SO163 films at ×60,000 nominal magnification in a JEOL 1200EX-II electron microscope operated at 100 KV. Micrographs were digitized in a Zeiss SCAI scanner with a final sampling rate of 2.33 Å/pixel. Individual particles of TrwD were selected and normalized using the XMIPP image processing software (18). Alignment and classification were performed by maximum likelihood multireference refinement methods.

Papain Proteolysis—Papain digestion was performed at 25 °C in 20 mM Tris (pH 8.5), 75 mM potassium acetate. Papain stocks were dissolved in the same buffer and activated by the addition of 50 mM β-mercaptoethanol (37 °C, 30 min) just before use. TrwD (25 μM) was incubated for 15 min at 25 °C with corresponding concentrations of nucleotide and magnesium according to reaction. Proteolysis was initiated by the addition of papain from the activated stocks at 1:100 papain:TrwD molar ratios. The reaction was stopped after 90 min by the addition of 100 μM E-64 inhibitor (Sigma). Proteolysis products were analyzed by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gels) followed by staining with Coomassie Brilliant Blue. Fragments were transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore), and N-terminal sequencing determination of proteolytic products was performed by using a Procise 494 automated sequencer (Applied Biosystems).

Molecular Modeling—An atomic model of TrwD was generated by molecular threading using the protein homology and recognition engine Phyre (19) taking the atomic coordinates of *B. suis* VirB11 (2gza.pdb) (10) as template. Based on the hexameric structure of VirB11, a model of TrwD hexamer was built using the UCSF Chimera package (20).

RESULTS

TrwD ATPase Activity Is Regulated by Magnesium—ATPase activity of TrwD was previously reported using a GST-TrwD fusion protein (6). However, because the reported ATP hydrolysis rates were low (4.5 nmol ATP min^{–1} mg^{–1}), we developed a new purification protocol for wild type TrwD. This new protocol rendered a high yield of pure and homogeneous protein (supplemental Fig. 1). The steady-state kinetic parameters of ATP turnover by TrwD in the presence of 2 mM Mg²⁺ were 76 nmol min^{–1} mg^{–1} (*V*_{max}) and 9.6 μM (*K*_{m(app)}^[ATP]) (Fig. 1A). Surprisingly, at low Mg²⁺ concentration (10 μM), the ATP turnover was 3-fold higher (216 nmol min^{–1} mg^{–1}) than that at 2 mM Mg²⁺ (Fig. 1B), with a significant increase in the *K*_{m(app)}^[ATP] value (45 μM). As expected, the addition of EDTA resulted in a complete inhibition of TrwD ATPase activity.

Further analysis of the effect of Mg²⁺ on TrwD ATP hydrolysis revealed that inhibition by Mg²⁺ was not affected by ATP concentration (Fig. 2A). The calculated *K*_{i(app)}^[Mg²⁺] values were 42 and 35 μM for 1 mM and 100 μM ATP, respectively.

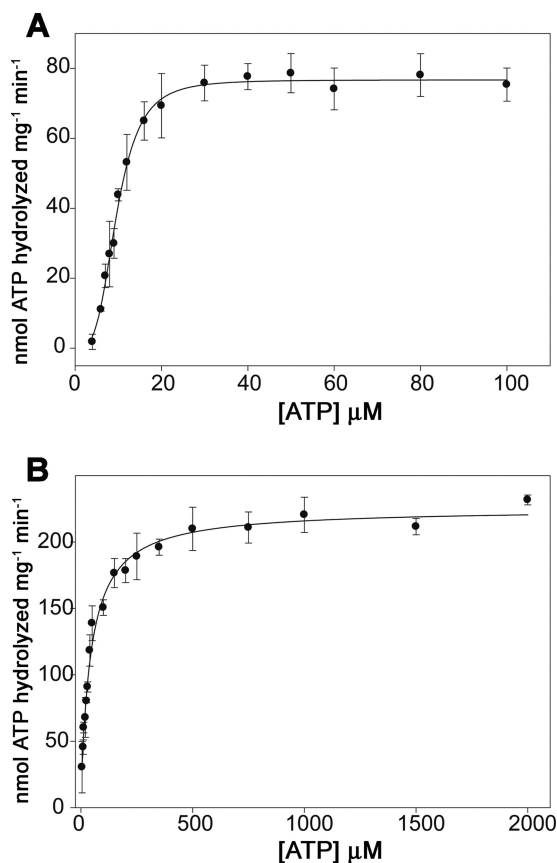


FIGURE 1. **Effect of Mg^{2+} on TrwD ATPase turnover.** A and B, ATPase activity of TrwD (1 μM as monomer) was measured at increasing concentrations of ATP in the presence of 2 mM Mg^{2+} (A) or 10 μM Mg^{2+} (B). Data were fitted to the Hill equation (Equation 1 in the supplemental material). Error bars in both panels indicate S.D.

Considering the affinity of Mg^{2+} for ATP ($K_d^{[MgATP]} = 20 \mu M$) (21), it would be expected that all Mg^{2+} was bound to the nucleotide at 1 mM ATP. However, this result indicates that Mg^{2+} binds the protein with high affinity, which suggests that free Mg^{2+} , rather than $MgATP$, is responsible of the observed inhibition. Evidence for tight binding of Mg^{2+} or Mn^{2+} at or near catalytic sites in the absence of bound nucleotides has been previously reported for other enzymes (22), yet no effect of Mn^{2+} and Zn^{2+} on TrwD ATPase activity was observed (data not shown).

Inhibition of TrwD by ADP Is Modulated by Magnesium—Inhibition of ATP turnover by ADP was studied at low (10 μM) and high (2 mM) Mg^{2+} concentrations. As expected, under both conditions, ADP exhibited a clear inhibitory effect (Fig. 2B). However, at the same concentration of ATP (100 μM), a 5-fold decrease in the $K_{i(app)}^{[ADP]}$ value was observed in the presence of 2 mM Mg^{2+} . Moreover, the affinity of TrwD for ADP, $K_{d(app)}^{[ADP]}$, calculated at different concentrations of ATP and Mg^{2+} , revealed that in the presence of 2 mM Mg^{2+} , the affinity for ADP was increased by ~ 20 -fold. Therefore, it is likely that Mg^{2+} inhibition is caused by stabilization of the $MgADP$ inhibited state.

Binding Affinity of TrwD for TNP-ATP Is Not Affected by Magnesium—Nucleotide binding to TrwD was characterized using TNP-ATP (Fig. 3), a fluorescent analog of ATP (17),

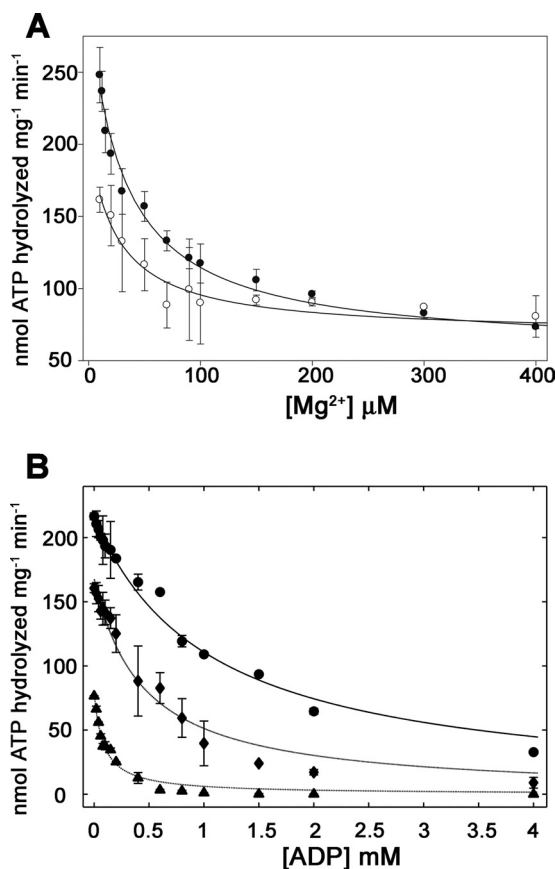


FIGURE 2. **ATP turnover inhibition by Mg^{2+} and ADP.** A and B, the ATPase activity of TrwD (1.9 μM as a monomer) was measured over a range of Mg^{2+} (A) and ADP (B) concentrations. A, 1 mM ATP (filled circles) and 100 μM ATP (open circles). B, 1 mM ATP and 10 μM Mg^{2+} (circles), 100 μM ATP and 10 μM Mg^{2+} (diamonds), and 100 μM ATP and 2 mM Mg^{2+} (triangles). Data in A and B were fitted to Equations 2 and 3, respectively (see supplemental material) to determine values for the apparent $K_{i(app)}^{[Mg^{2+}]}$ in A and the $K_d^{[ADP]}$ and $K_{i(app)}^{[ADP]}$ in B. Error bars in both panels indicate S.D.

widely used to characterize binding interactions of ATP with numerous nucleotide-binding proteins (23–25). TNP-ATP is not hydrolyzable by TrwD under the same conditions used for ATP (data not shown). Binding of TNP-ATP to TrwD (5 μM) at different Mg^{2+} concentrations (Fig. 3B) revealed that the affinity of TNP-ATP for TrwD was not significantly affected, the $K_d^{TNP-ATP}$ values being 11 and 9.7 μM in the presence of 2 mM Mg^{2+} and in the absence of added Mg^{2+} , respectively. Interestingly, the addition of Mg^{2+} not only resulted in a reduction of fluorescence emission intensity but also in a redshift of the wavelength of maximal emission (Fig. 3A), suggesting that binding of free Mg^{2+} could induce a conformational change in TrwD.

Magnesium Promotes a Conformational Change in TrwD, Reflected in the Thermal Unfolding Profiles Measured by Circular Dichroism—To investigate whether magnesium was exerting its inhibitory effect by inducing a conformational change in TrwD, thermal denaturation curves were obtained by measuring protein ellipticity at 222 nm at increasing temperatures. The thermal unfolding profiles of the protein in the absence or presence of magnesium were significantly different (Fig. 4). In the absence of 2 mM Mg^{2+} , a broad transition between 45 and 75 $^{\circ}C$ was observed, reflecting denaturation process with low

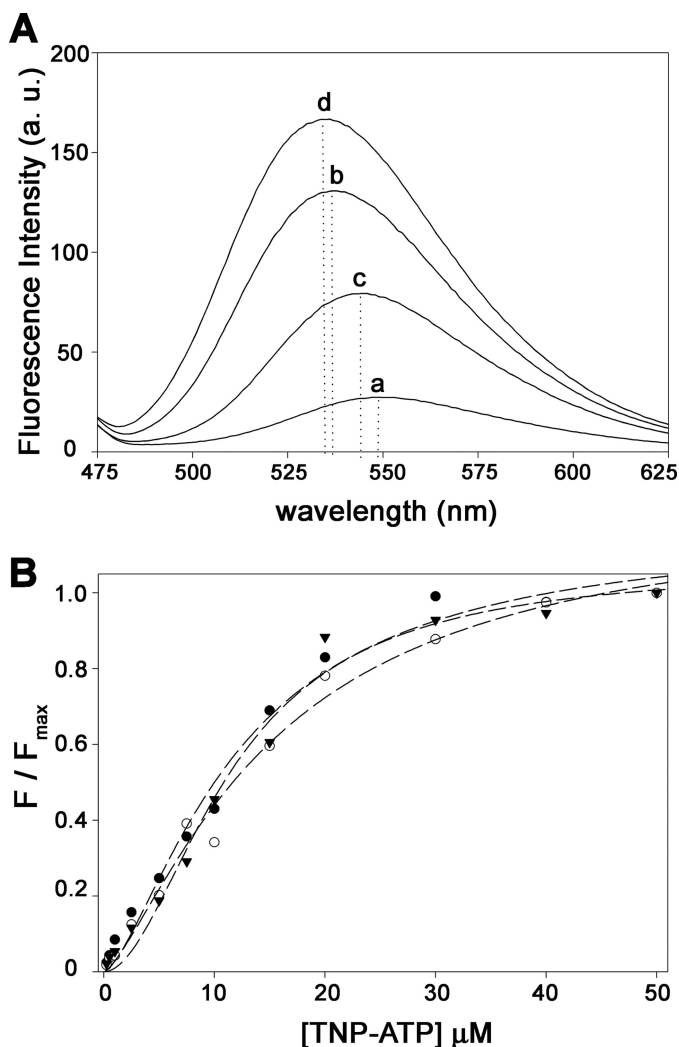


FIGURE 3. Effect of Mg^{2+} on TNP-ATP binding to TrwD. *A*, fluorescent emission spectra of TNP-ATP ($10\ \mu M$) in the absence (spectrum *a*) and in the presence of $5\ \mu M$ TrwD (spectrum *b*). Consecutive addition of Mg^{2+} ($2\ mM$) and EDTA ($10\ mM$) is shown in spectra *c* and *d*, respectively. Dotted lines indicate wavelength of maximal emission in each case. *a. u.*, arbitrary units. *B*, titration curve of TNP-ATP binding to $5\ \mu M$ TrwD in the absence of Mg^{2+} (filled triangles) and in the presence of $10\ \mu M$ (open circles) and $2\ mM\ Mg^{2+}$ (filled circles). Titration curves at each magnesium concentrations were normalized to the maximum value of fluorescence emission intensity for each case. ($\lambda_{ex} = 407\ nm$).

cooperativity. In contrast, binding of magnesium resulted in a highly cooperative denaturation transition centered at $52\ ^\circ C$. In the presence of MgADP, a stabilization of the protein is observed, being the denaturation transition cooperative and centered at $58\ ^\circ C$. These results suggest that both Mg^{2+} and MgADP induce a conformational change in TrwD that results in a lower ATP turnover.

Electron Microscopy—Image analysis of TrwD by electron microscopy revealed that TrwD is able to form hexameric ring structures in the absence of added magnesium (Fig. 5*A*). A similar proportion of ring structures was also visible in the presence of magnesium (Fig. 5*B*) and magnesium and nucleotides (data not shown), which indicated that the conformational change induced by magnesium was not affecting the overall oligomeric state of the protein. Interestingly, despite the low resolution, a close inspection of the EM images shows that the inner diam-

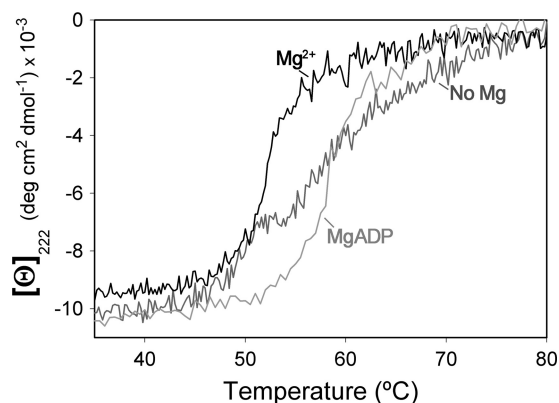


FIGURE 4. Thermal denaturation of TrwD followed by CD. Temperature dependence of the molar ellipticity at $222\ nm$ of a sample containing $5\ \mu M$ TrwD in $50\ mM$ Hepes buffer (pH 8.5) without added magnesium (dark gray) and with $2\ mM$ magnesium acetate (black) or $1\ mM$ MgADP (gray), heated from 20 to $80\ ^\circ C$ in a 0.1-cm path length cuvette at a rate of $60\ ^\circ C/h$, *deg*, degree.

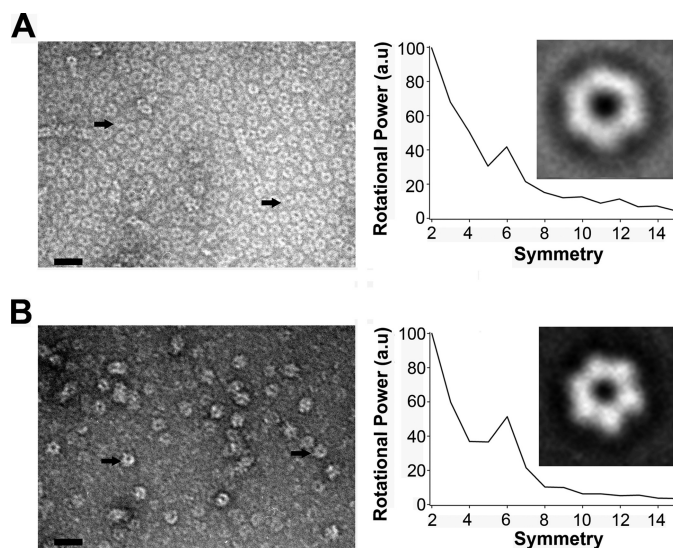


FIGURE 5. Electron microscopy of TrwD oligomers. *A* and *B*, protein in $50\ mM$ Hepes buffer (pH 8.5) without added Mg^{2+} (*A*) and with $2\ mM\ Mg^{2+}$ (*B*) was stained with uranyl acetate and analyzed by electron microscopy (scale bar, $35\ nm$). *Right panel*, rotational power spectra of class averages (106 and 58 particles in *A* and *B*, respectively) obtained upon self-organizing neuronal maps classification. *a. u.*, arbitrary units.

ter of the ring is smaller in the presence of magnesium than in its absence, suggesting that magnesium induces a closed conformation of the ring.

Partial Proteolysis of TrwD—The unspecific protease papain is useful for delimiting structural domains in proteins because it presents a low activity on stable secondary and tertiary structures (26). Therefore, we decided to investigate whether magnesium and/or nucleotides stabilized TrwD conformation by its susceptibility to papain digestion. Fig. 6 shows that in the presence of MgADP, TrwD was protected of papain proteolysis. In its absence, papain digestion resulted in two main bands with molecular masses of roughly 25 and $11\ kDa$, respectively. These bands were transferred to an Immobilon-P membrane and subjected to N-terminal sequencing determination. The 25-kDa band with an N terminus sequence $^{12}SGNRV^{16}$ corresponded to TrwD protein lacking the first 11 amino acid residues (probably by unspecific proteolytic degradation). Running just below

Regulatory Mechanism by Magnesium of TrwD ATP Turnover

this 25-kDa band, another fragment with a N-terminal sequence ¹⁸KDQAV²² could be identified. The 11-kDa band at the bottom of the gel has a N-terminal sequence ²⁵⁷MRQS²⁶⁰, corresponding to the C-terminal end of the protein. This proteolytic cleavage site is located in a loop connecting the Walker A and Walker B domains (Fig. 6 and supplemental Fig. 2). On the hexameric model of TrwD (Fig. 7), this 11-kDa fragment corresponds to a region of the protein facing the interior of the ring. Homologue sequences of this C-terminal region on HP0525 and VirB11 crystal structures show similar disposition within the hexameric rings (Fig. 7). Binding of ADP and magnesium to the protein induces a reorganization of the C-terminal domain (CTD) that impedes papain access to this protein region. This observation is in good agreement with the cooperativity and stabilization of the protein observed by CD. In the absence of nucleotides, and in the presence of magnesium, a

weak signal for a band of ~14 kDa could be observed (marked in Fig. 6 with *). N-terminal sequencing of this band, which was not present in any of the other conditions, resulted in a sequence consistent with a fragment of the protein starting at ²¹⁰LIEK²¹³, a few residues downstream of the Walker A motif (Lys²⁰³). Papain shows very low activity at this site, but the experiment clearly reflects that it is not accessible in the absence of magnesium. This result is in accordance with the CD experiments in which Mg²⁺ is able to induce conformational changes in the absence of nucleotides.

DISCUSSION

Based on the crystal structures of the *H. pylori* and *B. suis* VirB11 homologues from type IV secretion systems (HP0525 and VirB11, respectively) (8–10) and type II secretion GspE protein of *Archaeoglobus fulgidus* (afGspE) (27), an universal catalytic mechanism for the secretion ATPase superfamily has been proposed (27). However, biochemical experiments to support this model were still lacking. In this work, we provide new insights into the mode of action of this protein family, using TrwD, a VirB11 homologue of the conjugative plasmid R388, as a working model.

The kinetic parameters of ATP hydrolysis at steady-state rates reveal that physiological concentrations of Mg²⁺ (~1 mM in bacterial cells (28)) down-regulate the ATP turnover of the enzyme by increasing the affinity for ADP. Inhibition by magnesium has been reported for a large variety of ATPases (25, 29–32). Specially relevant to this work are the reports of ATP hydrolysis inhibition by Mg²⁺ of SecA (33, 34), a ubiquitous traffic ATPase. Binding of Mg²⁺ to an allosteric site has been proposed to be a key regulatory step of the catalytic cycle of SecA. Gold *et al.* (33) reached this conclusion based on the fact that inhibition was not coupled to ATP concentration as the inhibitory effect of Mg²⁺ remained when ATP was more than 500 times in excess. Likewise, here we show that Mg²⁺ inhibition of TrwD ATPase activity is not coupled to ATP concentration. Therefore, our data also suggest the existence of a binding site for free Mg²⁺ different from the nucleotide binding site. However, alternative models that do not require an allosteric binding site could also be compatible with the data. A mechanism in which Mg²⁺ stabilizes the MgADP form of the enzyme, slowing down turnover, concomitant with a decrease in *K_m*, could also be envisaged.

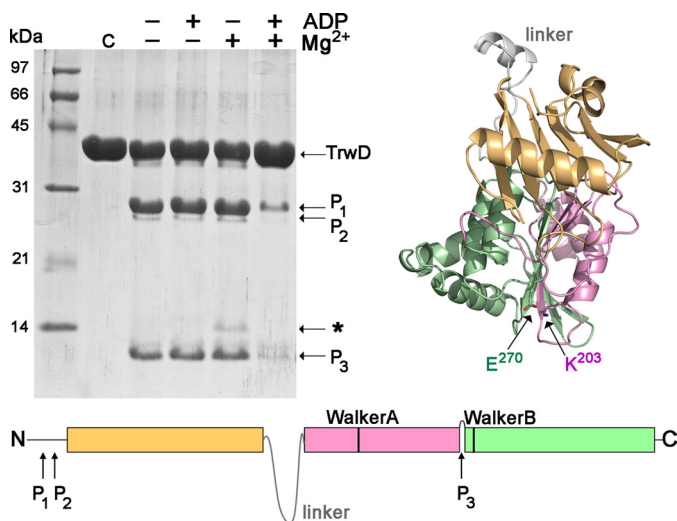


FIGURE 6. Papain partial proteolysis of TrwD. Upper left panel, Coomassie Brilliant Blue-stained SDS-PAGE of papain digestion products of TrwD (25 μM) in the absence or presence of nucleotides and Mg²⁺. Papain:TrwD molar ratio was 1:100, and digestion was performed for 90 min at 25 °C. Bottom panel, papain digestion sites that give rise to P1, P2, and P3 fragments, identified by N-terminal sequencing, are indicated at their corresponding positions. An additional fragment could be appreciated in the condition with only Mg²⁺ and no nucleotides (marked with *). This peptide, with low signal, started 48 residues upstream of P3. Upper right panel, graphic representation of a TrwD monomer (modeled as explained under "Experimental Procedures"). The P3 cleavage site separates the last 96 residues of the protein, containing the Walker B motif (Glu²⁷⁰) from the rest of the CTD, which contains the Walker A motif (Lys²⁰³).

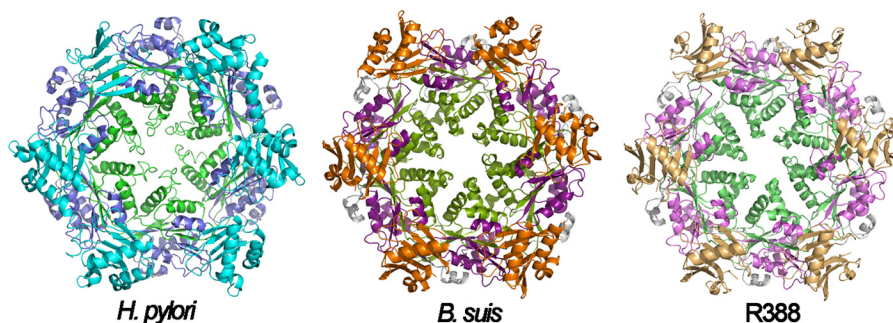


FIGURE 7. Hexameric structures of VirB11 proteins. The hexameric structures of *H. pylori* HP0525 (1nlz.pdb), *B. suis* VirB11 (2gza.pdb), and R388 TrwD (see "Experimental Procedures") are shown. Each monomer consists of an NTD (cyan, orange, and wheat, respectively) and a CTD (blue, magenta, and pink, respectively), connected by a flexible linker (gray). The region at the C-terminal end identified by papain proteolysis in TrwD (green) and the equivalent positions in *B. suis* VirB11 (olive) and HP0525 (lime) are facing the interior of the hexameric rings.

The effect of Mg^{2+} and nucleotides on TrwD was further investigated. The affinity of the enzyme for TNP-ATP, a fluorescent analog of ATP, was not affected by the presence of Mg^{2+} in the buffer. However, the wavelength shift and the variations in fluorescence intensity suggested that Mg^{2+} could be inducing some kind of conformational change in the enzyme. To confirm this, the effect of Mg^{2+} and nucleotides on the thermal stability of the enzyme was tested by circular dichroism spectroscopy. We found an increase in the cooperativity of TrwD thermal denaturation profile in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} . These results demonstrate that free Mg^{2+} is able to induce conformational changes on the protein in the absence of added nucleotides. The addition of nucleotides promotes a stabilization of the enzyme, with an increase of 6 °C in the T_m value. This is compatible with a lower exposure of the C-terminal domain of the protein, which contains the nucleotide binding site, as observed by papain proteolysis.

VirB11 proteins share a common domain organization consisting of two domains, an N-terminal domain (NTD) and an ATPase catalytic CTD, connected by a flexible linker. Comparison of the crystal structures of HP0525 and VirB11 revealed a large domain swap of the NTD pivoting about the linker region over the CTD that does not affect the overall hexameric assembly. Hence, a nucleotide-dependent domain swap has been proposed to be part of the catalytic mechanism of the enzyme (10). Here, we have found a region within the CTD suitable to partial proteolysis in the absence of nucleotides and Mg^{2+} . The obtained fragment corresponds to the last 96 residues of the protein. This region faces the internal channel of the hexameric ring (Fig. 7). Because this band is not observed in the presence of Mg^{2+} and nucleotides, it is clear that the binding induces a conformational change in the C terminus of the protein that promotes a closed conformation of the enzyme, leaving the proteolysis site inaccessible. This is a novel finding that has not been reflected in any of the published models, providing new insights into the regulatory mechanism of the secretion ATPase superfamily, especially regarding the role of Mg^{2+} in the catalytic cycle.

In summary, our data show the following. (i) At physiological concentrations of Mg^{2+} , similar to the free Mg^{2+} found in bacteria (28), the ATP turnover and the K_m of the reaction decrease, and (ii) the affinity for ADP increases dramatically; (iii) Mg^{2+} is able to induce conformational changes in the protein in the absence of nucleotides; (iv) in the presence of Mg^{2+} and nucleotides, the protein undergoes further conformational changes that make it more stable and less sensitive to papain degradation; and (v) the C-terminal end of the protein, which faces the inner channel in the ring, is a flexible domain that moves upon binding of Mg^{2+} and nucleotides.

In view of these results and the structural studies of HP0525 (8, 9), VirB11 (10), GspE (27), and other proteins of this family (35, 36), we propose the model shown in Fig. 8. According to this model, the enzyme in the apo state would have high flexibility between the NTD and CTD around its linker (8, 27). At low Mg^{2+} concentrations, lower than the K_d of Mg^{2+} for ATP ($K_d^{[MgATP]} = 20 \mu M$ (21)), the enzyme would bind ATP and Mg^{2+} . Upon ATP hydrolysis and ADP release, the enzyme would return to its initial state. However, at physiological con-

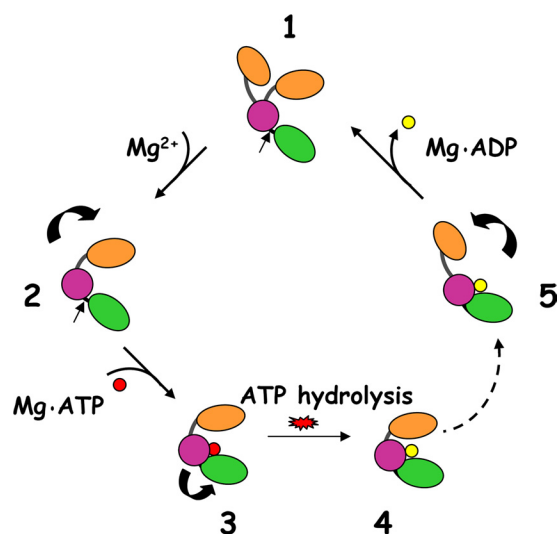


FIGURE 8. Model of the regulatory mechanism by magnesium of VirB11 ATPases. A proposed catalytic mechanism for VirB11 proteins, adapted from Ref. 8 and extended to the secretion ATPase superfamily (27), taking into consideration the effect of Mg^{2+} , is shown. *Step 1*, the nucleotide-free apo form would be flexible with the NTD (orange) and CTD (magenta/green) in equilibrium between an open and closed conformation. The papain site limiting the C terminus end (green) is indicated by an arrow. *Step 2*, high Mg^{2+} concentrations (similar to the free Mg^{2+} found in bacteria) would induce a conformational change that would be followed by MgATP binding (*Step 3*), which, in turn, would promote a conformational change in the CTD (the papain site is no longer accessible). After ATP hydrolysis, an inhibited MgADP state (*Step 4*) would be stabilized, resulting in an ATP turnover decrease. Upon specific signal (for instance, substrate binding or release), the MgADP-inhibited state would be unlocked (*Step 5*), and hence, the cycle could resume with ADP release, returning to the initial apo form.

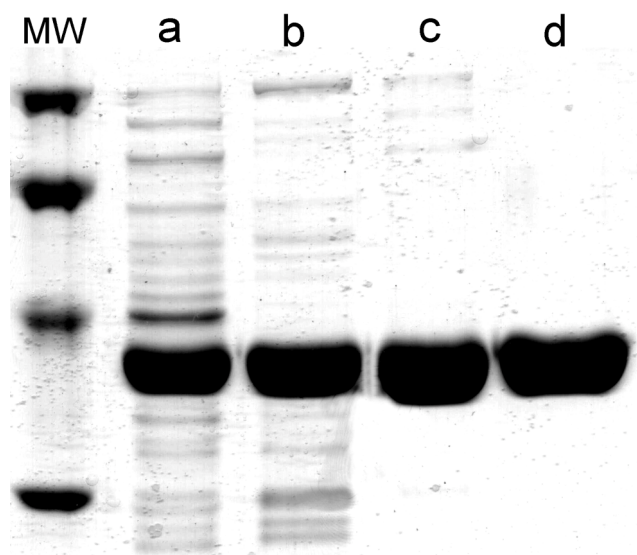
centrations of Mg^{2+} , the enzyme would be in a closed conformation that would impede ADP release, thus promoting an MgADP-inhibited state of the enzyme. This would imply that under physiological conditions, the enzyme would be inhibited, and only upon a specific signal (for example, substrate binding/release), ADP would be released, thus completing the ATP cycle.

Acknowledgments—We thank S. Zunzunegui for excellent technical assistance, Dr. Arturo Muga for helpful discussion and assistance with the stability studies, and Dr. J. Martín-Benito for help with the electron microscopy.

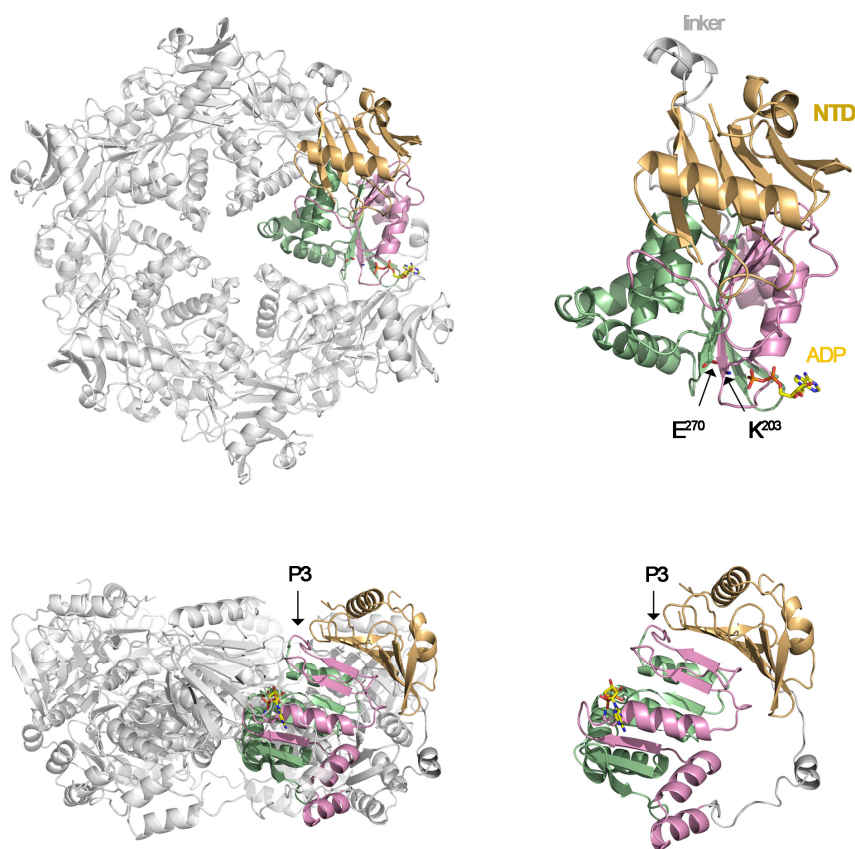
REFERENCES

1. Cascales, E., and Christie, P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 137–149
2. 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
3. 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
4. Arechaga, I., Peña, A., Zunzunegui, S., del Carmen Fernández-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
5. Peña, 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
6. Rivas, S., Bolland, S., Cabezon, E., Goñi, 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
7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. Krause, S., Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F., and Lanka, E. (2000) 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
 12. Machón, C., Rivas, S., Albert, A., Goñi, 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
 13. 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
 14. Yeo, H. J., and Waksman, G. (2004) Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J. Bacteriol.* **186**, 1919–1926
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. Scheres, S. H., Núñez-Ramírez, 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
 19. Kelley, L. A., and Sternberg, M. J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–371
 20. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
 21. Pecoraro, V. L., Hermes, J. D., and Cleland, W. W. (1984) Stability constants of Mg^{2+} and Cd^{2+} complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of MgATP and MgADP. *Biochemistry* **23**, 5262–5271
 22. Buy, C., Girault, G., and Zimmermann, J. L. (1996) Metal binding sites of H^{+} -ATPase from chloroplast and *Bacillus* PS3 studied by EPR and pulsed EPR spectroscopy of bound manganese(II). *Biochemistry* **35**, 9880–9891
 23. Weber, J., and Senior, A. E. (1996) Binding and hydrolysis of TNP-ATP by *Escherichia coli* F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**, 3474–3477
 24. 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
 25. Jezewska, M. J., Lucius, A. L., and Bujalowski, W. (2005) Binding of six nucleotide cofactors to the hexameric helicase RepA protein of plasmid RSF1010. 1. Direct evidence of cooperative interactions between the nucleotide-binding sites of a hexameric helicase. *Biochemistry* **44**, 3865–3876
 26. 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
 27. 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
 28. Froschauer, E. M., Kolisek, M., Dieterich, F., Schweigel, M., and Schweyen, R. J. (2004) Fluorescence measurements of free $[Mg^{2+}]$ by use of mag-fura 2 in *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**, 49–55
 29. Molnár, M., and Vas, M. (1993) Mg^{2+} affects the binding of ADP but not ATP to 3-phosphoglycerate kinase: correlation between equilibrium dialysis binding and enzyme kinetic data. *Biochem. J.* **293**, 595–599
 30. Berger, G., Girault, G., Galmiche, J. M., and Pezennec, S. (1994) The role of Mg^{2+} in the hydrolytic activity of the isolated chloroplast ATPase: study by high-performance liquid chromatography. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 335–346
 31. Berger, G., and Girault, G. (2001) Comparison of different cations (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) on the hydrolytic activity of chloroplast ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 93–98
 32. Schobert, B. (1998) Do ATP^{4-} and Mg^{2+} bind stepwise to the F_1 -ATPase of *Halobacterium saccharovorum*? *Eur. J. Biochem.* **254**, 363–370
 33. Gold, V. A., Robson, A., Clarke, A. R., and Collinson, I. (2007) Allosteric regulation of SecA: magnesium-mediated control of conformation and activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 17424–17432
 34. Robson, A., Gold, V. A., Hodson, S., Clarke, A. R., and Collinson, I. (2009) Energy transduction in protein transport and the ATP hydrolytic cycle of SecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5111–5116
 35. 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
 36. Satyshur, K. A., Worzalla, G. A., Meyer, L. S., Heiniger, E. K., Aukema, K. G., Mistic, A. M., and Forest, K. T. (2007) Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit co-operation drive motility. *Structure* **15**, 363–376



Supplementary Figure 1. Purification of TrwD. Lysates from *Escherichia coli* C41(DE3) cells over-producing TrwD (lane a) were precipitated in ammonium sulphate. Resuspended pellets were extensively dialyzed and passed through a Hi-Trap Q-Sepharose column (lane b) followed by a Resource-Q-sepharose column (lane c). Final samples were obtained after a S200 superdex gel filtration chromatography (lane d).



Supplementary Figure2. Location of the papain cleavage site on TrwD model. *Left Upper panel*, hexameric model of TrwD with one of the monomers coloured as Fig.6. The position of ADP was assigned by aligning the structures of HP0525 in the presence of ADP (1g6o.pdb) and TrwD model. As in the case of *B. suis* VirB11 (Hare et al., 2006) the nucleotide is positioned at the interface between two adjacent monomers. *Right Upper panel*, TrwD monomer, showing cleavage site P3 (Fig. 6) in a loop between Walker A (K203) and Walker B (E270) motifs. *Bottom panel*, side view of the hexameric ring and a monomer. The papain cleavage site P3 is indicated with an arrow

Appendix

Data fitting and kinetic parameter determinations

Analysis of ATP turnover: the kinetic parameters of ATP hydrolysis were obtained after fitting data in Figure 1 to the Hill equation,

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

where nH is 0,9 and 3,5 for 10 μ M and 2mM Mg^{2+} respectively; $v_{\max}$ = speed limit of the reaction when all the enzyme is saturated by the substrate; $K_{0.5}$ = substrate concentration which reaches half of the $V_{\max}$, ie, 50% saturation of the enzyme by the substrate. This term is expressed in the text as $K_{m(app)}$; nH = Hill number.

Magnesium inhibition: To obtain the apparent inhibition constant, $K_{i(app)}$, of ATP hydrolysis by Mg^{2+} , values in Figure 2A were fitted to the following hyperbolic inhibition function,

$$v = v_0 - \frac{V_{\max}^* \cdot [Mg^{2+}]}{K_{iapp} + [Mg^{2+}]} \quad (2)$$

where v = measured velocity; v_0 = velocity in the absence of Mg^{2+} ; $v_{\max}^*$ = minimal value of velocity in the presence of Mg^{2+} ; $K_{i(app)}$ = apparent inhibition constant for inhibitor binding.

ADP inhibition: $K_{i(app)}$ values for ADP were obtained upon fitting data in Figure 2B to this equation:

$$v = \frac{X}{K_{iapp} + [ADP]} \quad (3)$$

$$\text{where } K_{iapp} = K_i \cdot \left[1 + \frac{[S]}{K_{0.5}} \right] ; \quad X = V_{\max}^* \cdot K_i \cdot \frac{[S]}{K_{0.5}}$$

The dissociation constant for ADP, $K_{d[ADP]}$ was calculated by fitting the data to the equation:

$$v = \frac{[ATP] \cdot K_c}{K_{0.5}^{[ATP]} \cdot \left[1 + \frac{[ADP]}{K_{d[ADP]}} \right] + [ATP]} \quad (4)$$

The Hexameric Structure of a Conjugative VirB4 Protein ATPase Provides New Insights for a Functional and Phylogenetic Relationship with DNA Translocases*

Received for publication, August 27, 2012, and in revised form, October 1, 2012. Published, JBC Papers in Press, October 3, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.413849

Alejandro Peña[‡], Inmaculada Matilla[‡], Jaime Martín-Benito[§], José M. Valpuesta[§], José L. Carrascosa[§], Fernando de la Cruz[‡], Elena Cabezón^{‡1}, and Ignacio Arechaga^{‡2}

From the [‡]Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), UC-CSIC-SODERCAN, Santander, Spain and the [§]Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), 28049 Madrid, Spain

Background: VirB4 ATPases are involved in protein transport in T4SS.

Results: The structure of the conjugative VirB4 homologue TrwK has been determined by single-particle electron microscopy.

Conclusion: TrwK forms hexamers and binds preferentially G4-quadruplex DNA as the coupling protein TrwB.

Significance: The results provide structural and biochemical evidence for a common evolutionary scenario between DNA and protein translocases.

VirB4 proteins are ATPases essential for pilus biogenesis and protein transport in type IV secretion systems. These proteins contain a motor domain that shares structural similarities with the motor domains of DNA translocases, such as the VirD4/TrwB conjugative coupling proteins and the chromosome segregation pump FtsK. Here, we report the three-dimensional structure of full-length TrwK, the VirB4 homologue in the conjugative plasmid R388, determined by single-particle electron microscopy. The structure consists of a hexameric double ring with a barrel-shaped structure. The C-terminal half of VirB4 proteins shares a striking structural similarity with the DNA translocase TrwB. Docking the atomic coordinates of the crystal structures of TrwB and FtsK into the EM map revealed a better fit for FtsK. Interestingly, we have found that like TrwB, TrwK is able to bind DNA with a higher affinity for G4 quadruplex structures than for single-stranded DNA. Furthermore, TrwK exerts a dominant negative effect on the ATPase activity of TrwB, which reflects an interaction between the two proteins. Our studies provide new insights into the structure-function relationship and the evolution of these DNA and protein translocases.

Type IV secretion systems (T4SS)³ mediate the exchange of genetic material in bacterial conjugation and the delivery of virulence effectors into eukaryotic cells (1). Conjugative T4SS are essential for the widespread dissemination of antibiotic resistance genes among pathogenic bacteria (2). T4SS consist of large macromolecular assemblies formed by 11 different proteins (VirB1 to VirB11 in the nomenclature of *Agrobacterium tumefaciens*) (3) and a coupling protein, VirD4, involved in ssDNA transport among cells. Three of these proteins, VirB4, VirB11, and VirD4, are ATPases that provide the energy for pilus assembly and DNA/protein transport (4–8).

VirB4 proteins are the most conserved component of T4S systems (9), and they are essential for plasmid transfer and virulence (10). The proposed biological function of VirB4 proteins is to mediate pilin dislocation from the inner membrane (11), thus promoting pilus assembly, but they have also been proposed to play a direct role in the transfer of substrates to the membrane translocase complex (12).

VirB4 proteins are large proteins with two clear distinct domains: a well conserved C-terminal domain (CTD), containing the Walker A and Walker B motifs, and a less conserved N-terminal domain (NTD) which, depending on the species, could contain predicted transmembrane spans (7, 13). On the basis of computer predictions, molecular models of the CTD have been proposed (14, 15). These models have been built using the structure of TrwB, the coupling protein of conjugative R388, as a template. TrwB is a DNA-dependent hexameric ATPase (4, 16) that couples the relaxosome processing machinery toward the translocating complex (17). TrwB structure (18) is related to other hexameric helicases, F₁-ATPases and FtsK, a DNA translocase involved in bacterial division. Comparative genomic analysis revealed that VirB4, VirD4/TrwB, and FtsK/SpoIIIE proteins are closely related (19). Despite the variability in size and biological functions, all of them contain a motor

* This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain) Grants BFU2011-22874 (to E. C. and I. A.), BFU2011-29038 (to J. L. C.), BFU2010-15703 (to J. M. V.), BFU2008-00995/BMC, and FP72009-248919 from the European VII Framework Program (to F. C.). This work was also supported by a predoctoral fellowship from the MINECO (to A. P.).

The map reported in this paper has been deposited in the Electron Microscopy Data Bank (accession no. EM-5505).

¹ To whom correspondence may be addressed: Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain. Tel.: 34-942202033; Fax: 34-942201945; E-mail: cabezone@unican.es.

² To whom correspondence may be addressed: Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain. Tel.: 34-942202033; Fax: 34-942201945; E-mail: arechagai@unican.es.

³ The abbreviations used are: T4SS, type IV secretion system; ssDNA, single-stranded DNA; CTD, C-terminal domain; NTD, N-terminal domain; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; 3D, three-dimensional.

domain that seems to have evolved from a common evolutionary ancestor (20). This ring-shaped motor domain converts the energy of ATP hydrolysis into mechanical work, facilitating the wide variety of functions carried out by this family of proteins.

The structure of the VirB4 CTD from *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* has been obtained recently (21). The structure is very similar to the computer-generated models on the basis of TrwB (14, 15). A negative stain model of a complex formed by a VirB4 monomer bound to the core subunits VirB7/VirB9/VirB10 of plasmid pKM101 has also been reported (21). However, in these structures, the VirB4 NTD cannot be distinguished clearly. The structure of the VirB4 CTD has been obtained in its monomeric form, but dimeric and hexameric forms of the protein have also been reported (7, 8, 22). Here, we have obtained the first structure of full-length TrwK, the VirB4 homologue in conjugative R388, by single-molecule electron microscopy. The structure consists of a hexameric double ring forming a barrel-shaped structure. The two hexameric rings are different in size, corresponding to the N-terminal and C-terminal ends of the protein, as determined by gold labeling electron microscopy. Docking the crystal structures of TrwB and FtsK on the EM map revealed a better fit for FtsK.

TrwB and FtsK both act as DNA pumps. We wondered whether the structural similarity with VirB4 proteins would be accompanied by similar biochemical functions. We were intrigued by recent findings showing the ability of two VirB4 homologues to bind DNA (8, 23). In this work, we show that TrwK is also able to bind DNA, but, even more surprisingly, we found that the affinity of TrwK for G4 quadruplex DNA was much higher than for single-stranded DNA, similar to what has been observed for TrwB (23). Furthermore, we have found that the DNA-dependent activity by TrwB is inhibited by TrwK, which demonstrates a direct interaction between these proteins. These results are in accordance with recent studies on PrgJ, the VirB4 homologue in *Enterococcus faecalis* pCF10 system (23).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning, Protein Expression, and Purification—TrwK, TrwBΔN70, and TrwBΔN70 (W216A) were cloned, overproduced in the *Escherichia coli* C41(DE3) strain (24), and purified as described previously (4, 7). Fractions used for EM were eluted from a Superdex200 GL 3.2/30 column in a buffer consisting of 50 mM PIPES-NaOH (pH 6.45), 75 mM potassium acetate, 5% (w/v) glycerol, 10 mM magnesium acetate, 0.1 mM EDTA, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride.

ATP Hydrolysis Assays—ATPase activities by TrwK and TrwBΔN70 were measured by a coupled enzyme assay (25) as described previously (4, 7). For inhibition assays, mixtures of proteins were incubated for 5 min and then added to the ATP assay buffer as described in Ref. 15.

DNA Binding Assays—TrwK DNA binding activity was measured by gel shift assays. G4 DNA and ssDNA substrates were prepared, and 5'-radiolabeled with [γ -³²P]ATP as described previously (16). TrwBΔN70 and TrwK were added to the binding buffer (16), and, after incubation at 37 °C for 10 min, reaction mixtures were loaded onto a 10% native PAGE gel (1× Tris-borate-EDTA). Gels were analyzed using a Molecular Imager FX ProSystem (Bio-Rad). For quantification, the inten-

sity of bands corresponding to free DNA and TrwK-DNA complexes was determined using ImageQuant software.

Electron Microscopy and Image Analysis—Aliquots of TrwK (0.1 mg/ml) were applied onto freshly glow-discharged carbon-coated grids. Samples were negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate. Electron micrographs were recorded at ×60,000 nominal magnification on Kodak SO-163 film using a JEOL 1200EX-II electron microscope operated at 100 kV. The micrographs were digitized in a Zeiss SCAI scanner with a final sampling rate of 4.66 Å/pixel. The defocus and astigmatism of the images were determined with CTFFIND3 (26), and phases were corrected for the contrast transfer function effect. A total of 4548 particles were selected manually and normalized using XMIPP image processing software (27). The alignment and classification were performed by maximum likelihood multi-reference refinement methods (28). A neural network self-organizing map was used as the main classification tool (29) to analyze the variability of the images, resulting in a final data set of 1179 particles. A rotational spectrum was done as defined in Ref. 30. Reference models and first refinements steps during three-dimensional reconstruction were performed using the EMAN software package (31) until a volume with the general shape of the complex became evident. The XMIPP software package (27) was used in the subsequent iterative angular refinement procedure.

Gold Labeling—His-tagged TrwK was incubated for 30 min with Ni-NTA-conjugated 5-nm gold (Nanoprobes, NY) at a 1:10 TrwK hexamer:Ni-gold molar ratio. Samples were applied onto freshly glow-discharged carbon-coated grids and negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate. Electron micrographs were recorded at ×150,000 nominal magnification on a camera GATAN model ORIUS SC 1000 CCD using a JEOL JEM-1011 electron microscope operated at 80 kV with a final sampling rate of 6.4 Å/pixel.

Docking of Atomic Models into the EM Map—Atomic coordinates of monomeric VirB4 CTD (PDB code 4AG5) (21), hexameric TrwBΔN70 (PDB code 1E9R) (18), and FtsK of *Pseudomonas aeruginosa* (PDB code 2IUU) (32) were fitted with UCSF Chimera (33) into the TrwK EM volume, previously filtered to 22-Å resolution. Docking was further optimized with colacor (cross-correlation-based low resolution rigid-body refinement of molecular dockings), which is part of the Situs program package (34). Hexameric VirB4 was constructed by aligning each monomer of the VirB4 CTD to the hexameric structure of FtsK. For fitting of volumes, atomic structures were filtered to 20-Å resolution and then fitted into the EM map with UCSF Chimera. In the case of Pa-FtsK, the handle loop (comprising residues 570–582) was not included in the volume, as TrwK does not share any sequence similarity with FtsK in this region.

Phylogenetic Analysis—Protein sequences were retrieved from Uniprot, aligned, and clustered as described previously (20). Clusters corresponding to FtsK/SpoIIIE, VirD4/TraD, and VirB4 members were selected to generate a library of 1072 sequences. Unpredicted, uncharacterized, and putative sequences were removed from this library (669 sequences). Then a database was created including sequences of the best known members (mainly those annotated in the Swiss-Prot database or those characterized genetically or biochemically).

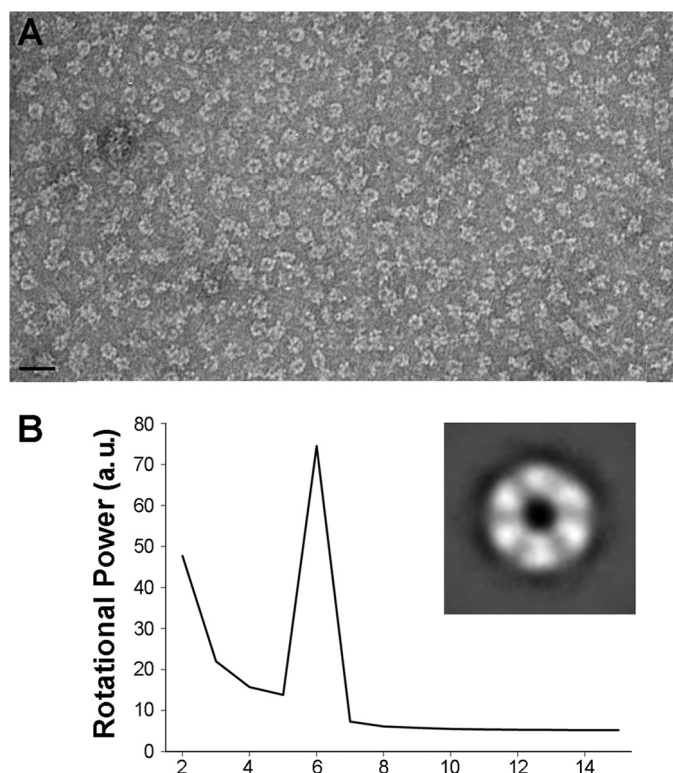


FIGURE 1. EM of TrwK_{wt} of conjugative plasmid R388 in its hexameric form. A, TrwK was negatively stained with uranyl acetate and analyzed by EM. Scale bar = 30 nm. B, rotational power analysis of TrwK rings class averages (inset) with harmonic energy percentage as a function of the radius. a.u., arbitrary units.

The sequences of Pa-FtsK, TrwB, and VirB4, for which x-ray structure information is available, were used to identify the motor domains of these proteins. Then the motor domain sequences were aligned with T-coffee (35). Phylogenetic analysis was performed with FastTree using default settings (36). Tree representations were carried out using Archaeopteryx (37). For rooting purposes, four RecA sequences (*E. coli*, *Thermotoga maritima*, *P. aeruginosa*, and *Ureaplasma urealyticum*) were selected and included in the analysis.

RESULTS

Three-dimensional Reconstruction of TrwK—Purified TrwK, eluted from a gel filtration column at a molecular weight compatible with a hexamer, was analyzed by EM. Negatively stained specimens showed a widespread of individual particles with a ring-shaped structure (Fig. 1A). In addition, dumbbell-shaped particles were also observed and were interpreted as side views of the analyzed specimen. Images were subjected to reference-free classification to align and average similar views. Rotational symmetry analysis of the rings clearly identified a 6-fold symmetry along the *z* axis (Fig. 1B). As the size and shape of the rings was not uniform, possibly reflecting top and bottom views, C6 symmetry was applied in the following three-dimensional reconstruction. Unbiased class averages (Fig. 2A) were matched by projections of the final volume (Fig. 2B), supporting the correctness of the reconstruction. The three-dimensional reconstruction revealed a structure consisting of a double hexameric ring (Fig. 2C). The dimensions of the final reconstruction

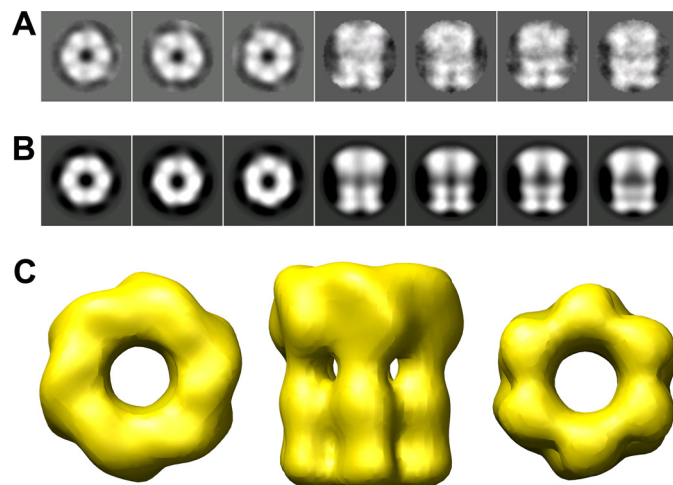


FIGURE 2. 3D reconstruction of TrwK of conjugative plasmid R388. Class averages of TrwK (A) and matching projections of the final volume (B). C, final volume obtained by projection matching and angle refinement and low-pass filtered to 22 Å. Top (left panel), side (center panel), and bottom (right panel) views of the volume. The top and bottom views, corresponding to the N-terminal and C-terminal ends of the protein, respectively, differ in size (132 Å and 124 Å, respectively), and the longitudinal dimension is 165 Å.

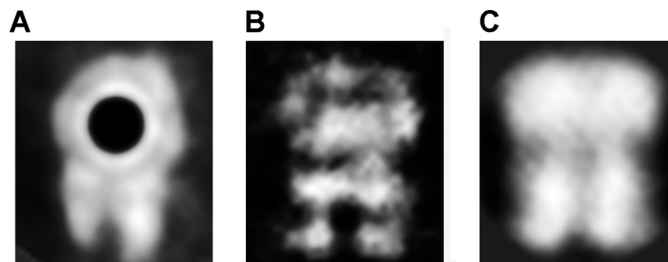
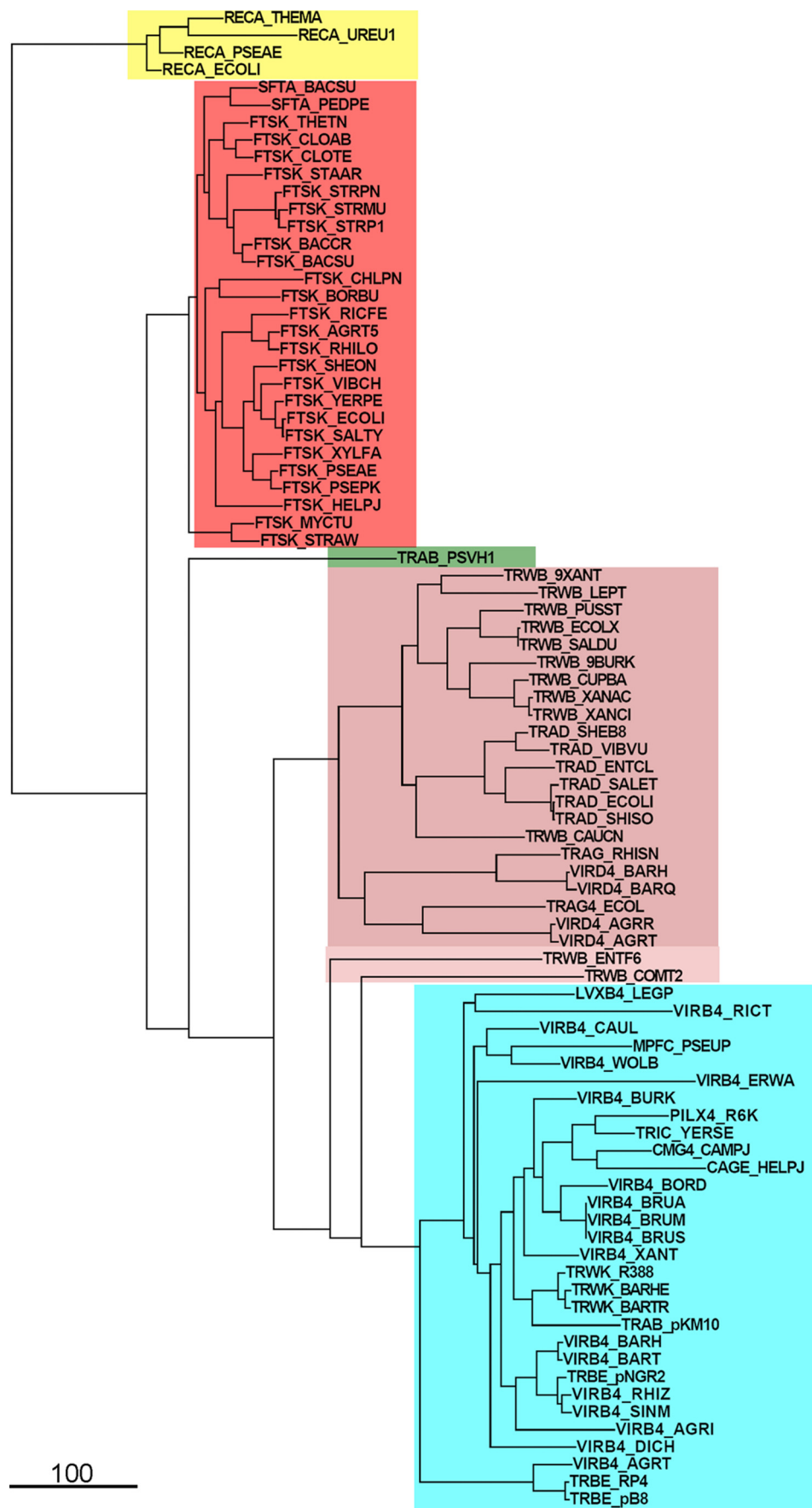


FIGURE 3. Gold labeling electron microscopy. His-tagged TrwK was incubated with Ni-NTA-conjugated gold (5 nm), negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate, and analyzed by electron microscopy. Class averages of gold-labeled TrwK (A), comparison with unlabeled TrwK (B), and projection images of the 3D reconstruction (C).

were 165 Å along the large axis with an inner diameter of 42 Å and outer diameters of 132 Å and 124 Å for the top and bottom ends, respectively. To discriminate which of these ends corresponded to the N- and C- terminal halves of the protein, TrwK was cloned with a His tag in the N terminus and labeled with Ni-NTA-conjugated gold. Image analysis of the gold-labeled particles (Fig. 3) allowed us to clearly identify the top end as the N terminus of the protein.

Phylogenetic Relationship between TrwK and TrwB/FtsK DNA Translocases—VirB4 proteins belong to a family of P-loop ATPases that also includes FtsK/SpoIIIE and their archaea relatives HerA and VirD4/TrwB-like proteins (19). These proteins contain a motor domain that is well conserved, suggesting an evolutionary common ancestor (20). However, the N-terminal halves of FtsK/SpoIIIE and VirB4 proteins are not that well conserved, and the size and sequence of these N termini are variable. Here, we have selected sequences corresponding to the motor domain of FtsK/SpoIIIE, SftA, a FtsK homologue in *Bacillus subtilis*, VirB4, and TrwK-like relatives and VirD4/TraD/TrwB coupling proteins. We also included TraB, a conjugal double-stranded DNA transfer protein in *Streptomyces* that resembles FtsK (38). The phylogenetic analysis was performed in the presence of four RecA proteins that were used to

Hexameric Structure of VirB4 ATPase



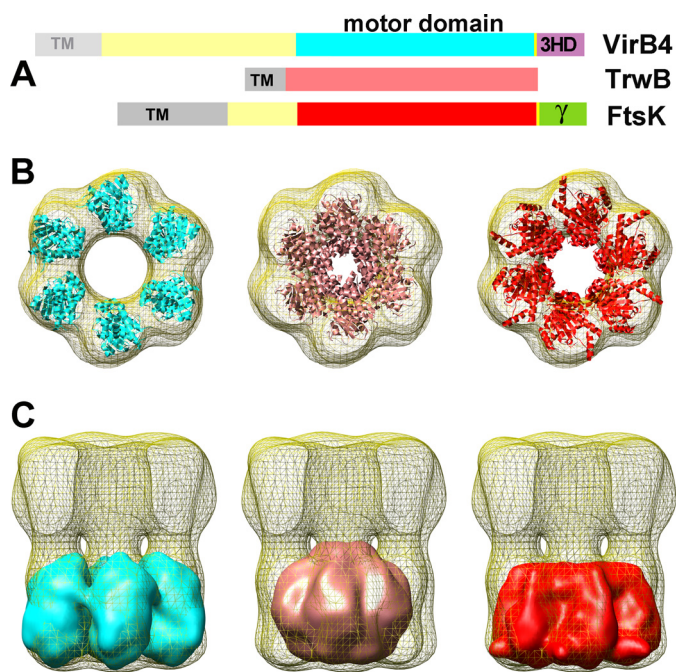


FIGURE 5. Fitting atomic coordinates of TrwB and FtsK into TrwK EM map. A, schematic representation of the VirB4 homologue in *H. pylori*, the coupling protein TrwB of plasmid R388, and *P. aeruginosa* FtsK. The transmembrane domains (TM) are depicted in gray. TrwK of plasmid R388, as well as many other VirB4 homologues, lacks the transmembrane domain, thus the light gray color. The motor domains in TrwK, TrwB, and FtsK are colored in cyan, salmon, and red, respectively. B, the hexameric atomic structures obtained by x-ray crystallography of TrwBΔN70 (PDB code 1E9R) (salmon) and the C-terminal half of *P. aeruginosa* FtsK (PDB code 2IUU) were docked into the 3D EM map of TrwK. The atomic model of the monomeric *Tps* VirB4_{CTD} was previously aligned to FtsK into the EM model. The resulting VirB4_{CTD} hexamer (cyan) was finally fitted into the EM map as above. C, the atomic structures of TrwBΔN70, FtsK_{CTD}, and the model of VirB4_{CTD} were filtered to 20 Å resolution and docked into the EM map of TrwK.

root the phylogenetic tree (Fig. 4). The results suggest that the motor domain of FtsK-like proteins diverged separately from that of VirD4 and VirB4 proteins. Interestingly, we found that the conjugative dsDNA translocase TraB of *Streptomyces venezolae* pSHV1 plasmid (Fig. 4, dark olive) seems to have diverged from the coupling proteins before the speciation between VirD4 and VirB4 proteins and after the diversification between FtsK and VirB4–VirD4 families.

Fitting of Atomic Coordinates into the EM Map—On the basis of the evolutionary relationship between the motor domains of FtsK, TrwB, and TrwK, we decided to dock the atomic structures of hexameric TrwBΔN70 (PDB code 1E9R) (18) and FtsK_{CTD} (PDB code 2IUU) (32) into the EM map. Interestingly, FtsK fits much better than TrwB (the off-lattice Powell cross-correlation values were 73 and 61%, respectively). The dimensions of the inner channel of FtsK (31 Å) were closer to the EM inner diameter volume (42 Å) than the hexameric TrwB (8 Å) (Fig. 5B). Therefore, to fit the atomic coordinates of VirB4_{CTD} from *T. pseudethanolicus* (PDB code 4AG5) (21) into the EM map, each monomer was aligned using hexameric FtsK as a template. The resulting hexameric VirB4_{CTD} model was fitted

into the EM map in the same way as the TrwBΔN70 and FtsK_{CTD} hexameric crystal structures (Fig. 5B). Similar to VirB4_{CTD}, a hexameric model of TrwK_{CTD} was created by aligning the computer-generated model of TrwK_{CTD} (15) to FtsK. The hexamer was fitted into the EM map, showing no differences. In addition, the atomic structures of hexameric TrwK_{CTD}, VirB4_{CTD}, TrwBΔN70, and FtsK_{CTD} were filtered to 20 Å and docked into the EM map (Fig. 5C). The volumes adjusted very well into the EM map, occupying roughly 40% of the density, as expected. Considering the size of the CTD of these proteins (TrwK is 823 residues in length, only 359 residues per monomer form part of the C-terminal structure, and the crystal structure of FtsK only comprises 406 residues), these results further support the accuracy of the EM volume.

TrwK Displays a Higher Affinity for G-quadruplex DNA Structures over ssDNA—PrgJ, a VirB4 homologue in plasmid pCF10 from *E. faecalis*, has been recently shown to bind single- and double-stranded DNA substrates without sequence specificity (23). On the basis of the reported data and the structural similarities of TrwK with the DNA translocases TrwB and FtsK described in this work, we wondered if TrwK showed any preference for a particular DNA substrate. TrwBΔN70 has been shown to bind G4-quadruplex DNA structures with a very high affinity ($K_d = 0.3$ nM), 100-fold higher than the affinity for single-stranded DNA (16). These G4 DNA secondary structures are formed spontaneously in G-rich DNA sequences (39). Here we show, by DNA mobility shift assays, that TrwK is also able to bind G4 DNA, albeit with almost 200 times lower affinity than TrwB (Fig. 6). Surprisingly, and similar to TrwB, the affinity of TrwK for G4-quadruplex ($K_d = 56$ nM) is much higher than for single-stranded DNA ($K_d > 500$ nM). Therefore, we can conclude that TrwK also displays a preferential binding for G4 DNA.

TrwK Inhibits DNA-dependent ATPase Activity by TrwB—Although TrwK is able to bind DNA, the ATPase activity by TrwK is not affected by addition of ssDNA or G4 DNA. In contrast, TrwBΔN70 displays an ATPase activity of 2000 nmols ATP min^{−1}mg^{−1} in the presence of G-quadruplex DNA (16). Under the same conditions, TrwK ATPase activity is low (50 nmols ATP min^{−1}mg^{−1}) (7). Given the structural homology that TrwBΔN70 shares with the C-terminal half of TrwK, we wondered if an interaction between these two proteins might affect TrwBΔN70 DNA-dependent ATPase activity. Interestingly, we found that when ATPase activity was tested in the presence of both TrwBΔN70 and TrwK proteins, the activity of TrwBΔN70 was inhibited, indicating a dominant negative effect. The increase in TrwK concentration correlated with a decrease in the ATPase rate (Fig. 7). Addition of equimolar ratios of TrwBΔN70 and TrwK to the DNA-dependent ATP assay resulted in a 30% decrease of the ATPase activity. Similar ATPase rates could be obtained if only 70% of the initial concentration of TrwB would be present in the assay. These results suggest that TrwBΔN70 monomers are removed from the solu-

FIGURE 4. Phylogenetic tree of the motor domain of FtsK/SpoliIE–VirD4/TrwB– and VirB4-like proteins. Protein sequences were retrieved from Uniprot and clustered as described in Ref. 20. Sequences corresponding to the motor domain of these proteins were selected and aligned with T-coffee (35). Phylogenetic trees were built with FastTree (36) and represented with Arceuthobium (37). The tree was rooted with RecA sequences (yellow). FtsK/SpoliIE, VirD4/TrwB, and VirB4 clades are colored in red, salmon, and cyan, respectively. TraB, the conjugative dsDNA transfer protein in *Streptomyces*, is shown in dark olive.

Hexameric Structure of VirB4 ATPase

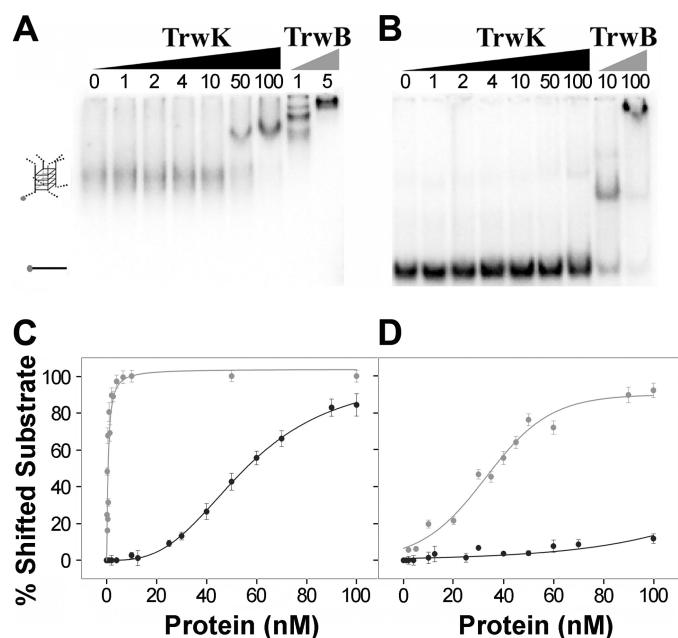


FIGURE 6. DNA mobility shifts assays of TrwK and TrwBΔN70. TrwK and TrwBΔN70 at protein concentrations in the range of 0–100 nM were mixed with 0.5 nM ³²P-labeled G4 DNA (A) and ssDNA substrate (B), and the resulting nucleoprotein complexes were separated in native PAGE. The markers to the left of the gels represent G4 DNA and ssDNA (45-mer), respectively. Quantification of the gel mobility shift analysis of G4 DNA (C) and ssDNA (D) revealed that TrwK (black) binding affinity for G4 DNA ($K_d = 56$ nM) is about 200 times lower than TrwB (gray) ($K_d = 0.3$ nM) but still much higher than for ssDNA.

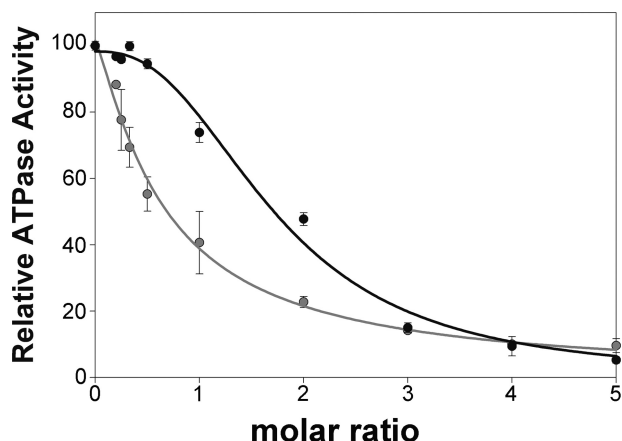


FIGURE 7. Dominant negative effect on TrwBΔN70 ATPase activity exerted by TrwK and TrwBΔN70 (W216A). G4 DNA-dependent ATPase activity by TrwBΔN70 was measured at increasing concentrations of TrwK (black) and TrwBΔN70(W216A) mutant protein (gray). TrwBΔN70 protein concentration was fixed to 0.3 μM. Proteins were mixed and incubated for 5 min and added to the G4 DNA-containing ATP hydrolysis buffer. Relative activity is expressed as percentage ATPase rates at a constant TrwBΔN70 concentration. A value of 100% of hydrolysis corresponds to 2000 nmol ATP hydrolyzed per minute and milligram of protein.

tion by specific interaction with TrwK, forming heterocomplexes that would be inactive. Similar non-functional heterohexamers were found upon addition of ATPase-defective mutants to DNA translocases, such as FtsK (32) or RuvB (40).

To understand the extent of the interaction between TrwB and TrwK, we conducted a comparative study using a TrwBΔN70 mutant variant, TrwBΔN70 (W216A), shown previously to be able to inhibit the DNA-dependent TrwBΔN70 ATPase activity by forming inactive heterocomplexes (4). This

mutant had a dominant negative effect on TrwB activity both *in vitro* and *in vivo*. Comparison between the inhibition kinetics of TrwBΔN70 ATPase activity by TrwBΔN70(W216A) and TrwK (Fig. 7) revealed that the TrwB mutant variant inhibited TrwBΔN70 ATPase activity at lower molar ratios than TrwK. Interestingly, in the case of the inhibition by TrwK, the shape of the curve suggests the existence of a marked cooperative effect, probably due to the fact that more copies of TrwK are required to appreciate initial inhibition values. Because the efficiency for hexamer formation by the TrwBΔN70-(W216A) mutant was reported to be similar to the wild-type protein (4), these results reflect that TrwBΔN70 binds TrwBΔN70(W216A) with a higher affinity than TrwK, as expected.

DISCUSSION

The crystal structure of the VirB4 C-terminal domain (CTD) from *T. pseudethanolicus* (TpsVirB4) in its monomeric form has been published recently (21). The structure confirms that VirB4-CTD is structurally similar to TrwBΔN70 (18), as predicted previously by molecular modeling using TrwB coordinates as a template (14). However, despite efforts to obtain the structure of full-length VirB4 (21), the structural details of the NTD of the protein remain unclear. On the other hand, much discussion on the oligomeric state of VirB4 has taken place because monomeric, dimeric, trimeric, and hexameric forms of the protein have been reported (7, 8, 22). Here we have obtained, for the first time, the 3D structure of full-length TrwK in its hexameric form by single-particle electron microscopy. The structure comprises not only the CTD but also the mostly unknown NTD. Combination of this structural information with biochemical and phylogenetic analysis provides new insights on the function and evolution of VirB4 proteins.

On the basis of the structural similarity of the VirB4 C-terminal half with the coupling protein TrwB, it has been proposed that VirB4 proteins assemble as homohexamers (14). However, there are genetic and biochemical studies that suggest that the oligomeric state of VirB4 proteins is a dimer (22). Furthermore, the VirB4 homolog in plasmid pKM101 has been shown to be present both as hexamer and dimer, whereby the hexameric form is soluble and catalytically active and the dimeric form inactive and membrane-associated (8). Accordingly, a mutation in the arginine finger motif in the TpsVirB4 protein almost completely abolishes the ATPase activity of the protein (21), which indicates that the protein must oligomerize to be active. This is a common feature in all AAA+/RecA ATPases that are active as hexamers. Therefore, the 3-dimensional structure of TrwK shown here might correspond to the active form of the enzyme.

VirB4 proteins are related to DNA translocases, such as the coupling proteins VirD4/TrwB and the chromosome segregation pump FtsK (19). Phyletic distributions obtained by comparative sequence analysis of FtsK proteins with other P-loop ATPases suggest that VirB4 and VirD4 families might have derived from DNA pumps of ancestral plasmids, appearing after the primary diversification of archaea and bacteria (19). FtsK proteins, on the contrary, might have evolved from an earlier evolutionary precursor from which A32-like dsDNA viral packing ATPases have also arisen (19). In this work, we

have just focused on the evolution of the motor domain of VirB4, VirD4, and FtsK proteins. The data suggest that the motor domain of FtsK-like proteins diverged separately from that of VirD4 and VirB4 proteins. In addition, we incorporated in this analysis TraB, a recently characterized dsDNA pump of a conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* that has been suggested to be closely related to FtsK proteins (38). Interestingly, we found that the motor domain of TraB_{SVH1} seems to have evolved from an ancestor from which VirB4 and VirD4 proteins have evolved.

Similar to FtsK, most VirB4 proteins have a long N-terminal extension that is less conserved than the ATPase-containing region. Little is known about the NTD of VirB4 proteins, but it is likely that this domain is involved in interactions with other components of the T4SS core complex. There is variability at the N-terminal end of VirB4 proteins, and there are clades within the VirB4 family that contain members with membrane spans, such as *Helicobacter pylori* and *Yersinia pestis* homologues. However, the N-terminal transmembrane domain of these VirB4 proteins has probably arisen from a fusion with the integral membrane protein VirB3. In fact, several members of the VirB4 family have VirB3 sequences already incorporated as fusion proteins (41), and in most T4SS, there is a conserved gene synteny in which *virB3* gene is upstream of *virB4*. Surprisingly, in a recent 3D reconstruction of the T4SS core complex bound to a VirB4 monomer (21), the NTD of the protein appeared to be embedded in the periplasmic I layer of the core complex and not underneath, as would have been expected. If that were the case, it is difficult to imagine where VirB3 would be located. Furthermore, according to that structure, the linker region connecting the NTD and the CTD of VirB4 would be located in the inner membrane region of the core complex. Such a location could only be explained after a large conformational change that allows the opening of the base of the core complex. On the basis of these considerations, we propose an alternative model (Fig. 8A) in which the VirB4 hexamer would interact with the core complex on the cytosolic side of the inner membrane and not with the periplasmic I layer of the core channel (B). It is worth noting that the dimensions of the hexameric TrwK structure shown here match perfectly with the base of the cryo-EM structure of the T4SS core complex (42).

Despite numerous genetic and biochemical studies, the biological function of VirB4 proteins is not fully understood. VirB4 proteins have been shown to play an important role in pilus biogenesis (11), but they have also been proposed to participate directly in the secretion of virulent factors (10, 12). Moreover, recent reports have shown that VirB4 proteins may interact directly with DNA (8, 23). Here, we conducted DNA shift assays to compare the abilities of TrwB and TrwK to bind DNA *in vitro*. We found that TrwK is able to bind DNA, albeit with much lower affinity than TrwB. Interestingly, we found that TrwK preferably binds G4-quadruplex structures, as has been observed for TrwB (16).

The structural homology of TrwK with TrwB led us to speculate about the possibility that these proteins could interact with each other to form heterocomplexes. In fact, it has already been shown that PrgJ, the VirB4 homologue in *E. faecalis*, is able not only to bind DNA but also to interact with PcfC, the

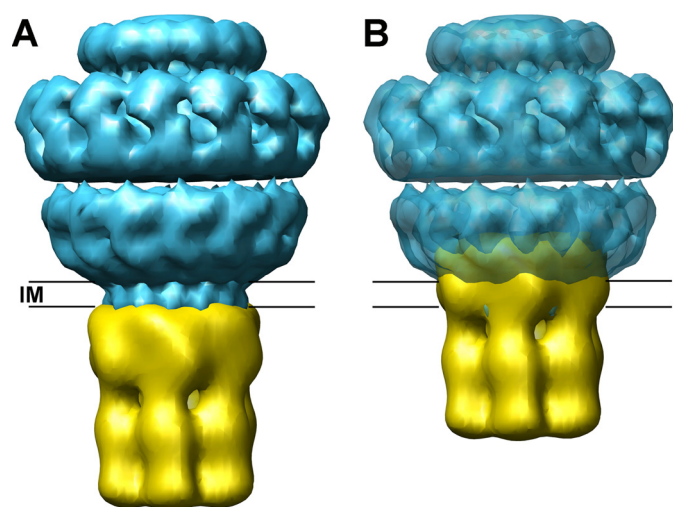


FIGURE 8. Model of interaction between the T4SS core complex and TrwK. The structure of the T4SS core complex obtained by cryo-EM (42) was retrieved from the EM Data Bank (emd_5031.map) and filtered to 20 Å. The hexameric structure of TrwK was fitted to the core complex in two possible locations: attached to the cytoplasmic side of the inner membrane region (A) or embedded in the I layer of the core complex (B), as described in Ref. 21. The model in A is more compatible with the presence of VirB3 subunit bound to the N terminus of VirB4.

coupling protein in the *E. faecalis* pCF10 plasmid (23). This result led the authors to propose a model in which the coupling protein would bind to the relaxome through contacts with the relaxase and the auxiliary protein (TrwC and TrwA in the R388 system, respectively), and then it would interact with the VirB4 homologue, which, in turn, would catalyze substrate transfer to the membrane translocase. Reinforcing this idea, we found that TrwB ATPase activity is inhibited by the presence of TrwK, an indication that there is an interaction between the two proteins. In the conjugative “shoot and pump” model (17), the relaxase is first transported covalently bound to the 5' end of the DNA. If VirB4 proteins are involved in this protein substrate transport, TrwB/VirD4 proteins would be required in the next step to pump the plasmidic DNA through the channel. Therefore, once the DNA is inside the channel, and because of the high affinity that TrwB shows for DNA in comparison to TrwK, the latter motor would be substituted by TrwB, and, therefore, it could be possible that the two proteins could form transient heterohexameric complexes during the conjugative process.

In summary, the three-dimensional reconstruction of TrwK together with the biochemical and phylogenetic analysis reported here open new avenues in the understanding of the function and evolution of VirB4 proteins. Whether the *in vitro* DNA binding abilities and structural homologies of VirB4 with DNA translocases are a reflection of an *in vivo* mechanism or whether they are just a reminiscence of a common evolutionary history is hard to tell. Further experiments are needed to clarify the *in vivo* function of VirB4 proteins and their role in the molecular mechanism of secretion by T4SS.

Acknowledgments—We thank R. Arranz at the Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, Spain) and Drs. M. Lafarga and F. Madrazo at the Instituto Fundación Marqués de Valdecilla (Santander, Spain) for helpful assistance with the electron microscopy.

REFERENCES

- 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
- Waters, V. L. (1999) Conjugative transfer in the dissemination of β -lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci.* **4**, D433–456
- Christie, P. J. (2004) Type IV secretion. The *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 219–234
- 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
- Rivas, S., Bolland, S., Cabezon, E., Goñi, 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
- Ripoll-Rozada, J., Peña, A., Rivas, S., Moro, F., de la Cruz, F., Cabezon, E., and Arechaga, I. (2012) Regulation of the type IV 17408–17414
- Arechaga, I., Peña, 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
- Durand, E., Oomen, C., and Waksman, G. (2010) Biochemical dissection of the ATPase TraB, the VirB4 homologue of the *E. coli* pKM101 conjugation machinery. *J. Bacteriol.* **192**, 2315–2323
- Fernández-López, R., Garcillán-Barcia, M. P., Revilla, C., Lázaro, 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
- Berger, B. R., and Christie, P. J. (1993) The *Agrobacterium tumefaciens* virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J. Bacteriol.* **175**, 1723–1734
- 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
- Rabel, C., Grah, 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
- Dang, T. A., and Christie, P. J. (1997) The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* **179**, 453–462
- Middleton, R., Sjölander, 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
- Peña, 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
- 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
- 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
- Gomis-Rüth, F. X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, 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
- Iyer, L. M., Makarova, K. S., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2004) Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases. Implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5260–5279
- Cabezon, E., Lanza, V. F., and Arechaga, I. (2012) Membrane-associated nanomotors for macromolecular transport. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 537–544
- Walldén, K., Williams, R., Yan, J., Lian, P. W., Wang, L., Thalassinis, 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
- Dang, T. A., Zhou, X. R., Graf, B., and Christie, P. J. (1999) Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter. *Mol. Microbiol.* **32**, 1239–1253
- 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
- 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
- Kreuzer, K. N., and Jongeneel, C. V. (1983) *Escherichia coli* phage T4 topoisomerase. *Methods Enzymol.* **100**, 144–160
- Mindell, J. A., and Grigorieff, N. (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **142**, 334–347
- 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
- Scheres, S. H., Valle, M., Nuñez, 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
- Pascual-Montano, A., Donate, L. E., Valle, M., Bárcena, M., Pascual-Marqui, R. D., and Carazo, J. M. (2001) A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particle images. *J. Struct. Biol.* **133**, 233–245
- Crowther, R. A., and Amos, L. A. (1971) Harmonic analysis of electron microscope images with rotational symmetry. *J. Mol. Biol.* **60**, 123–130
- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R., and Chiu, W. (1999) EMAN. Semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.* **128**, 82–97
- Massey, T. H., Mercogliano, C. P., Yates, J., Sherratt, D. J., and Löwe, J. (2006) Double-stranded DNA translocation. Structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol. Cell* **23**, 457–469
- Petersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
- Wriggers, W., Milligan, R. A., and McCammon, J. A. (1999) Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **125**, 185–195
- 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
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2009) FastTree. Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1641–1650
- Han, M. V., and Zmasek, C. M. (2009) phyloXML. XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinformatics* **10**, 356
- Vogelmann, J., Ammelburg, M., Finger, C., Guezguez, J., Linke, D., Flötenmeyer, M., Stierhof, Y. D., Wohlleben, W., and Muth, G. (2011) Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *EMBO J.* **30**, 2246–2254
- Williamson, J. R. (1994) G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 703–730
- Hishida, T., Han, Y. W., Fujimoto, S., Iwasaki, H., and Shinagawa, H. (2004) Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9573–9577
- 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
- Fronzes, R., Schäfer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V., and Waksman, G. (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**, 266–268