

Universidad de Cantabria

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Molecular



Estudio comparativo de sistemas de secreción tipo
IV implicados en transferencia conjugativa de
DNA y virulencia bacteriana

Héctor de Paz Fernández

Enero 2010

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

Certifica que Héctor de Paz Fernández ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título “Estudio comparativo de sistemas de secreción tipo IV implicados en transferencia conjugativa de DNA y virulencia bacteriana”.

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado, al objeto de poder optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Santander, a 26 de Enero de 2010

Fdo. Matxalen Llosa

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria bajo la dirección de la Doctora Matxalen Llosa, gracias a las becas predoctorales concedidas por la Fundación Marqués de Valdecilla y la Universidad de Cantabria.

Durante este periodo se ha realizado una estancia de 3 meses en el laboratorio del Dr. Christoph Dehio (Biozentrum, Basel, Suiza) gracias a una beca EMBO.

A Marta

Sin duda esta es la parte más “agradecida” de una tesis, donde se suele hacer un repaso de tus últimos años, pero también la más difícil, porque es complicado que no se te quede nadie en el tintero. Así que si se me olvida alguien, por favor, perdonadme. Escribiendo los agradecimientos me estoy dando cuenta del fin de ciclo (y este año me tocan 2!).

En primer lugar quiero agradecer a Matxalen estos 5 años. A parte de por la confianza depositada en mi, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y todas esas cosas de jefes, porque siempre se ha preocupado mucho por como me encontraba a nivel personal en esos momentos de flaqueza que todos tenemos. Y por supuesto, por su comprensión... Marta y yo te estamos muy agradecidos!

A Fernando por sus consejos. A Gabi, Elena e Iñaki por esos abordajes en el despacho y estar siempre dispuestos a socorrerme. A Mariví (yo de mayor quiero ser así!). A Javier León y Dolo, por su ayuda celular cuando más la necesitaba.

A todos mis compañeros de laboratorio, que al fin y al cabo son los que más me han sufrido. A Cristina y Carolina por ser las que aguantaron los primeros meses todas mis dudas y preguntas. A Leti, que la quiero un montón y con ella empezaron las risas en el laboratorio (que oye, también es importante), y por supuesto por ese clon de tres pasos y demás favores. A Esterina, siempre sonriente y dispuesta, compañera de penurias en patógenos, por todos esos ensayos que hicimos a medias...Marta y yo también te lo agradecemos! A Delfi, otro tanto de lo mismo, esos Western, esa mano para TrwB. Vamos, que siempre he estado muy bien rodeado.

A Yera, porque como dijo en su día Dani, tú e Inma me disteis la vida en una etapa no muy buena. Por todas las risas, las cervezas y copas, los cafés (y eso que tu agenda es muy apretada ;o)). En definitiva, muchas gracias por estar ahí, jo, voy a echar mucho de menos que te pongas roja y llores por cualquier cosa.

A Mati, Sandra y Sheila, porque sin ellas todo hubiera sido un caos. Bueno, y también a Consuelo. A toda la gente del departamento en general. Desde los que ya no están, Raúl, Blanca, Dani (gracias gracias), pasando por los que siguen estando y todos los que han llegado. A Mapi, esa madre que todos llevan dentro. A Carlos, al que

siempre he tenido un cariño especial (pero sin mariconadas, eh?). A Irene, arriba esos Wanner! (esto también va para Esther). A toda la muchachada, Juan, Alejandro, Jorge, David, Lillo, Manu, etc... por esos partidos para desconectar, por esas cervezas. To Marco, thanks for make my stay in Basel easier.

A Félix, además de por sus consejos por iniciarme en el mundo del Squash, aunque me parece muy mal que nunca te dejaras perder. A Ana, por esas horas de campana, y a todos en micro en general. A la gente de inmuno, por todos esos días que tenía que bajar con mis células, en especial a María, porque fue de gran ayuda y tuvo que aguantarme en esos días que las cosas no salían. A “los piero”, mis Gurús de los Western, que tantos consejos me dieron.

A Javi y a Rebeca, mis compañeros de piso, mis compañeros de trabajo, mis amigos. Por que sin duda sin ellos las cosas en Santander hubieran sido mucho más difíciles. Porque los mejores momentos han sido con ellos, porque los peores momentos también. Porque los llevo en el corazón. Gracias, y perdón por el último año, en el que mi carácter cambió, y dejé de ser autofeliz. A Toca, Rulo y chus, casi por lo mismo, por compartir conmigo unos de los mejores años de mi vida.

A Emilio, Álvaro, Luis y Rubén, mis amigos de León, que siempre se han preocupado por mi Tesis. Preguntándome constantemente cuando la terminaba. Llegando al punto, de que yo creo que casi lo hacían por fastidiar ;o). Pero sobre todo porque han estado a mi lado conmigo desde la infancia (bueno Luis no, pero como es como un niño...) y también estos últimos años.

A toda mi familia, y no nombro a todos porque somos un porrón. Porque siempre han estado ahí y quizás no se lo he hecho saber lo suficiente porque esas cosas me cuestan.

Por supuesto a Marta, quien es la que probablemente ha sufrido más en primera persona mi Tesis. Por tener paciencia conmigo, con la tesis, y con todo ese tiempo que me estuviste esperando en Castellón. Por ser la persona que más fuerzas me ha dado para acabar la tesis, por ir a León, por decirme que sí, y por muchas cosas, que por decoro te las diré en privado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. SISTEMAS DE SECRECIÓN BACTERIANOS	5
1.1. Sistema de exportación de proteínas Sec (translocón)	6
1.2. Sistema de exportación TAT (Twin-arginine Translocation)	8
1.3. Sistemas de secreción tipo I (T1SS)	8
1.4. Sistemas de secreción tipo II (T2SS)	10
1.5. Sistemas de secreción tipo III (T3SS) o Inyectisomas	11
1.6. Sistemas de secreción tipo V (T5SS) o Autotransportadores (ATs)	14
1.7. Sistemas de secreción tipo VI (T6SS)	15
1.8. Sistemas de secreción tipo VII (T7SS)	17
2. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO IV (T4SS)	17
2.1. Transferencia horizontal y evolución de los T4SS	21
2.2. Componentes del T4SS	22
2.2.1. VirB1 / Trw N	22
2.2.2. Proteínas formadoras del pilus	24
2.2.3. Componentes del núcleo central del T4SS	26
2.2.4. Las ATPasas citoplasmáticas	31
2.3. Modelo funcional de secreción IV	34
2.4. Sustratos y señal de secreción	36
2.5. Papel de los T4SS en conjugación	40
2.5.1. El sistema conjugativo de R388	42
2.5.2. La región <i>Mpf</i> de R388	43
2.5.3. La región <i>Dtr</i> de R388	44
2.5.4. La proteína acopladora de R388. TrwB	46
2.6. Relación de los T4SS con la patogenicidad	51
3. EL GÉNERO <i>BARTONELLA</i>	55
3.1. Ciclo general de infección de <i>Bartonella henselae</i>	55
3.2. Distribución y función de los distintos T4SS en el género <i>Bartonella</i>	56
3.3. Papel del T4SS VirB	58

3.4. El papel del T4SS Trw	60
3.4.1. Relación entre los T4SS Trw de R388 y <i>Bh</i>	62
METODOLOGÍA	67
1. CEPAS BACTERIANAS	67
2. PLÁSMIDOS USADOS EN ESTE TRABAJO	68
3. PLÁSMIDOS CONSTRUIDOS EN ESTE TRABAJO	70
3.1. Construcción de plásmidos que requieren mención especial	74
4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	78
4.1. Extracción de DNA	78
4.2. Amplificación de DNA por PCR	79
4.3. PCR mutagénica	80
4.4. Digestiones con enzimas de restricción	80
4.5. Ligaciones	80
4.6. Secuenciación de DNA	81
4.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	81
5. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	82
5.1. Medios de cultivo	82
5.2. Transformaciones	83
5.2.1. Transformación por TSB	83
5.2.2. Transformación por electroporación	83
5.3. Conjugaciones	84
5.3.1. De <i>E.coli</i> a <i>E.coli</i>	84
5.3.2. De <i>E.coli</i> a <i>Bartonella</i> spp.	85
5.3.3. De <i>Bartonella tribocorum</i> a <i>E.coli</i> (DH5 α)	86
5.3.4. De <i>Bartonella tribocorum</i> a <i>Bartonella henselae</i>	86
5.4. Ensayo de dos híbridos bacteriano	87
5.4.1. Ensayo en placa	88
5.4.2. Ensayo β -galactosidasa	88
5.5. Inducción del sistema recombinativo Red	89
5.5.1. Utilización de la cepa DY380	89
5.5.2. Utilización del plásmido pKD20	91
6. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR	91
6.1. Cultivos celulares	91

6.2. Transfecciones	92
6.3. Infecciones de células humanas con <i>Bartonella</i> spp	92
6.4. Microscopía de fluorescencia	93
6.5. Citometría de flujo (FACS)	93
7. MÉTODOS BIOQUÍMICOS	94
7.1. Extractos proteicos	94
7.2. Cuantificación de proteínas. Bradford	94
7.3. Electroforesis en geles de SDS-PAGE	95
7.4. Western Blot	95
 PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	 101
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 105
Capítulo 1	
1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS T4SS “TRW” DE R388 Y <i>BARTONELLA</i>	105
1.1. Herramientas para el análisis de los T4SS	105
1.2. Análisis de la región Trw de R388	106
1.3. Interacciones funcionales entre los T4SS Trw de R388 y <i>Bartonella</i>	108
1.4. Ensayos de complementación estructural	111
1.5. T4SS híbridos por recombinación	116
Capítulo 2	
2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA PROTEÍNA ACOPLADORA DE R388 ..	118
2.1. Interacción de TrwB con el T4SS	118
2.1.1. Complementación funcional entre homólogos de TrwE	118
2.1.2. Mutagénesis en <i>trwB</i> y <i>trwE</i> <i>Bt</i>	121
2.1.3. Movilización de los mutantes de TrwB a través del T4SS Trw de <i>Bartonella</i>	133
2.2. Interacción de TrwB con el sustrato	135
2.2.1. Colección de mutantes	135
2.2.2. Efecto de los mutantes en la conjugación	138
2.2.3. Diseño de condiciones limitantes para ensayar TrwB	140
2.2.4. Efecto de los mutantes en interacciones proteína-proteína	144

Capítulo 3

3. TRANSFERENCIA DE DNA DESDE <i>BARTONELLA</i>	151
3.1 Transferencia conjugativa mediada por el T4SS Trw de <i>Bartonella</i>	151
3.2. Transferencia de DNA a células humanas mediadas por el T4SS de <i>Bartonella</i>	155
3.2.1. Herramientas y puesta a punto del ensayo	155
3.2.2. Infecciones de células humanas por <i>Bartonella</i>	158
3.2.3. Papel de TrwB y TrwC en la transferencia de DNA desde <i>Bh</i>	162
3.2.4. Implicación de los T4SS de <i>Bartonella</i> en la transferencia de DNA	168
RECAPITULACIÓN Y PERSPECTIVAS	177
CONCLUSIONES	187
BIBLIOGRAFIA	193
ENGLISH VERSION	210
Summary	211
Conclusions	223
Publications	225

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
AAD	Dominio todo alfa
Aci	Adenilato ciclasa
ADP	Adenosina 5'-difosfato
Ap	Ampicilina
<i>At</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
<i>Bh</i>	<i>Bartonella henselae</i>
<i>Bt</i>	<i>Bartonella tribocorum</i>
C	Citoplasma
Cm	Cloranfenicol
Ct	C terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
<i>Dtr</i>	Replicación y transferencia de DNA
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
FACS	Citometría de flujo
Gm	Gentamicina
ICH	Canal interno
IM	Membrana interna
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Log	Variación de 10 órdenes de magnitud
MOI	Multiplicidad de infección
<i>Mpf</i>	Formación del par conjugativo
NBD	Región de unión a nucleótidos
Neo	Neomicina
Nic	Mella inicial en el <i>oriT</i>
Nt	N terminal
NTP	Nucleótido 5'-trifosfato
Nx	Ácido nalidíxico
o/n	(overnight) toda la noche
OM	Membrana externa
ONPG	orto-nitrofenil- β -galactopiranosido
<i>oriT</i>	Origen de transferencia
P	Periplasma
p/v	Relación 1:1 peso:volumen
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol

PT	Toxina pertúsica
SD	Secuencia Shine-Dalgarno
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Sm	Estreptomina
ssDNA	DNA de cadena sencilla
T1SS	sistema de secreción tipo 1
T2SS	sistema de secreción tipo 2
T3SS	sistema de secreción tipo 3
T4CP	Proteína acopladora de sistema de secreción tipo IV
T4SS	sistema de secreción tipo 4
T4SSc	sistema de secreción tipo 4 conjugativo
T4SSd	sistema de secreción tipo 4 de transferencia de DNA
T4SSp	sistema de secreción tipo 4 patogénico
T5SS	sistema de secreción tipo 5
T6SS	sistema de secreción tipo 6
T7SS	sistema de secreción tipo 7
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-diamina
Trp	Trimetoprim
Tra ⁻	Fenotipo no conjugativo
Tra ⁺	Fenotipo conjugativo
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMAS DE SECRECIÓN BACTERIANOS

Los sistemas de secreción son complejos multiproteicos que se expanden a través de las membranas bacterianas, permitiendo el intercambio de moléculas entre la bacteria y el medio que le rodea, o incluso dentro de la propia bacteria entre distintos compartimentos. Son muchas las moléculas que son transportadas por estos canales, desde un amplio rango de proteínas hasta moléculas de DNA. Más amplia aún es la importancia biológica de estos sistemas, ya que están relacionados directamente, por ejemplo, con la rápida dispersión de resistencias a antibióticos, la plasticidad genómica, la virulencia de distintas bacterias y el propio metabolismo y biogénesis de las bacterias.

Los sistemas de secreción han sido clasificados en diversos grupos en función de las moléculas transportadas, la biosíntesis, estructura y relaciones entre ellos. En bacterias Gram-negativas, se han caracterizado las siguientes familias de sistemas de secreción: Tipo I (T1SS), Tipo II (T2SS), Tipo III (T3SS), Tipo IV (T4SS), Tipo V (T5SS), y Tipo VI (T6SS). Recientemente se ha descrito otra familia de sistemas de secreción (Tipo VII, T7SS específicos de bacterias Gram-positivas (Figura 1).

A continuación se hace una breve descripción de cada familia, salvo los T4SS, que por ser el objetivo de este trabajo, se tratarán en detalle en la siguiente sección.

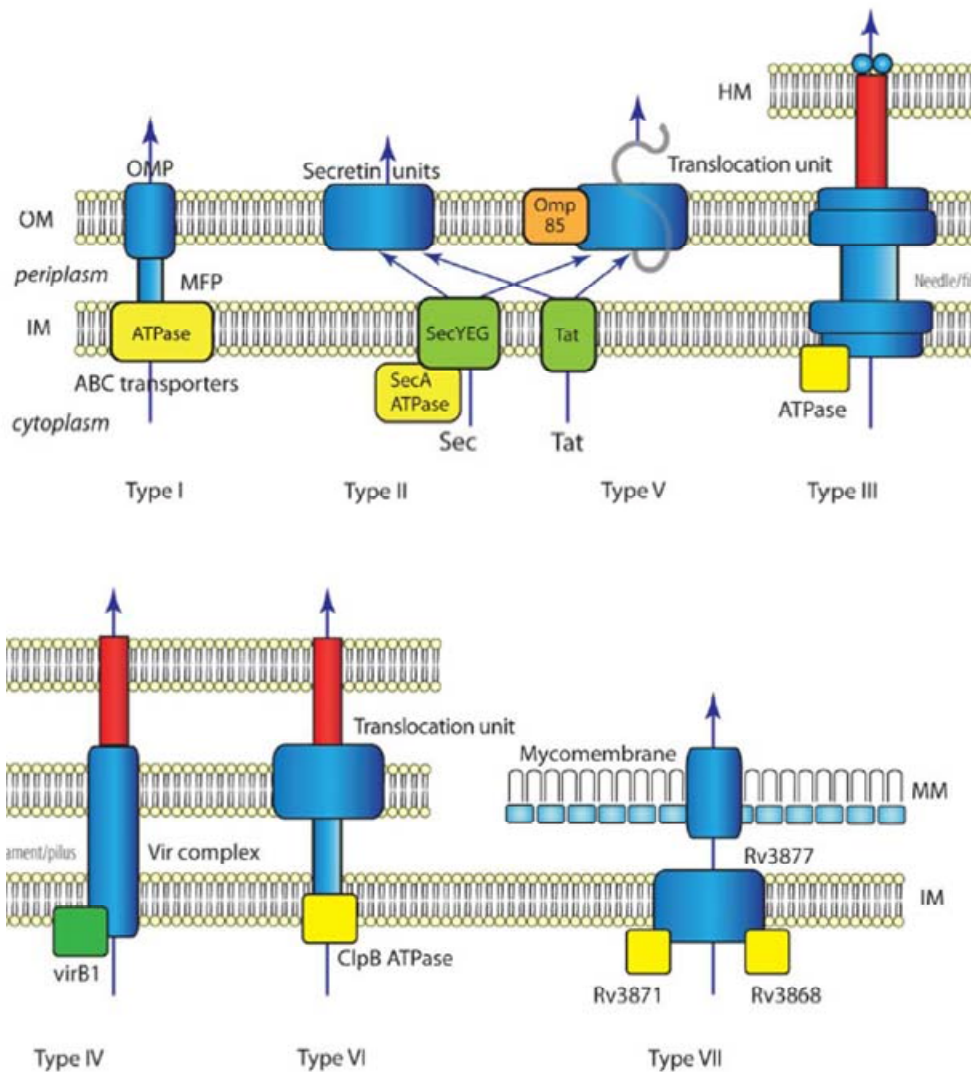


Figura 1. Resumen de los sistemas de secreción bacterianos conocidos tomada de Tsent *et al*, 2009.

1.1. SISTEMA DE EXPORTACIÓN DE PROTEÍNAS SEC (TRANSLOCÓN)

La mayoría de proteínas destinadas a ser transportadas a través de la membrana citoplasmática o integradas en la membrana son exportadas al periplasma por el conservado sistema Sec. Generalmente, las proteínas transportadas por este sistema portan una secuencia señal que contiene cargas positivas en su región N-terminal (Nt), una región central rica en aminoácidos (aa) hidrofóbicos y una región C-terminal (Ct) hidrofílica (Hegde and Bernstein, 2006). En la región Ct de la secuencia señal hay un motivo tipo Ala-X-Ala que es reconocido por peptidasas cortando la proteína tras su

translocación. La región Nt de la señal a menudo queda en la región citoplasmática y la región hidrofóbica insertada dentro de la membrana. Secuencias similares a estas son utilizadas para la integración de ciertas proteínas en la membrana. Así, una proteína sin señal de corte quedaría integrada en la membrana con la región Nt en el citoplasma y la región Ct en el periplasma.

El translocón, que forma un poro en la membrana interna, está compuesto por tres proteínas, SecYEG, que forman un complejo heterotrimérico, mientras que SecA es una ATPasa que conduce la translocación de las preproteínas (Vrontou and Economou, 2004).

Una propiedad fundamental del sistema Sec es que no puede transportar proteínas plegadas, en contraste con el sistema Tat (Fisher and DeLisa, 2004). Dos principales vías de secreción son conocidas (Figura 2). Una es la vía conocida como SRP, en la cual, las preproteínas es dirigida a la membrana cuando todavía está siendo traducida en el ribosoma (Luirink and Sinning, 2004; Shan and Walter, 2005). La otra posible vía es conocida como SecB, en la cual, la preproteína entera se une a SecB impidiendo su correcto plegamiento y se dirige hacia el aparato de translocación con la ayuda de SecA (Randall and Hardy, 2002).

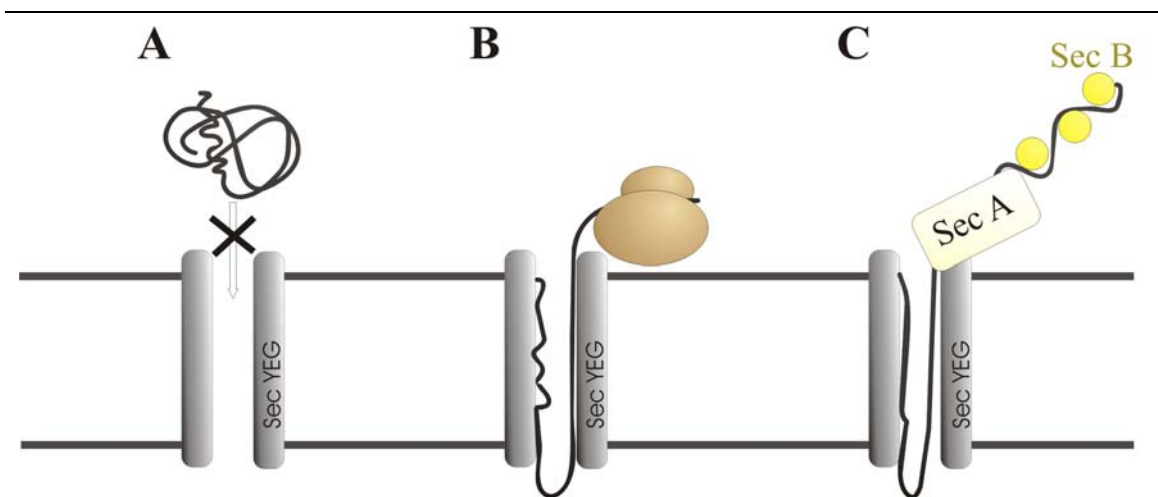


Figura 2. Dos de las vías de exportación más importante en Bacterias. **A.** Una proteína plegada no puede ser translocada. **B.** Vía SRP donde la proteína es translocada mientras se va traduciendo. **C.** La vía SecB que transporta proteínas ya traducidas impidiendo su plegamiento. Figura adaptada de Wooldridge, 2009.

1.2. SISTEMA DE EXPORTACIÓN TAT (Twin-arginine Translocation)

Éste es un sistema de secreción presente tanto en eubacterias, como en Arqueas y cloroplastos, que tiene la habilidad de transportar proteínas completamente plegadas. Las proteínas translocadas presentan una señal Nt con un motivo casi invariante de argininas. De hecho, los sustratos a los que les falta estas señales o están mal plegados no suelen ser transportados. El motivo consenso es S-R-R-x-F-L-K, donde x es un aa polar. Las señales en los cloroplastos son algo más variables, y en bacterias son normalmente más largas (Cristobal *et al.*, 1999). Una vía de transporte para proteínas completamente plegadas es importante, ya que muchos de los sustratos del sistema TAT son proteínas que contienen cofactores redox, adquiridos en el citoplasma (Berks *et al.*, 2003). En bacterias, son sustratos que pueden tener funciones importantes en la respiración anaerobia, enzimas involucradas en la biogénesis de la célula o factores de virulencia (Lee *et al.*, 2006).

El sistema suele estar compuesto por tres proteínas, TatA, TatB y TatC, aunque, especialmente en bacterias Gram-positivas, también existe un sistema mínimo formado por TatAC, en el cual, TatA asume las funciones de TatB. TatC y TatB forman un complejo implicado en el reconocimiento de la secuencia señal Tat. TatA, por el contrario, media la translocación, pero aún no está claro si lo hace formando poros, aunque hay estudios que así lo ponen de manifiesto (Berthelmann *et al.*, 2008). La energía necesaria para la unión y translocación del sustrato deriva de la fuerza protón motriz (Alami *et al.*, 2003), siendo completamente independiente de la hidrólisis de ATP (Alami *et al.*, 2002). En el transporte, también parecen importantes ciertas chaperonas, tanto generales como específicas (Ansaldi *et al.*, 1999; Graubner *et al.*, 2007).

1.3. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO I (T1SS)

La familia de los sistemas de secreción Tipo I está asociada con patógenos humanos y animales y constituyen la maquinaria proteica de transporte más simple en bacterias. Los T1SS están compuestos por tan sólo tres proteínas principales. El transportador ABC (dímero), la proteína de membrana MFP unida a la membrana

interna y la proteína OMP anclada a la membrana externa (Gray *et al.*, 1986). Tanto MFP como OMP conforman un canal continuo que se extiende desde el citoplasma hasta el espacio extracelular. La proteína ABC (ATP-binding cassette) tiene actividad ATPasa y parece participar, junto con la proteína MFP, en la interacción específica con la secuencia señal del sustrato transportado (Figura 3).

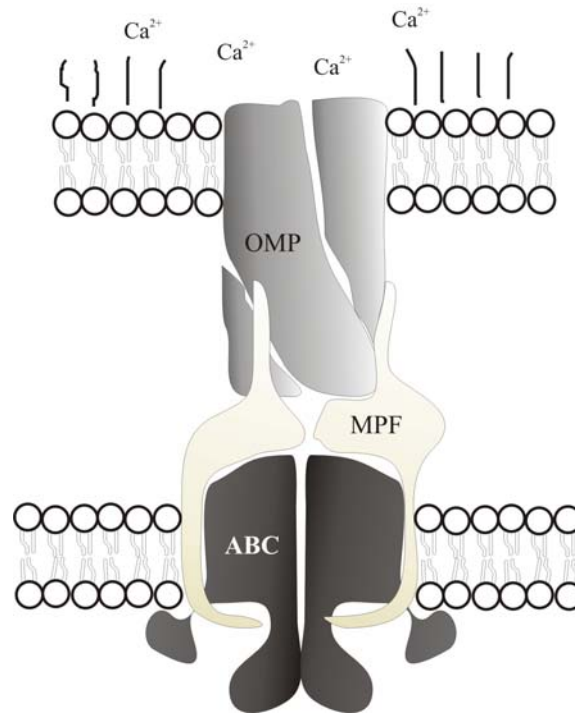


Figura 3. Representación esquemática de un TISS ensamblado. Los iones de calcio son mostrados en el espacio extracelular para marcar su importancia en el plegamiento de la mayoría de los sustratos secretados. Figura adaptada de Wooldridge 2009.

Los sustratos transportados se pueden dividir en proteínas RTX, que cuentan con señales de secreción en su Ct, que consisten en repeticiones de nonapéptidos ricos en glicina (Strathdee and Lo, 1989), y proteínas no RTX, que carecen de estas señales. Sin embargo, éstas últimas presentan una serie de características según el grupo, como el caso de la colicina V, que es cortada durante el transporte cerca de un motivo de dobles glicinas por un dominio proteasa presente en la proteína ABC (Michiels *et al.*, 2001). Son varias las evidencias que parecen indicar que el sustrato es transportado desdoblado y que posteriormente el plegamiento ocurre en el espacio extracelular, cerca de la membrana externa, de manera autocatalítica en un proceso dependiente de Ca^{2+} (Yamniuk *et al.*, 2004).

El tipo de sustratos secretados por este sistema es muy variado. Desde citotoxinas (como CyaA de *B. pertussis*, HlyA de *Escherichia coli* (*Ec*) o Lkta de *P. haemolytica*), antibiótico peptídico (Cvac de *Ec*), Lipasas (LipA de *S. marcescens*), factores de nodulación (como NodO de *R. leguminosarum*), etc.

1.4. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO II (T2SS)

Este grupo de sistemas de secreción se encuentra ampliamente distribuido y bastante conservado entre las γ -proteobacterias. Típicamente, los T2SS están compuestos por entre 12 y 16 proteínas llamadas Gsp (General secretion pathway) (Filloux, 2004). Todas ellas se ensamblan en un complejo multiproteico que constituye una gran estructura (el secretón) que une el periplasma y lo conecta con el espacio extracelular a través de la membrana externa e interna (Figura 4).

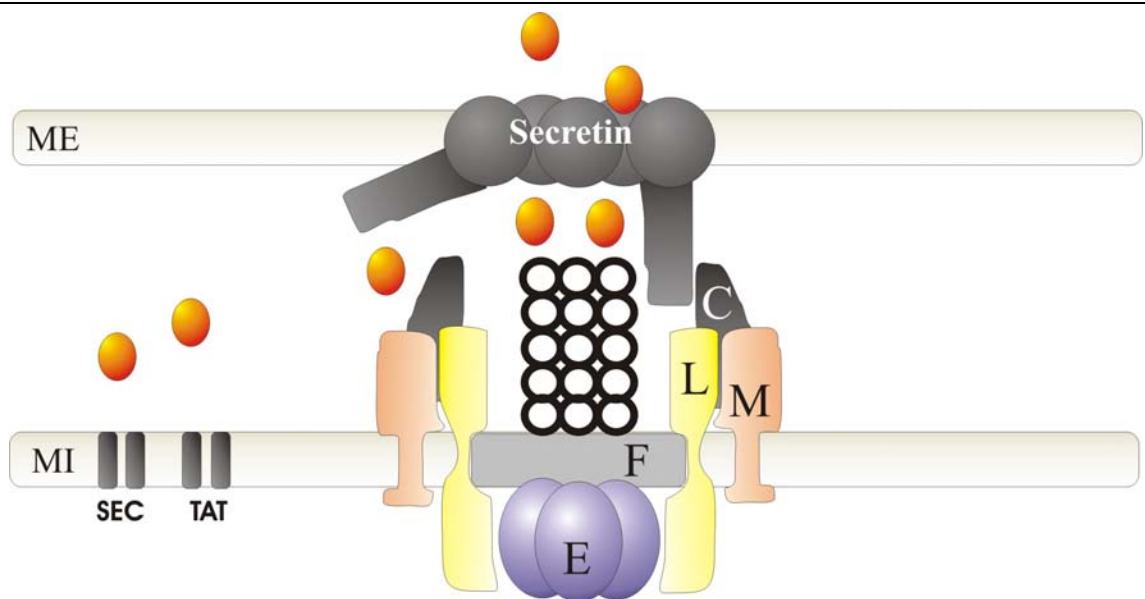


Figura 4 Modelo de la organización estructural de un T2SS. Los sistemas Sec y Tat exportan los precursores a través de la membrana interna (MI), que posteriormente son lanzados a través de la membrana externa (ME) por el T2SS. Figura adaptada de Wooldridge 2009

Esta estructura podríamos dividirla de manera muy general en cuatro partes. Por un lado las proteínas que forman el núcleo del canal como Gsp F, L, M, etc. Por otro lado hablaríamos de la proteína GspE, unida a la membrana interna gracias a GspL (Ball

et al., 1999), y que presenta los dominios de unión a nucleótidos Walker A y Walker B característicos de las ATPasas (Planet *et al.*, 2001). En tercer lugar, un grupo de proteínas GspGHIJK, transportadas al periplasma vía los sistemas Sec o Tat, conforman un pseudopilus (Durand *et al.*, 2003) que actúa como pistón a la hora de transportar los efectores del T2SS. GspK y GspG podrían tener un papel clave en la elongación y desestabilización del pseudopilus (Durand *et al.*, 2005). Por último, la secretina GspD conformaría en la membrana externa un anillo con una cavidad central de entre 50 y 90 Å en función de las especies (Bitter, 2003).

Las exoproteínas exportadas por el T2SS se caracterizan en general por contener una señal peptídica en su Nt, y ser translocadas en un proceso de dos pasos que implica un intermediario transitorio periplasmático. En un primer paso la translocación de un precursor proteico desdoblado a través de la membrana interna ocurriría por el sistema Sec (de Keyzer *et al.*, 2003) mientras que un precursor plegado usaría el sistema Tat (Voulhoux *et al.*, 2000). Posteriormente, tras ser cortada la señal peptídica, el transporte de las exoproteínas maduras a través de la membrana externa ocurriría a través del T2SS o secretón. Estos sistemas de secreción son únicos en su habilidad de secretar proteínas multiméricas que son plegadas en el periplasma.

Una gran variedad de exoenzimas degradativas y toxinas son secretadas al entorno por diversas bacterias Gram-negativas. El proceso de secreción es muy específico, por lo que por lo general enzimas de unas especies no pueden ser secretadas a través de T2SS de otras especies.

1.5. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO III (T3SS) o Inyectisomas

Los T3SS son maquinarias transportadoras usadas por patógenos Gram-negativos para secretar proteínas directamente al citosol de la célula eucariota para tratar de esquivar su sistema defensivo. Proteínas transportadas por estos sistemas son, por ejemplo, efectores de *Yersinia spp*, *Salmonella*, *Burkholderia pseudomallei*, *Aeromonas salmonicida*, *Chlamydia spp*, *Ec*, *Bordetella pertussis*, y un largo etc.

El T3SS requiere más de 20 proteínas diferentes que forman parte del inyectisoma o que son requeridas para su ensamblaje. De éstas, 8 conservan homología con componentes del flagelo (Fields *et al.*, 1994). Visualizado por microscopía electrónica (Kubori *et al.*, 1998) las semejanzas son más obvias. Tanto, que a menudo ha sido asumido que el inyectisoma ha evolucionado de un flagelo, aunque algunos estudios filogenéticos apoyan más la hipótesis de que tanto los flagelos como los T3SS han evolucionado de un antecesor común (Gophna *et al.*, 2003).

Los T3SS han evolucionado a su vez en 7 familias diferentes (Gophna *et al.*, 2003) presentes en patógenos tanto de animales como de plantas. En algunos casos, T3SS de distintas familias pueden estar presentes en la misma bacteria, pudiendo ser usados en diferentes etapas de la infección (Waterman and Holden, 2003). Las distintas familias dentro de los T3SS conservan en el cuerpo basal de la estructura dos pares de anillos que se expanden desde la membrana interna a la externa y que guardan gran homología con el cuerpo basal del flagelo. Por el contrario, la estructura externa que continúa con el cuerpo basal es diferente en función de la familia de T3SS, pudiendo ser una estructura que asemeja una aguja, un filamento o un pilus (Figura 5).

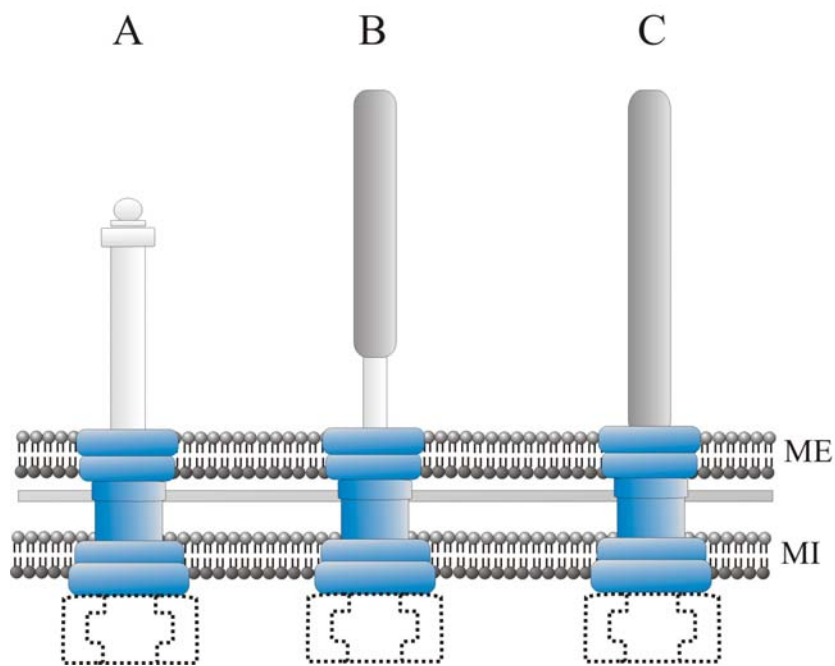


Figura 5. Representación esquemática de distintos tipos de inyectisomas. El anillo C es representado por líneas discontinuas ya que no hay mucha información de esta estructura. MI, membrana interna; ME, membrana externa. **A.** Inyectisoma en forma de aguja. **B.** Inyectisoma en forma de filamento. **C.** Inyectisoma con forma de pilus. Figura adaptada de Wooldridge 2009.

Los efectores parecen ser transportados en un solo paso a través de las tres membranas directamente dentro del citoplasma de la célula huésped, y se ha revelado la existencia de un canal central (Blocker *et al.*, 2001) de 2-3nm, lo que sugiere que las proteínas no podrían pasar plegadas; de hecho, observaciones indirectas parecen haber demostrado que las proteínas necesitan ser desdobladas primero para ser secretadas (Feldman *et al.*, 2002) (Figura 5).

Los requerimientos energéticos en estos transportadores aún no están del todo claros. Por un lado, la necesidad de la hidrólisis de ATP es necesaria para el transporte de efectores, lo que hizo pensar que era la energía necesaria para la exportación de proteínas. Sin embargo, los requerimientos de ATP juegan un papel muy importante en el desdoblamiento previo de los efectores transportados (Akeda and Galan, 2005). Además, ha sido demostrado que los T3SS también necesitan la fuerza protón motriz para su funcionamiento (Wilharm *et al.*, 2004), lo que abre la puerta a la hipótesis de que el requerimiento de ATP sea necesario para desdoblar las proteínas mientras que la fuerza protón motriz sea la requerida para el transporte.

Parece que después de la formación del T3SS y antes de la translocación de los efectores, es necesaria la exportación de otros factores, denominados translocadores. Estos sustratos no son efectores propiamente dichos, sino que se insertan en la membrana de la célula huésped formando un canal que ayuda a la transferencia de los efectores (Blocker *et al.*, 2001; Tardy *et al.*, 1999).

Los efectores presentan una señal de secreción en su Nt que es necesaria y suficiente *in vitro* para su secreción. Sin embargo, otra secuencia corriente abajo parece jugar un papel importante cuando se trata de transportar híbridos, *in vivo*, de estos efectores. Esta secuencia es reconocida por chaperoninas, que permite que la región Nt de la proteína se mantenga desdoblada, pudiendo ser más accesible la secuencia de exportación por la proteína del T3SS que la reconoce. Posteriormente, con la hidrólisis de ATP por parte de la ATPasa de este sistema, se sueltan las chaperoninas y el efector es transportado (Cambronne and Roy, 2007).

1.6. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO V (T5SS) o Autotransportadores (ATs)

También son conocidos como autotransportadores porque se caracterizan por contener todo lo necesario para secretarse en 1 o 2 polipéptidos. Cada polipéptido secretado vía T5SS contiene una secuencia señal Sec, en su Nt, requerida para ser transportada directamente a la membrana interna.

Recientemente, esta familia de sistemas de secreción se ha subdividido en varios subtipos (a, b y c) (Henderson *et al.*, 2000a; Henderson *et al.*, 2000b).

Los autotransportadores (AT). T5aSS

Los AT son sintetizados como un único transcrito que hipotéticamente contiene todo lo necesario para su secreción. Así, clonando este único marco de lectura en cepas de bacterias recombinantes se consiguió la secreción de la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoeae* (Halter *et al.*, 1984; Klauser *et al.*, 1990). Esta proteasa es el ejemplo más estudiado de autotrasportadores.

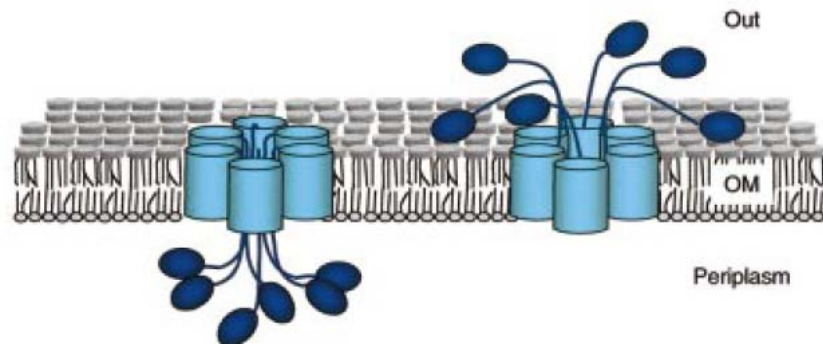


Figura 6. Ejemplo de AT. Se representa la membrana externa de la bacteria (OM). En azul claro el dominio translocador y en azul oscuro el dominio pasajero. (Veiga *et al.*, 2002).

La estructura primaria de los AT consiste en 3 dominios, un péptido que contiene una señal sec-dependiente, el dominio Ct translocador, y el efector secretado, conocido también como el dominio pasajero, que se encuentra entre los otros dos dominios (Jose *et al.*, 1995). El dominio transportador se ancla en la membrana externa,

formando un barril β entre distintos monómeros que se propuso como canal para que el dominio pasajero sea transportado al exterior (Veiga *et al.*, 2002) (Figura 6). Estudios estructurales posteriores han puesto en duda que el barril *per se* pueda actuar como transportador, y planteando la necesidad de una proteína auxiliar (Hegde and Bernstein, 2006).

Las funciones de las proteínas secretadas son tan variadas como adhesinas, lipasas o citocinas (Henderson *et al.*, 2004). La modificación de estos sistemas puede constituir una herramienta biotecnológica muy interesante. Así por ejemplo, generando proteínas híbridas de AT con cremalleras de leucinas de los factores Fos y Jun, expresadas en *Ec*, se ha abierto la puerta a la creación de nuevas adhesinas (Veiga *et al.*, 2003).

Los TPS (two-partner secretion system). T5bSS

Los TPS tienen una arquitectura muy parecida a los AT, con la diferencia de que los dominios translocador y pasajero son transcritos y traducidos en dos marcos de lecturas distintos, donde cada uno tiene su secuencia señal sec para ser transportados a través de la membrana interna (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001).

Los autotransportadores triméricos. T5cSS

Estas proteínas mantienen las características del tradicional AT, los dominios translocador, pasajero y la secuencia sec (Desvaux *et al.*, 2006). Sin embargo, presentan un corto dominio Ct por lo que han sido nombrados como AT-2 (Surana *et al.*, 2004). Tres polipéptidos AT-2 son necesarios para generar un translocador estable.

1.7. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO VI (T6SS)

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de sistema de secreción, si bien las funciones y las características de los T6SS están lejos de ser entendidas. Los T6SS aparecen como una nueva herramienta en la patogenicidad de las bacterias e interacción con sus huéspedes. Se han identificado T6SS necesarios para la virulencia de multitud de bacterias patógenas tanto de animales como de vegetales. Se encuentran genes T6SS en aproximadamente la cuarta parte de los genomas bacterianos secuenciados.

Los T6SS están formados aproximadamente por 15 genes que se encuentran agrupados en “clusters” y que pueden variar en términos de organización. Se piensa que estos sistemas codifican tanto componentes de la maquinaria de secreción como efectores específicos. En muchas especies, los *loci* de los T6SS están incompletos. En este caso, no se sabe si pueden cooperar con otros T6SSs. Esta es una de las razones por lo que es difícil definir el núcleo de los componentes de un T6SS funcional (Filloux *et al.*, 2008).

La mayoría de los T6SS contienen un gen que codifica una ATPasa AAA⁺ denominada ClpV, considerada como parte del “core” y que debe de ser el motor del sistema. Sin embargo, en *R. leguminosarum*, que es el arquetipo de T6SS, no se ha encontrado ningún gen similar a *clpV*. Una posibilidad es algunos T6SS utilicen una proteína codificada por un gen *clpV* localizado en cualquier otra región del cromosoma (Filloux *et al.*, 2008). Por otro lado, la proteína VgrG de *V. cholerae*, similar a las de la cola de un bacteriófago, puede ser usada para perforar la envoltura bacteriana e incluso la membrana de la célula huésped. Otra clase de proteínas son las Hcps. Parecen formar anillos hexaméricos que podrían formar un conducto extracelular que extienda o rodee el canal formado por VgrG. Por lo tanto, estas proteínas podrían formar un conducto que fuera usado para transportar efectores aún desconocidos e inyectados en la célula huésped como sucede en los T3SS. (Edqvist *et al.*, 2007). Así pues, se considera actualmente que los T6SS son similares funcionalmente a los T3SS y T4SS, al constar de un posible inyectisoma que podría introducir efectores en la célula eucariota.

Algunas VgrGs poseen una extensión Ct que les permite ser transferidas a través de las membranas y posteriormente sufrir un procesamiento proteolítico en la célula huésped. Además, la presencia de dominios Ct que presentan homologías con adhesinas sugieren que pueden no ser inyectadas sino permanecer también unidas a la superficie celular (Pukatzki *et al.*, 2007). En cuanto a los sustratos translocados poco se conoce, se han propuesto algunos candidatos, y está aún siendo debatido si son inyectados en la célula huésped o secretados al medio extracelular.

La mayoría de los T6SS no son inducidos en condiciones de crecimiento de laboratorio sino *in vivo* durante la infección. Se están identificando actualmente algunos componentes que parecen jugar un papel crucial en la inducción o represión de la

expresión de los genes de los T6SS cuando la bacteria coloniza al huésped. Lo que parece claro es que los T6SS están implicados en la conducta intracelular, permitiendo a la bacteria una infección persistente y crónica (Yahr, 2006).

1.8. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO VII (T7SS)

Algunas especies, como las micobacterias, tienen una pared celular altamente modificada por lípidos denominada “micomembrana”. Debido a esta peculiaridad, estas especies codifican una familia de sistemas de secreción especializada que algunos han englobado como T7SS (Abdallah *et al.*, 2007). Esta nueva familia de sistemas de secreción es necesaria para la virulencia de *Mycobacterium marinum*, así como para la conjugación en especies como *Mycobacterium smegmatis*.

La estructura y cómo funcionan estos T7SS aún se está empezando a descubrir. Modelos actuales sugieren un canal ligado a la membrana interna, formado por la proteína integral de membrana Rv3877 y un canal separado presente en la micomembrana compuesto por proteínas aún desconocidas (Abdallah *et al.*, 2007)

2. SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO IV (T4SS)

Los T4SS constituyen una familia de transportadores macromoleculares capaces de transportar distintas moléculas de la bacteria al exterior a través de las membranas bacterianas (Alvarez-Martínez and Christie, 2009). Esta familia posee gran versatilidad en cuanto a la naturaleza del sustrato que transporta, que puede ser DNA, proteínas, o complejos nucleoproteicos, así como en cuanto al destino del sustrato transportado. El DNA puede ser movilizado entre bacterias por conjugación, transportado a/desde el medio, o enviado a células eucariotas. Por su parte, las proteínas pueden ser secretadas al medio extracelular (caso del T4SS Ptl de *Bordetella pertusis*), a otras bacterias (en conjugación), o a la célula eucariota, bien desde el exterior (como en el sistema Cag de *Helicobacter pylori*), o una vez que la bacteria la ha infectado (casos de patógenos intracelulares como *Bartonella* spp., *Brucella* spp., o *Legionella pneumophila*).

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

a) Los T4SS conjugativos (T4SSc) serían los que forman parte de la maquinaria conjugativa de plásmidos que participan en la transferencia horizontal de DNA entre bacterias, y que tiene implicaciones en la plasticidad genómica procariota tan importantes como la incorporación de nuevas resistencias a antibióticos por parte de muchas especies.

b) Los T4SS patogénicos (T4SSp) son requeridos por una gran cantidad de patógenos para infectar células eucariotas. En muchos casos han demostrado ser los canales esenciales por los cuales son transportados los factores de virulencia, necesarios para establecerse la bacteria dentro de la célula huésped.

c) Los T4SS que transportan DNA a/desde el medio (T4SSd), como en el caso del sistema ComB de *Helicobacter pylori* que toma DNA del medio extracelular o el T4SS Tra de *Neisseria gonorrhoeae* que secreta DNA al medio extracelular.

Mención aparte merecen los T4SS capaces de transportar tanto proteínas como DNA, como por ejemplo los de *Agrobacterium tumefaciens* (*At*) o *Legionella pneumophila*. En el caso de *At*, su T4SS podría considerarse tanto conjugativo como patogénico, ya que es requerido tanto para la transferencia del T-DNA de la bacteria a la planta como para la transferencia de efectores proteicos. El T4SS de *At* es el más estudiado y conocido, y el que sirve de referencia en el estudio de los T4SS.

A pesar de las diferencias entre distintos tipos de T4SS en cuanto a la naturaleza de los sustratos secretados, su rol biológico, y el destino de los sustratos (Figura 7), las homologías entre los T4SS son muy grandes. La mayoría de los T4SS están compuestos por 11 proteínas, llamadas de VirB1 a VirB11, componentes del T4SS prototípico de *At*. Las homologías entre las familia de los T4SS están presentes en la organización genética, la topología de cada proteína en la membrana y la conservación

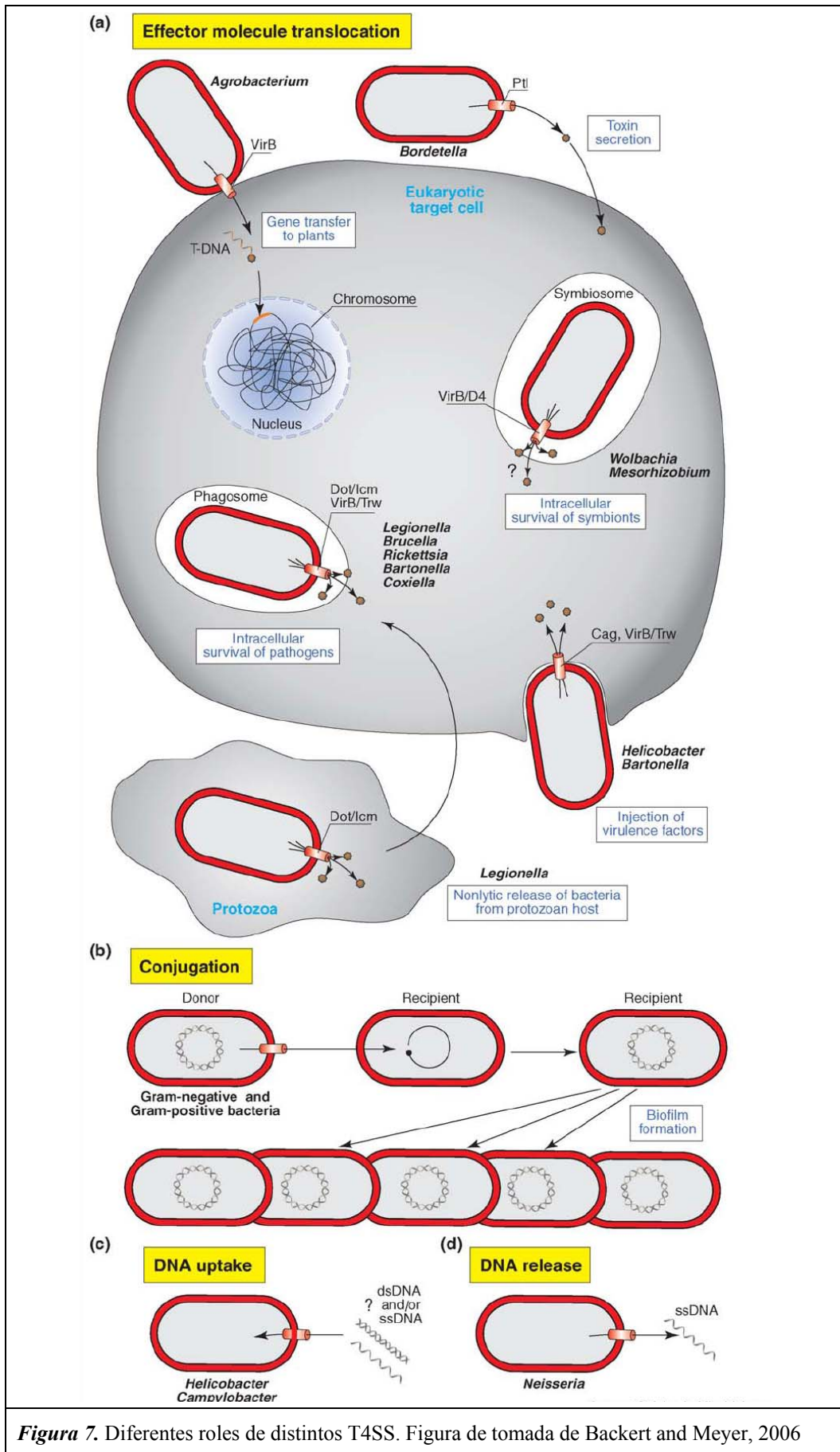


Figura 7. Diferentes roles de distintos T4SS. Figura de tomada de Backert and Meyer, 2006

Introducción

de las interacciones proteicas. Por ejemplo, la interacción entre VirB7 y VirB9 ha sido descrita para los T4SS de *At* (Baron *et al.*, 1997b; Das *et al.*, 1997; Spudich *et al.*, 1996), *Bordetella pertussis* (Farizo *et al.*, 1996), *Bartonella henselae* (Shamaei-Tousi *et al.*, 2004) y *Xanthomonas axonopodis* (Alegria *et al.*, 2005).

Los componentes proteicos de un T4SS se pueden dividir en tres categorías. Por un lado, las proteínas que energizan el sistema. Son proteínas citoplasmáticas, aunque asociadas a la IM, con actividad ATPasa (VirB4, VirB11). En muchos de los T4SS conocidos es necesaria una tercera ATPasa citoplasmática (VirD4), denominada proteína acopladora (T4CP), que sirve de nexo de unión entre el T4SS y el sustrato que exporta. En otra categoría se encontrarían las proteínas más conservadas, que forman el “core”, el canal propiamente dicho (VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 y VirB10). Un tercer grupo lo conformarían las proteínas que se encuentran en la cara externa de la bacteria formando la estructura conocida como pilus (VirB2 y VirB5). El pilus puede ser de diferentes tamaños y presentar distinto número y distribución. Este apéndice tiene como objetivo poner en contacto unas células con otras y aún es discutido si el sustrato pasa a través de él. Por último, muchos T4SS presentan también una proteína con actividad de transglicosilasa lítica (VirB1).

Muchos T4SS presentan variaciones, como el caso del T4SS VirB de *Brucella*, que no contiene una proteína similar a VirD4, y en cambio presenta un componente extra llamado VirB12, o el caso del T4SS ComB de *H. pylori* que toma DNA del medio y sólo presenta homología con 8 proteínas (VirB2-VirB4 y VirB6-VirB10) (Karnholz *et al.*, 2006)..

Existe otro grupo de T4SS que, por estar menos relacionados con este modelo, se consideran como una subfamilia T4SS diferente, denominándose T4SSB, mientras los más similares al modelo de *At* se llaman T4SSA (Christie *et al.*, 2005). Algunos ejemplos son el T4SS del plásmido conjugativo R64 o el T4SS Dot-Icm implicado en la patogenicidad de *L. pneumophila*. Este último es el único T4SSB que ha sido caracterizado a nivel molecular (Voth *et al.*, 2009). Las diferencias frente al modelo de *At* son muy grandes en cuanto a la composición proteica, con la excepción de las homólogas a VirB10 y VirB11 (Komano *et al.*, 2000).

2.1. TRANSFERENCIA HORIZONTAL Y EVOLUCIÓN DE LOS T4SS

El hecho de que muchos T4SS medien la transferencia horizontal de genes, tiene un impacto muy importante en su evolución y distribución entre las bacterias. Una consecuencia de la movilidad genética de ciertos elementos es que su evolución no se encuentra ligada a la bacteria en la cual existe (Frank *et al.*, 2005). Otra consecuencia es que algunos T4SS de orígenes evolutivos independientes pueden convivir en una misma bacteria adquiriendo funciones diferentes. Son varios los ejemplos que encontramos en la naturaleza.

El primer ejemplo es el del patógeno *At*, que usa su T4SS VirB para transferir DNA y factores de virulencia a las células vegetales (Goodner *et al.*, 2001). El T4SS VirB está codificado en el plásmido inductor de tumores (Ti), y la transferencia de dicho plásmido entre bacterias está mediado por otro T4SS denominado Trb codificado en el mismo plásmido. El sistema Trb está constituido por proteínas que tienen una relación filogenética más cercana con el plásmido conjugativo de la familia IncP RP4, que con el sistema VirB. Además de dichos T4SS, otro T4SS llamado Avh puede estar presente en el plásmido. El T4SS Avh media la conjugación de este plásmido y se encuentra más estrechamente relacionado con el T4SS VirB de *Bartonella* que con los otros dos codificados en el plásmido Ti (Chen *et al.*, 2002).

Como segundo ejemplo encontraríamos a muchas de las especies de *Bartonella*, que codifican en su DNA cromosómico dos T4SS distintos (Schroder and Dehio, 2005). Uno de ellos es similar al T4SS Avh de *At*, con la salvedad que participa en el transporte de efectores a las células endoteliales en lugar de transportar DNA. El segundo, es muy similar al T4SS Trw del plásmido conjugativo R388 y es requerido para la colonización de los eritrocitos, aunque no es conocido si media translocación de algún efector. Estos datos sugieren que los T4SS de *Bartonella* evolucionaron de dos T4SS conjugativos distintos y que fueron recientemente adquiridos y posteriormente sufrieron adaptaciones adquiriendo nuevas funciones.

El último ejemplo es el de *Rickettsia tsutsugamushi*, un patógeno intracelular que contiene más de 20 operones que codifican T4SS que conservan ciertos parecidos a

distintos T4SS conjugativos (Cho *et al.*, 2007). Algunos de ellos están truncados y muchos contienen pseudogenes y aún no está claro si son necesarios para la supervivencia intracelular.

Por otro lado, la transferencia horizontal de T4SS puede transferir capacidades específicas a las nuevas bacterias receptoras. Así, la transferencia del plásmido Ti a otras bacterias, puede conferirles la capacidad de transferir genéticamente a las plantas (Broothaerts *et al.*, 2005).

En general, la transferencia horizontal y evolución de los T4SS parece ilustrar que estos aparatos pueden servir para diferentes propósitos y que el mecanismo básico puede ser adaptado a nuevas y versátiles funciones.

2.2. COMPONENTES DEL T4SS

La Figura 8 muestra el modelo actual de un T4SS tipo. Se indica a continuación el papel de cada componente tipo de un T4SS. Se utiliza la nomenclatura del T4SS de referencia (*At*) y del T4SS Trw, por ser el objeto de este estudio.

2.2.1. VirB1 / Trw N

VirB1 es una proteína que presenta grandes similitudes estructurales con proteínas de la familia de las transglicosilasas líticas. (Koraimann, 2003; Mushegian *et al.*, 1996). De hecho, se ha visto que proteínas de esta familia tienen actividad muramidasa, desordenando la estructura de la pared bacteriana, y haciendo así quizás posible un mejor ensamblaje de las proteínas que formarán el T4SS (Bayer *et al.*, 2001).

Estas proteínas tienen de media un tamaño de 238 aa ((Cao and Saier, 2001); la referencia es usada también en posteriores datos del tamaño del resto de las proteínas del T4SS). Portan señales peptídicas para la exportación al periplasma. En el caso de *At*, se ha observado que VirB1 sufre un procesamiento en su Ct, generándose un producto (VirB1*) que es secretado (Baron *et al.*, 1997a). Este péptido Ct también tiene un papel en la función del T4SS y es secretado por otra vía distinta al sistema VirB (Grandoso *et*

al., 2000). En algunos casos, la falta de VirB1 puede ser compensada por proteínas que presentan una actividad similar, existiendo una cierta complementación heteróloga (Hoppner *et al.*, 2004; Zahrl *et al.*, 2005).

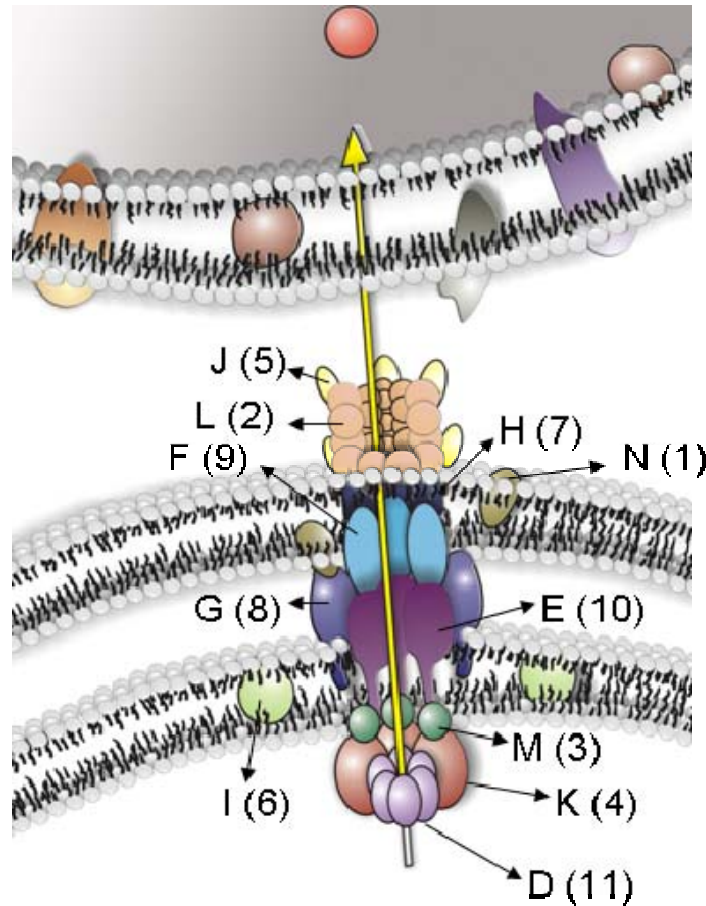


Figura 8. Representación esquemática de la estructura típica de un T4SS. Cada proteína está representada por una letra (equivalencia del sistema Trw) y un número (su homóloga en el sistema VirB). La proteína acopladora no está representada por no formar parte del T4SS propiamente dicho.

Aunque VirB1 es un miembro de una familia ampliamente distribuida y presente en T2SS, T3SS, y T4SS, así como en sistemas de entrada de bacteriófagos y sistemas de incorporación de DNA, parece que no es esencial para la formación del T4SS, pero afecta a la función de ensamblaje (Bayer *et al.*, 2001; Berger and Christie, 1994; den Hartigh *et al.*, 2004).

2.2.2. Proteínas formadoras del pilus

VirB2 / Trw L. VirB2, una proteína pequeña e hidrofóbica, es conocida como pilina, el componente mayoritario del pilus del T4SS (Berger and Christie, 1994; Jakubowski *et al.*, 2005; Lai and Kado, 1998). La familia de proteínas VirB2 presenta un bajo grado de homología, si bien existen diferentes residuos Gly conservados a lo largo de la misma.

Poco se sabe aún de su estructura, pero se han empezado a descubrir reacciones que intervienen en la maduración de la pilina. En ciertos casos se ha visto cómo pilinas son procesadas en polipéptidos cíclicos (Eisenbrandt *et al.*, 1999), que sirven como ladrillos para la construcción del pili (Haase *et al.*, 1995; Lai and Kado, 1998). En otros casos, parece que moléculas de propilina se localizan en la membrana interna donde tiene un proceso de corte por parte de peptidasas de la región Nt y posterior acetilación. Así, se piensa que la pilina madura puede formar un reservorio (Kalkum *et al.*, 2004; Lawley *et al.*, 2003), donde los monómeros de pilina madura podrían ensamblarse en la base del pilus en formación (Maher *et al.*, 1993).

Se cree que el T-pilus de *At* puede iniciar el contacto con las células de la planta. Se han identificado posibles receptores de las células vegetales buscando proteínas de *Arabidopsis thaliana* que se unieran a VirB2 mediante la técnica de dos híbridos en levaduras (Hwang and Gelvin, 2004). En el caso de *Brucella*, mediante ensayos de dos híbridos se ha demostrado que VirB2 interacciona con la proteína de superficie CD98, sugiriendo que VirB2 juega un papel importante en la unión del pilus a la superficie de la célula huésped (Llosa *et al.*, 2009).

VirB5 / Trw J. VirB5 es considerado el componente minoritario de pilus. Es exportada hacia el periplasma, donde interacciona con VirB2 para posteriormente localizarse extracelularmente formando parte del pilus (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999b; Yuan *et al.*, 2005). Su posición exacta en el pilus no está del todo clara. Estudios de mutantes de TraC (homóloga de VirB5 del plásmido pKM101) en cuanto a la susceptibilidad de ser atacados por bacteriófagos (Yeo *et al.*, 2003) parecen sugerir que VirB5 se localiza tanto en la base como en la punta del pilus. Más recientemente, usando inmunomicroscopía electrónica, VirB5 se ha detectado en la

punta de los pili, tanto enteros como fragmentados (Aly and Baron, 2007). Por lo tanto, estos datos sugieren que bien VirB5 se encuentra en la punta del pilus, o bien que reside dentro de la estructura por lo que sólo se puede observar en el final de los pili rotos.

Su función más probable es la de adhesina, permitiendo el contacto del pilus con las células receptoras. En *Bartonella henselae* (*Bh*), VirB5 es una proteína inmunodominante en pacientes que presentan la enfermedad de “cat-scratch”, y se cree que juega un rol importante en mediar la interacción con la célula eucariota durante la infección (Dehio, 2004; Padmalayam *et al.*, 2000). Además, las duplicaciones de los genes homólogos de *virB2* y *virB5* en el sistema *trw*, uno de los dos T4SS presentes en muchas especies de *Bartonella* (Schroder and Dehio, 2005), parecen indicar una adaptación de la bacteria contra el sistema inmune del huésped, o bien, una adaptación que le permite interactuar con distintos receptores de la célula huésped. Interesantes son también los estudios que han mostrado que la eficiencia conjugativa de una cepa de *Ec* portadora de un plásmido derivado de pKM101 al que le falta el gen TraC (homólogo de VirB5) fue recuperada por una aportación de TraC extracelular (More *et al.*, 1996).

La resolución de la estructura por rayos X de TraC (Figura 9) proporciona pruebas adicionales en cuanto a esta función en esta familia de proteínas (Yeo *et al.*, 2003).

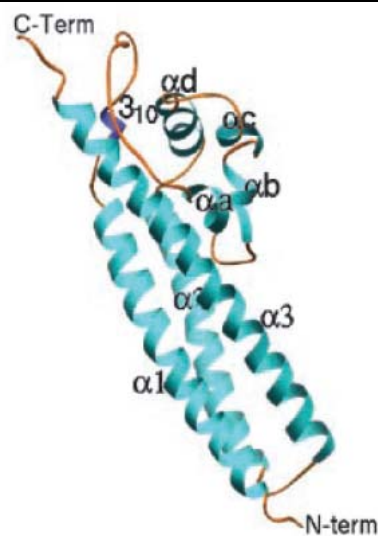


Figura 9. Estructura cristalográfica de un monómero TraC de pKM101. Tomada de (Yeo *et al.*, 2003).

Dicha proteína consta de tres α -hélices rígidas y un apéndice globular flexible que podría servir como un sitio de interacción con otras proteínas. La región Ct está expuesta, y cambios en dicha región tienen impactos en la capacidad de la selección del huésped (Aly and Baron, 2007). Distintos mutantes de TraC generados en esta región expuesta son capaces de ser incorporados en el pilus, aunque no existe correlación entre la capacidad infectiva de los bacteriófagos a través de esos pili y la eficiencia de transferencia del plásmido a través de ellos (Yeo *et al.*, 2003). Además, datos recientes de *At* y *Helicobacter* indican que VirB5 podría mediar en el contacto con receptores específicos de la célula huésped (Backert and Selbach, 2008). Por lo tanto, estos datos se suman a la evidencia que sugiere que las proteínas homólogas a VirB5 pueden tener una función de adhesión a la célula receptora.

2.2.3. Componentes del núcleo central del T4SS

VirB3 / Trw M. La familia de VirB3 es una de las grandes desconocidas. En lo que se refiere a su localización, hay cierta controversia. Algunos estudios apuntan a que proteínas de la familia de VirB3, concretamente de *At*, se localizan principalmente en la membrana externa (Jones *et al.*, 1994); sin embargo, otros predicen localizaciones en la membrana interna, tanto en el caso de *At* como en los homólogos de los plásmidos F y RP4 (Beijersbergen *et al.*, 1994; Grahn *et al.*, 2000; Lawley *et al.*, 2003). Apoyando esta última hipótesis, tenemos la observación de que se encuentran altamente conservados motivos transmembrana de esta proteína, datos más consistentes para una proteína integral de membrana interna (Christie *et al.*, 2005). Más curioso es el caso del T4SS pVIR de *Campylobacter jejuni*, donde una de las subunidades es una proteína compuesta por la fusión de dos dominios similares a VirB3 y VirB4 (Batchelor *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que VirB4 es una proteína que se encuentra predominantemente en la cara citoplasmática de la membrana interna y que no está claro si tiene segmentos transmembrana, podría ocurrir que VirB3 formara un complejo con VirB4 permitiendo a esta anclarse a la membrana interna (Christie *et al.*, 2005).

VirB6 / TrwI. Esta familia de proteínas presentan una baja homología en su secuencia con la excepción de una región conservada que se sitúa aproximadamente entre los residuos 170 y 205 de VirB6 de *At* y que incluyen residuos Trp necesarios para la función de la proteína (Cao and Saier, 2001; Judd *et al.*, 2005b; Lawley *et al.*, 2003).

Es una proteína integral y politópica de membrana interna, con un tamaño medio de 369 aa y posiblemente, al menos, cinco regiones transmembrana (Jakubowski *et al.*, 2004). Esto ha complicado su caracterización. Tiene una región periplasmática Nt y una citoplasmática Ct. Parece existir un “loop” central cuya estructura secundaria es importante para la translocación del DNA (Jakubowski *et al.*, 2004). A este respecto, VirB6 de *At* comparte ciertas similitudes con ComEC de *Bacillus subtilis*. Esta proteína pertenece al sistema de competencia de la bacteria y posee un “loop” largo y central periplasmático cuya estructura secundaria también es importante para la translocación del DNA (Draskovic and Dubnau, 2005).

VirB6 parece interaccionar con otras proteínas del T4SS estabilizándolas, así como tener un rol importante en la formación de complejos entre VirB7 y VirB9. Así, la ausencia de VirB6 reduce los niveles de VirB5, VirB3 y homodímeros de VirB7, y la sobreproducción de VirB6 crea la formación de heterodímeros de VirB7-VirB9 aberrantes (Berger and Christie, 1994; Hapfelmeier *et al.*, 2000; Jakubowski *et al.*, 2003). Al igual que otros componentes del T4SS, VirB6 se localiza en los polos celulares de *Agrobacterium*, y dicha localización polar depende de VirB8, sugiriendo por lo tanto también una interacción entre estas dos proteínas (Judd *et al.*, 2005b; Judd *et al.*, 2005c).

VirB8 / TrwG. VirB8 es un componente central del T4SS y las evidencias disponibles hasta ahora sugieren que tiene un rol muy importante en la iniciación del ensamblaje del T4SS (Baron, 2006). VirB8 (de unos 246 aa de media) es una proteína de membrana con un Nt corto citoplasmático, una región transmembrana y una larga región periplasmática conservada. Una de las características principales, es que interacciona con otras muchas proteínas del canal como se ha demostrado por métodos tan variados como dos híbridos, inmunomicroscopía electrónica, inmunofluorescencia, cross-linking o inmunoprecipitación (Baron, 2006; Das and Xie, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2005). El hecho de que interaccione con gran parte de las proteínas del T4SS, pero no sea una proteína especialmente grande, puede significar que dichas interacciones sean secuenciales. Todos los componentes del T4SS han sido detectados en los polos de *At* en las primeras etapas en el ensamblaje del T4SS (Judd *et al.*, 2005a). Sin embargo, muchas de ellas, excepto VirB3, VirB4 y VirB11 se encontraron distribuidas a lo largo de toda la bacteria en una cepa deficiente en VirB8, sugiriendo

que puede funcionar dirigiendo al resto de proteínas hacia el polo. Aunque la mayoría de las interacciones de VirB8 ocurran en la región periplasmática, también hay indicios que implican que la región Nt citoplasmática así como la región transmembrana pueden estar implicadas en interacciones específicas con otras proteínas y/o con el sustrato translocado (Patey *et al.*, 2006).

VirB4 es esencial en los primeros pasos de la biogénesis del pilus para la estabilización de VirB8 (Yuan *et al.*, 2005). También en las primeras etapas parece jugar un papel importante VirB8 en la interacción con VirB9 y VirB10 (Das and Xie, 2000; Kumar *et al.*, 2000). Además, juega un papel fundamental en pasos posteriores como la formación del T-pilus vía VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 (Yuan *et al.*, 2005). VirB8 formar dímeros, como ha sido testado *in vitro* en *Bs*, y parecen haberse encontrado dos residuos importantes en la interacción con VirB10 y VirB4 (Paschos *et al.*, 2006). Por último, también se ha mostrado que VirB8 en *At* se une a los sustratos translocados (Cascales and Christie, 2004a), implicando por lo tanto distintas funciones de VirB8 a distintos niveles.

La estructura cristalográfica de la región periplásmica de VirB8 ha sido determinada y ha servido para establecer los dominios claves en la dimerización de dicha proteína (Figura 10) (Terradot *et al.*, 2005).

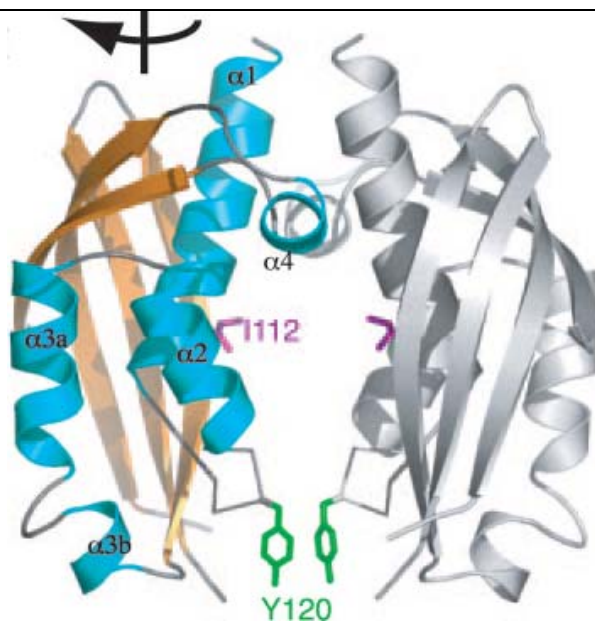


Figura 10. Estructura cristalográfica de un dímero de VirB8 de *Bs*. Tomada de (Terradot *et al.*, 2005).

El complejo VirB7-VirB9-VirB10/ TrwH-TrwF-TrwE. Trabajos tempranos bioquímicos y genéticos pusieron de manifiesto múltiples interacciones entre estos tres elementos de los T4SS. Recientemente se ha resuelto por criomicroscopía la estructura del complejo central, formado por un heteromultímero de 14 subunidades de VirB7-VirB9-VirB10 con un canal interno conectando la membrana interna con la membrana externa (Figura 11A) (Fronzes *et al.*, 2009).

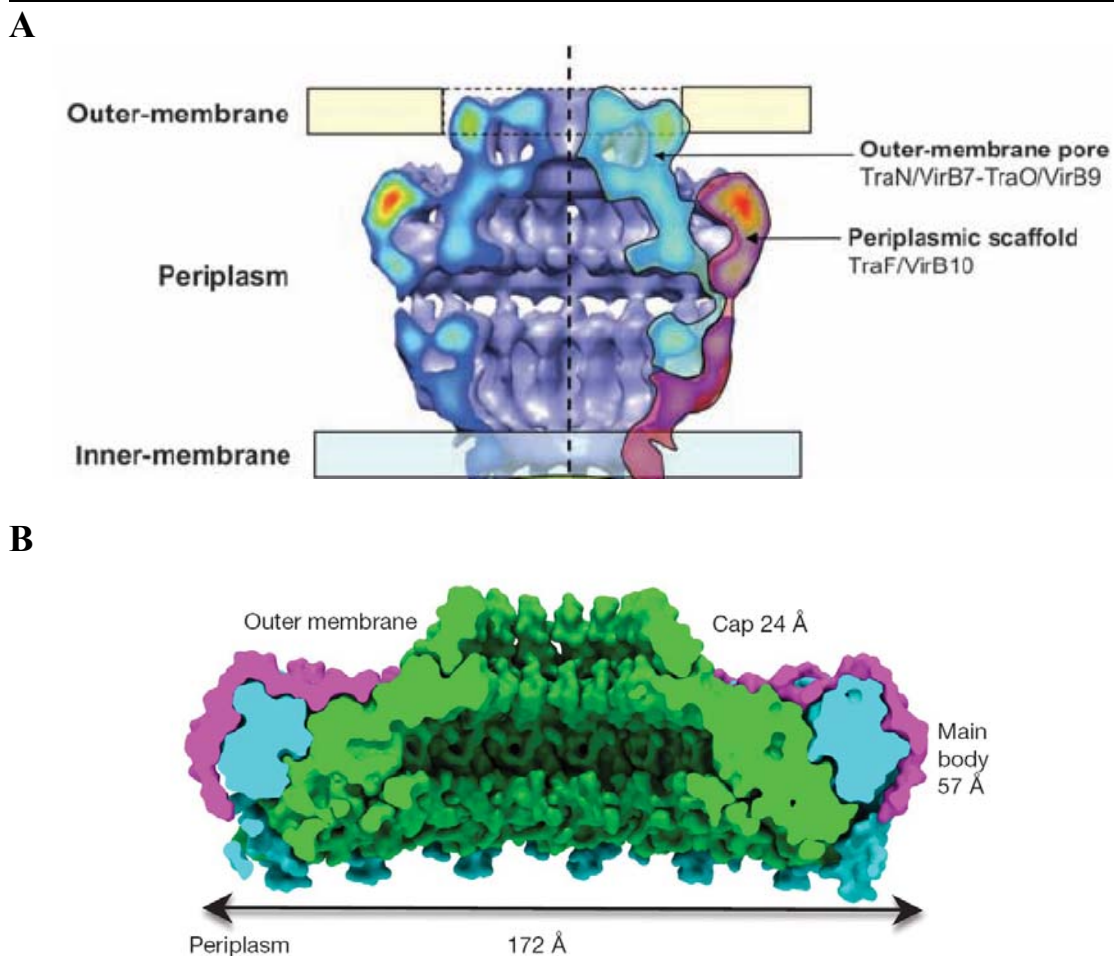


Figura 11. **A**, Estructura 3D obtenida por criomicroscopía electrónica del “core complex” a 15 Å de resolución (Fronzes *et al.*, 2009). **B**, Estructura 3D obtenida por difracción de rayos X de la parte situada en la membrana externa del “core complex” (Chandran *et al.*, 2009). Las subunidades se muestran en distintos colores. VirB7 en rosa, VirB9 en azul y VirB10 en verde.

Las proteínas de la familia VirB9 llevan señales peptídicas para ser exportadas al periplasma. Se encuentra anclada a la cara interna de la membrana externa en complejo

con la pequeña lipoproteína VirB7 (unos 58 aa de media), que porta típicas secuencias señal de lipoproteínas (Anderson *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1997b). En *At*, VirB9 y VirB7 se encuentran unidas covalentemente mediante puentes disulfuro entre residuos de Cys, siendo VirB7 el nexo de unión con el pilus. Sin embargo, dichos residuos no están conservados en todos los T4SS, y no fueron esenciales para la interacción cuando se usó el sistema de dos híbridos en levaduras, sugiriendo que tal vez esta unión covalente puede ser sustituida por fuertes interacciones proteicas no covalentes (Das *et al.*, 1997). Distintas variantes de VirB9 revelan que estas proteínas no sólo juegan un papel importante en el ensamblaje del T-pilus, sino que también tiene un rol en la selección del sustrato (Jakubowski *et al.*, 2005). El hecho de que cambios en VirB9 pueden afectar diferentemente a la translocación de los distintos sustratos de *At*, evidencia que VirB9 podría no sólo formar parte del canal, sino funcionar también como un modulador de la translocación en el poro (Stahl *et al.*, 1998).

VirB10, además de formar parte del complejo con VirB9 y VirB7 (Figura 11A), es un componente del T4SS con unas características muy interesantes. Es una proteína que se encuentra situada principalmente en el periplasma. Cuenta con una pequeña cola Nt citoplasmática, una región transmembrana, y la mayoría de los homólogos poseen justo después una región rica en Prolina que se extiende hacia el periplasma (Cascales and Christie, 2004b). Además de las interacciones demostradas entre VirB9 y VirB7, también hay evidencias de interacciones con VirB4 y VirB11 (Ward *et al.*, 2002). Pero quizás son dos las características más importantes de esta proteína. Por un lado, VirB10 interacciona con VirD4 (TrwB), proteína acopladora que une el sustrato con el canal (Gilmour *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2003). Por el sistema de dos híbridos bacteriano se ha visto que TrwE interacciona consigo misma, formando oligómeros y con la proteína acopladora TrwB. Esta interacción se pierde cuando se eliminan los dominios transmembrana de TrwB o TrwE, lo que sugiere que la interacción tiene lugar entre el segmento de membrana o periplasmático de ambas proteínas (Llosa *et al.*, 2003). La otra interesante característica es la de ser una proteína que sufre cambios conformacionales dependientes de energía, sugiriendo una función similar a las proteínas homólogas TonB (Cascales and Christie, 2004b). Además, las diferencias detectadas recientemente entre las estructuras cryo-EM y rayos-X del complejo virB7-virB9-VirB10, podrían sugerir diferentes estados energéticos, donde VirB10 se postula como la proteína que modularía la conformación del canal, permitiendo, o no, el paso de

los sustratos (Chandran et al., 2009). Estos resultados están en concordancia con el hecho de ser una proteína que une el sustrato con el canal, vía VirD4 (con actividad ATPasa), pudiéndose transmitir la energía a través del periplasma, aunque el T-DNA translocado no se une directamente a VirB10 (Cascales and Christie, 2004a). Además, VirB10 parece un modulador importante e independiente entre la secreción de los sustratos y la biogénesis del pilus (Jakubowski *et al.*, 2009).

El análisis de la estructura obtenida del complejo central (Fig. 11A) proponía que la parte externa de dicho complejo estuviese formada por VirB7/B9 (Fronzes et al., 2009). Sin embargo, un estudio muy reciente ha determinado la estructura de la parte externa del complejo por difracción de rayos X (Chandran *et al.*, 2009), desvelando unos datos sorprendentes. La estructura muestra cómo el poro externo del complejo no está formado por VirB7, como se creía, sino por la propia VirB10. VirB10 forma una proyección en la membrana externa compuesta por dos α -hélices, y las 14 copias de estas dos α -hélices forman el poro que atraviesa la membrana externa (Figura 11B). Esto convierte a VirB10 en una proteína que atraviesa toda la membrana de la bacteria, tanto la externa como la interna. Sin embargo, no se han encontrado evidencias de que VirB10 interaccione con el sustrato, y puesto que se encuentra en el interior del complejo, Chandran y colaboradores proponen que VirB2 podría formar un conducto en el interior del complejo, aislando así el sustrato de VirB10.

2.2.4. Las ATPasas citoplasmáticas

VirB4 / TrwK. VirB4 es la subunidad más grande (unos 815 aa de media) que constituye el T4SS. Contiene los dominios Walker A y Walker B característicos de proteínas con función ATPasa. Durante unos años hubo controversia acerca de la capacidad de esta proteína para hidrolizar ATP. Pero la presencia de los dominios Walker y el hecho de que dichos dominios fueran fundamentales para su funcionalidad (Berger and Christie, 1993; Rabel *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2005) sugerían la función hidrolítica de ATP. Un trabajo más reciente ha demostrado *in vitro* que TrwK es capaz de hidrolizar ATP en ausencia de sus sustratos potenciales y de otros componentes del T4SS (Arechaga *et al.*, 2008).

En cuanto a su localización en la membrana, hay cierta controversia. Modelos informáticos predicen varios segmentos transmembrana, datos consistentes con estudios de susceptibilidad a proteasas que indican posibles segmentos transmembrana en la región Nt de la proteína (Dang and Christie, 1997; Rabel *et al.*, 2003). Sin embargo, también existen evidencias de homólogos como TraC_F y TrhC_{R27} que se asocian a la membrana a través de interacciones proteicas con otras subunidades (Gilmour *et al.*, 2001; Schandel *et al.*, 1992). Pero quizá la prueba más determinante a favor de la hipótesis de que TrwK no es una proteína anclada a la membrana interna gracias a segmentos transmembrana, sino a interacciones con otras proteínas, sea el hecho de que se haya podido purificar TrwK sin utilizar detergentes (Arechaga *et al.*, 2008). Como hemos señalado anteriormente, VirB3 podría ser la proteína candidata por la cual se ancle VirB4 a la membrana interna.

Aunque aún no se cuenta con la estructura 3D por difracción de rayos X de esta proteína, parece cada vez más evidente su naturaleza hexamérica, tanto por predicciones bioinformáticas (Middleton *et al.*, 2005), como por análisis de gel filtración (Yuan *et al.*, 2005) y por velocidad de sedimentación (Arechaga *et al.*, 2008).

Mediante interacciones proteína-proteína, VirB4 estabiliza directamente a las proteínas VirB3 y VirB8, e indirectamente, vía VirB8, permite la formación de los complejos VirB2-VirB5 y su incorporación al pilus (Jones *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 2005). El sitio activo (Walker A) de VirB4 es imprescindible para la transferencia de los sustratos en el caso de *At*, pero no para la formación del T-pilus (Yuan *et al.*, 2005), lo que parecería indicar que la actividad ATPasa de VirB4 es esencial para el transporte de los sustratos a través del canal, pero que no interviene en la biogénesis del pilus.

VirB11 / TrwD. Esta familia de proteínas está bien estudiada tanto a nivel estructural como desde el punto de vista funcional. Es una proteína muy conservada que no sólo se encuentra en T4SS sino que también está presente en T2SS (Planet *et al.*, 2001). No tiene evidentes regiones transmembrana, pero está asociada a la membrana interna. La estructura hexamérica de la proteína ha sido caracterizada mediante microscopía electrónica en el caso del homólogo en RP4 y *H. pylori* (Krause *et al.*, 2000a). Se ha demostrado la actividad ATPasa de los homólogos TrbB de RP4 y TrwD de R388, actividad estimulada por la presencia de fosfolípidos en la reacción, sugiriendo

que se energiza en contacto con la membrana (Krause *et al.*, 2000b; Machon *et al.*, 2002).

Análisis de ciertas variantes de VirB11 *At* indican que la proteína es requerida tanto para la translocación del sustrato (Cascales and Christie, 2004a) como para en ensamblaje del T4SS (Sagulenko *et al.*, 2001). Además, en este estudio, se vio que ciertos mutantes de VirB11 son defectivos únicamente en la formación del T-pilus o en la transferencia del sustrato, indicando que ambas funciones pueden ser independientes.

El homólogo de VirB11 HP0525 de *H. pylori* fue el primer componente del T4SS cuya estructura se resolvió por rayos X (Yeo *et al.*, 2000) (Figura 12), revelando la naturaleza hexamérica de la proteína, con una cámara central que se encuentra abierta en un extremo y cerrada en el otro. La distribución de las cargas parecen indicar que una de las caras de la proteína puede asociarse con la membrana interna, y se cree que la hidrólisis de ATP abre y cierra la cámara central permitiendo translocar el sustrato.

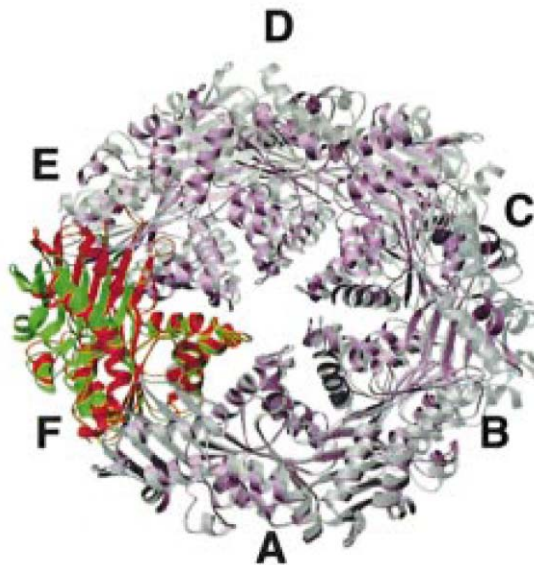


Figura 12. Estructura del hexámero HP0525 (VirB11) del T4SS de *H. pylori*. Las letras representan cada uno de los monómeros del hexámero. Tomada de (Yeo *et al.*, 2000).

Una función que se ha postulado sobre VirB11 es su posible función como chaperonina (referencias articulo). Podría actuar facilitando el movimiento de proteínas desplegadas y DNA a través del T4SS.

La proteína acopladora (T4CP): VirD4 / TrwB. Las proteínas acopladoras se pueden considerar como un elemento más de los T4SS. Sirven como nexo de unión entre el T4SS y el sustrato, habiendo interacciones específicas tanto con el T4SS como con el sustrato. Se encuentran presentes en todos los T4SSc y en algunos T4SSp, jugando un papel fundamental en el transporte del sustrato pero siendo independientes de la biogénesis del T4SS. Las proteínas acopladoras más conocidas son VirD4 de *At* y TrwB del plásmido R388. Esta última ha sido el modelo para analizar la estructura y función de las T4CP. Al ser TrwB uno de los objetivos de este trabajo, se tratará en una sección aparte (2.5.4).

2.3. MODELO FUNCIONAL DE SECRECIÓN TIPO IV

En los últimos años, se han sentado las bases para entender la transferencia del DNA a través de los componentes que forman el T4SS, gracias a ensayos funcionales que se han sumado a los datos estructurales.

Un excelente trabajo utilizó ensayos de inmunoprecipitación del T-DNA con las proteínas del T4SS (TrIP) para determinar el camino que el T-DNA sigue a lo largo del T4SS hacia el exterior (Cascales and Christie, 2004a) (Figura 13). El primer contacto del T-DNA tiene lugar con la T4CP VirD4, y a continuación con la ATPasa VirB11. En este paso no es necesaria la hidrólisis de ATP por parte de ninguna de las proteínas, sin embargo, si que son necesarias las proteínas que forman el núcleo del T4SS (Atmakuri *et al.*, 2004; Cascales and Christie, 2004a).

En el siguiente paso, VirB6 y VirB8 forman un punto intermedio importante para la translocación del DNA. La transferencia del DNA hacia VirB6 y VirB8 requiere gasto de energía por parte de las proteínas VirD4, VirB11 y VirB4, así como la presencia del núcleo del T4SS (Atmakuri *et al.*, 2004; Cascales and Christie, 2004a). Distintos mutantes de VirB6 sugieren que el anillo P2 forma parte directa del canal siendo importante para interaccionar con el sustrato, mientras que mutantes en otras

regiones de VirB6 impiden el contacto del DNA con VirB8 (y no con VirB6) o el contacto con VirB2 y VirB9 (pero no con VirB6 y VirB8) (Jakubowski et al., 2004).

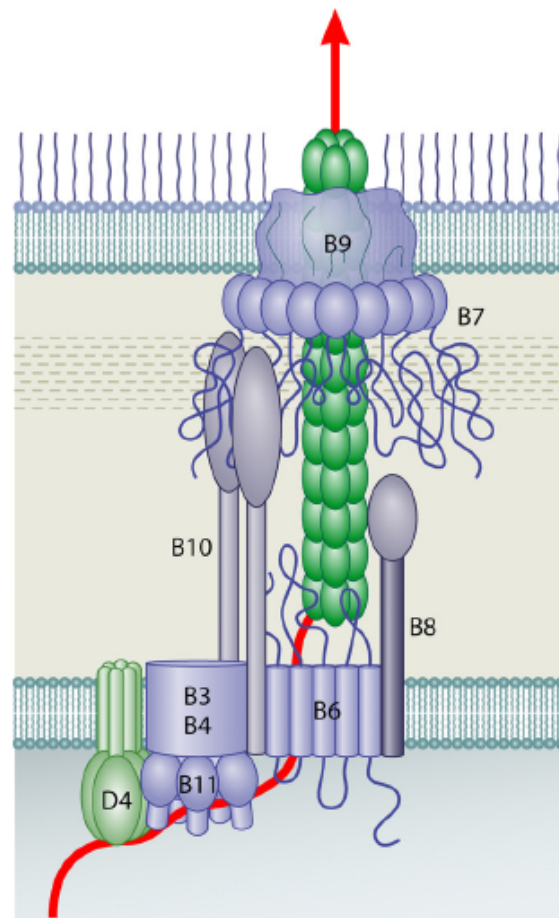


Figura 13. Vía de translocación del sustrato. Dicha vía, representada en rojo, fue predicha en el sistema VirB de *At*, basándose en la interacción del T-DNA con las distintas subunidades del T4SS identificada mediante formaldehído cross-linking (Cascales and Christie, 2004a). Imagen tomada de (Alvarez-Martinez and Christie, 2009).

Por último, en el siguiente paso están implicadas VirB2 y VirB9, que forman parte de la región distal del T4SS, la más cercana al pilus. VirB2 forma parte del pilus y del canal, siendo la forma celular de VirB2 esencial para la transferencia del sustrato a través de la membrana. Esto podría explicar que mutantes en VirB2 tengan fenotipos Tra^+ y pilus^- . A su vez, la región Nt de VirB9 parece ser un punto de selección del sustrato, regulando la transferencia del mismo hacia el exterior de la bacteria (Jakubowski et al., 2005).

Aunque no se han detectado contactos del DNA con VirB3, VirB5 y VirB10, la presencia de estas proteínas es importante en la translocación del sustrato de VirB6 y VirB8 a VirB2 y VirB9. Cómo influyen VirB3 y VirB5 aún está por determinar; sin embargo, el cambio conformacional que sufre VirB10, estableciendo un complejo estable con VirB9, podría estar relacionado con el paso del sustrato a VirB9 y VirB2.

La resolución de la estructura VirB10-VirB9-VirB7 (Fronzes *et al.*, 2009) y del complejo externo a mayor resolución (Chandran *et al.*, 2009) es crucial para entender el mecanismo de secreción. Dicha estructura, en su región más externa (hacia la ME), presenta un poro de 32 Å, sugiriendo que el canal tiene que abrirse para el paso de los sustratos. Esto concuerda con los cambios conformacionales que sufre VirB10 tras la transducción de la energía vía las ATPasas citoplasmáticas VirD4, VirB11 y/o VirB4., En base a los recientes resultados de estructura del complejo exterior, al estar el poro externo compuesto por la propia VirB10, sus cambios estructurales modularían la apertura del canal.

Es interesante que la región periplasmática central sea el punto más débil de la estructura. Esto podría sugerir la entrada de ciertos sustratos al interior del canal desde el periplasma. No hay que descartar esta posibilidad, ya que existen indicios de que podría existir un intermediario periplasmático en el proceso de secreción. Así, la toxina *pertussis* es transportada al exterior por el T4SS Ptl, pero anteriormente las 5 subunidades de la toxina son exportadas al periplasma por el sistema Sec (Covacci and Rappuoli, 1993; Weiss *et al.*, 1993). También en el sistema VirB de *At* se ha sugerido la posibilidad de un intermediario periplasmático independiente de secreción tipo IV (Chen *et al.*, 2000), aunque nunca ha sido comprobado posteriormente.

2.4. SUSTRATOS Y SEÑAL DE SECRECIÓN

Diversos grupos han trabajado en determinar los sustratos de los distintos T4SS, así como en definir qué convierte a una proteína en sustrato de un T4SS determinado (la señal de secreción). A continuación se resumen los resultados obtenidos para distintos T4SS. La Tabla 1 resume la lista de efectores conocidos de los T4SS más relevantes, y

la Figura 14 muestra las características de las señales de secreción que han sido determinadas en distintos T4SS.

Como era de esperar, dada la especificidad de los T4SS por sus sustratos, no hay una señal de secreción universal, pero sí una regla general: los 20 residuos del extremo C-terminal del sustrato son imprescindibles (aunque no siempre suficientes) para que la proteína sea reconocida por el T4SS.

Organismo/Plásmido	Nombre	Función	Sustratos conocidos
a) T4SS implicados en infección de células animales (codificados en el cromosoma)			
<i>Anaplasma</i> spp	VirB/D4	Infección de macrófagos	AnkA, Ats-1
<i>Bartonella henselae</i>	Trw	Adhesión a eritrocitos	Ninguno
	VirB/D4	Infección de células endoteliales	BepA-G
<i>Brucella</i> spp	VirB	Infección de macrófagos	VceA, VceC
<i>Coxiella burnetii</i>	Dot/Icm	Infección de fagocitos	Múltiples efectores
<i>Ehrlichia chaffensis</i>	VirB/D4	Infección de macrófagos	Ninguno
<i>Helicobacter pylori</i>	Cag	Infección de células gástricas	CagA, peptidoglicanos
<i>Legionella pneumophila</i>	Dot/Icm	Infección de macrófagos	DNA, múltiples efectores
<i>Bordetella pertussis</i>	Ptl	Infección del epitelio ciliado	PT
b) T4SS implicados en transferencia de DNA (codificados en plásmidos o islas genómicas)			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi	VirB/D4	Transferencia de T-DNA a plantas	T-DNA, VirD2, VirD5, VirE2, VirE3, VirF
<i>Escherichia coli</i> pKM101	Tra	Plásmido conjugativo	DNA, TraI ¹
<i>Escherichia coli</i> R1	Tra	Plásmido conjugativo	DNA, TraI ¹
<i>Escherichia coli</i> R388	Trw	Plásmido conjugativo	DNA, TrwC
<i>Haemophilus influenzae</i> GI	Tfc	Transferencia horizontal	DNA
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> GI	Tra	Transferencia y secreción de DNA	DNA, TraI ¹
<i>Streptococcus pIP501</i>	Tra	Plásmido conjugativo	DNA, TraA ¹

Tabla 1. Efectores conocidos más relevantes, implicados en conjugación o patogenicidad.

¹ El transporte de la relaxasa se asume basado en la homología con otros sistemas de transferencia de DNA

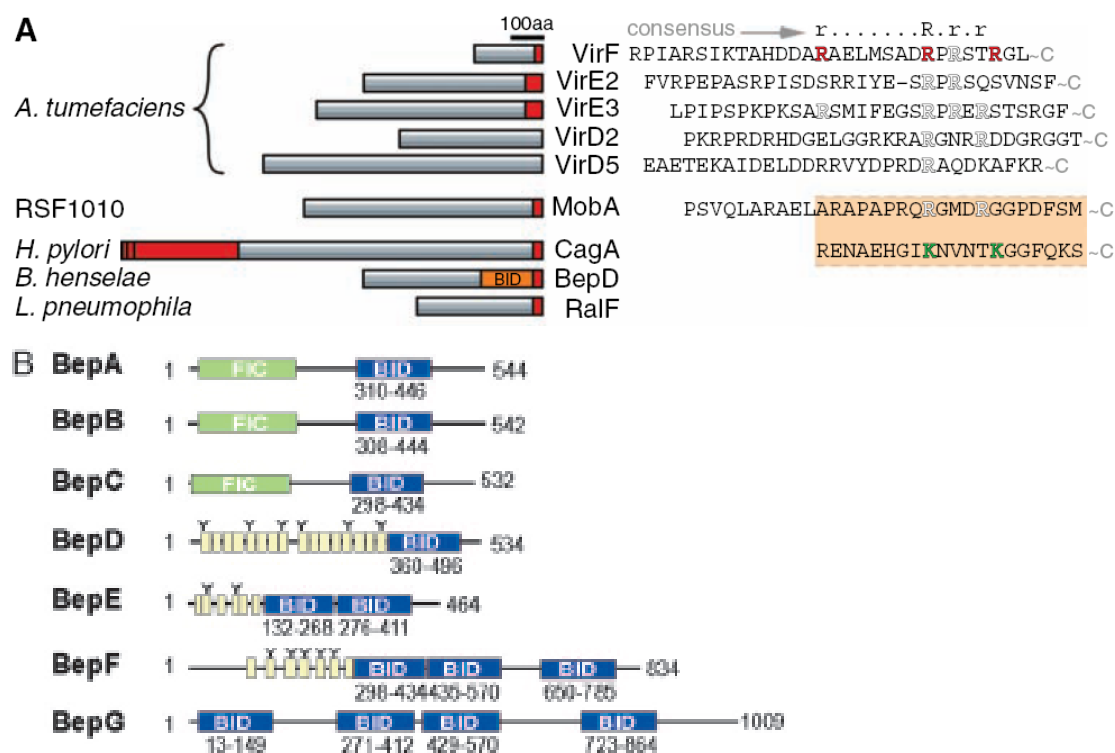


Figura 14. A, Representación de distintos sustratos (gris) donde se señalan sus señales de secreción (rojo). A la derecha se muestra una comparación de sus secuencias en su extremo Ct. Figura tomada de (Cambromne and Roy, 2006).

B, representación de los distintos efectores Beps conocidos en *Bartonella*. Los bloques amarillos representan secuencias repetidas de tirosinas, motivos de fosforilación (representado por Y). Los bloques azules representan los dominios BID, y los verdes los llamados dominios FIC (Schulein *et al.*, 2005).

T4SS VirB de *At* Se conocen multitud de efectores de este sistema (Tabla 1). Un primer estudio sobre el sustrato VirE2 demostró que los 30 residuos de la región Ct son necesarios y suficientes para el reconocimiento del sustrato. De hecho, la obstrucción de esta región evita la transferencia del sustrato (Vergunst *et al.*, 2000). Un análisis mutacional riguroso en el sustrato VirF ha revelado el motivo consenso de exportación (RX₇RXRXX(n)), donde el carácter hidrofílico, y sobre todo los residuos cargados positivamente, son las características definitorias de la señal de secreción (Schulein *et al.*, 2005). Se han encontrado otros sustratos de T4SS con características similares, incluyendo la relaxasa MobA del plásmido movilizable RSF1010, proteína que es transferida por el T4SS VirB de *At* (Schulein *et al.*, 2005).

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

T4SS Cag de *Helicobacter pylori*. Se ha determinado que los 20 residuos Ct de Cag A (el único sustrato conocido de este sistema hasta el momento), que contienen abundancia de cargas positivas, son esenciales para su translocación, aunque no suficientes (Hohlfeld *et al.*, 2006). CagA también requiere para su secreción una secuencia en su región Nt, sugiriendo que ambos extremos de la proteína son necesarios para su transporte a través del T4SS (Hohlfeld *et al.*, 2006).

T4SS Dot/Icm de *L. pneumophila*. El estudio de las señales de secreción de momento se basa en el estudio del efector RalF. Los 20 residuos Ct de esta proteína son imprescindibles para su transporte, y lo más relevante es un residuo de Leucina en posición -3 del Ct (Nagai and Roy, 2003).

Por otra parte, se ha descubierto que las proteínas IcmS e IcmW forman complejos que se unen a RalF fuera de la región Ct y probablemente antes de que la proteína se pliegue completamente. Por lo tanto, IcmS e IcmW podrían estar actuando como las chaperoninas del T3SS, manteniendo a los efectores parcialmente desdoblados, y facilitando así el reconocimiento de la señal de secreción (Cambronne and Roy, 2007).

Sin embargo, se conocen más de 50 sustratos diferentes de este sistema, por lo que es difícil establecer una secuencia consenso. Por ejemplo, sustratos como LepA y LepB a los que se les ha fusionado otra proteína en su región Ct son capaces de transportarse, sugiriendo que la región Ct no es tan determinante para su transporte (Chen *et al.*, 2004).

T4SS VirB de *Bartonella henselae*. Se conocen hasta la fecha siete efectores de este T4SS (BepA-G), necesarios para la virulencia de *Bh*. Cada efector contiene en su Ct una señal de translocación, compuesta de unos 140 aa, denominada BID (Bep

intracelular delivery), y una cola cargada positivamente pero no muy conservada en su secuencia. Ambos tipos de secuencias son necesarias conjuntamente para la translocación (Schulein et al., 2005). En el caso de BepE-BepG se encuentran otros dominios BID adicionales que no parecen ser requeridos para la translocación pero que han podido adquirir funciones en el huésped. De hecho, BepG está compuesta exclusivamente por 4 dominios BID (Fig. 14B) (Schulein et al., 2005).

2.5 PAPEL DE LOS T4SS EN CONJUGACIÓN

La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia horizontal de información entre bacterias. Implica un contacto físico entre las células donadoras y receptoras. Típicamente, el DNA es transferido de una bacteria donadora a una receptora por un plásmido autotransmisible o por uno movilizable (con la ayuda del primero). En condiciones de laboratorio, también se ha observado transferencia conjugativa de DNA entre organismos de distintos reinos: entre bacterias y plantas (Ward *et al.*, 1988), y entre bacterias y levaduras (Heinemann and Sprague, 1989).

La conjugación también puede implicar la transferencia de secuencias cromosómicas, mediante plásmidos que se integran en el cromosoma, formando así una cepa Hfr (de high frequency of recombination), o por elementos integrativos/conjugativos (ICE, anteriormente conocidos como transposones conjugativos), que codifican las proteínas necesarias para su escisión de la bacteria donadora, la formación de un puente conjugativo y la integración en el genoma de la cepa receptora (Cho *et al.*, 2007).

La maquinaria conjugativa de bacterias Gram negativas puede considerarse compuesta por tres módulos funcionales, que se ensamblan para constituir una maquinaria operativa (Llosa and de la Cruz, 2005):

- el T4SS, que constituye el canal de secreción del DNA.
- la proteína acopladora (T4CP), que pone en contacto el T4SS y el sustrato.
- el relaxosoma, responsable de la formación del sustrato a transferir: la relaxasa unida a una hebra de DNA.

El modelo más aceptado sobre cómo ocurre el transporte del DNA a través del T4SS es el denominado “shoot and pump” (Llosa *et al.*, 2002) (Figura 15). Este modelo considera la conjugación como un mecanismo de replicación de DNA por círculo rodante unido a un T4SS. TrwC se une al DNA en una región específica denominada origen de transferencia u *oriT*, corta una de las hebras del DNA, y se une covalentemente al extremo 5' de la misma, (conformando lo que se conoce como relaxosoma). A partir de aquí se considera que hay dos pasos en la movilización del DNA:

- En el primer paso se secreta la relaxasa, que sería el sustrato proteico reconocido por el T4SS; el DNA sería arrastrado por la proteína de una manera pasiva. .
- En un segundo paso, catalizado probablemente por la T4CP, el DNA sería bombeado activamente a través del T4SS.

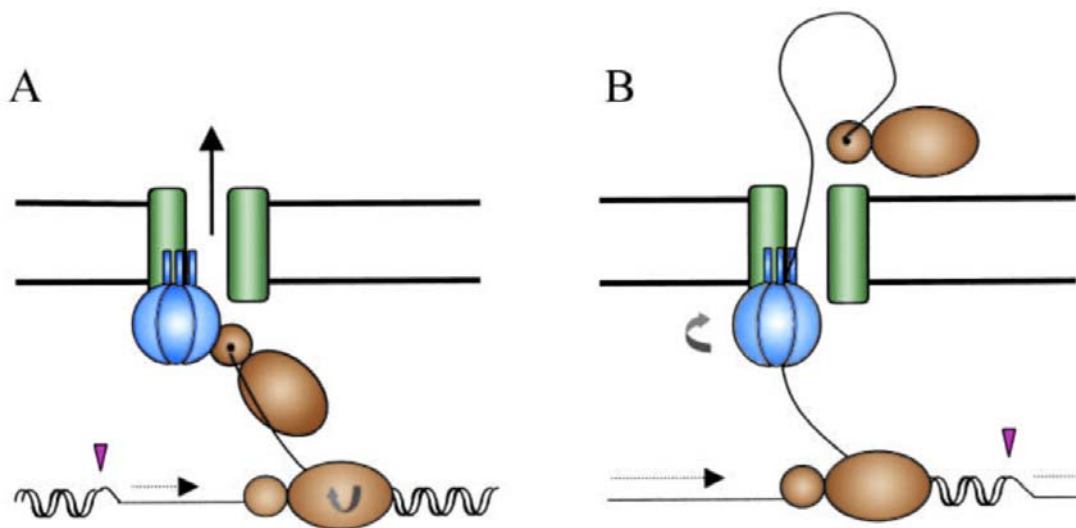


Figura 15. Representación de los dos pasos del transporte conjugativo de DNA según el modelo “Shoot and pump”. Las líneas negras horizontales representan la membrana bacteriana, atravesada por los cilindros verdes que representan el T4SS. La relaxasa está representada en marrón, mientras que en azul se representa la T4CP anclada a la membrana. El DNA se representa por la delgada línea negra, mientras que la nueva hebra replicada de DNA está indicada por la línea negra. En rosa, el sitio de corte en el *oriT*. Las flechas curvas representan un consumo de ATP. **A)** La T4CP une el relaxosoma con el T4SS; un monómero de la relaxasa unido covalentemente al DNA es el sustrato del T4SS. **B)** la T4CP bombea el DNA desde la célula donadora a la receptora, mientras el DNA se sigue replicando en la bacteria donadora. *Figura tomada de (Llosa et al., 2002).*

Mientras el DNA es bombeado a través del T4SS, en la célula donadora la hebra de DNA que no ha sido cortada y transportada va siendo utilizada como molde en una replicación por círculo rodante. Se desconoce si la replicación de la hebra transferida a la célula receptora ocurre a la vez que va entrando en la célula receptora o si la replicación ocurre tras la recircularización del DNA.

2.5.1. El sistema conjugativo de R388

Existen multitud de plásmidos conjugativos, clasificados en grupos de incompatibilidad. El principal objetivo de estudio de este trabajo es el plásmido conjugativo R388, del grupo IncW (Figura 16). Éste es un grupo de plásmidos autotransmisibles pequeños (30-40 Kb). Generan un pilus conjugativo grueso y rígido, que les permite conjugarse en medio sólido, y tienen un amplio rango de huéspedes. R388 fue aislado originalmente en cepas de *Ec* (Ward and Grinsted, 1982).

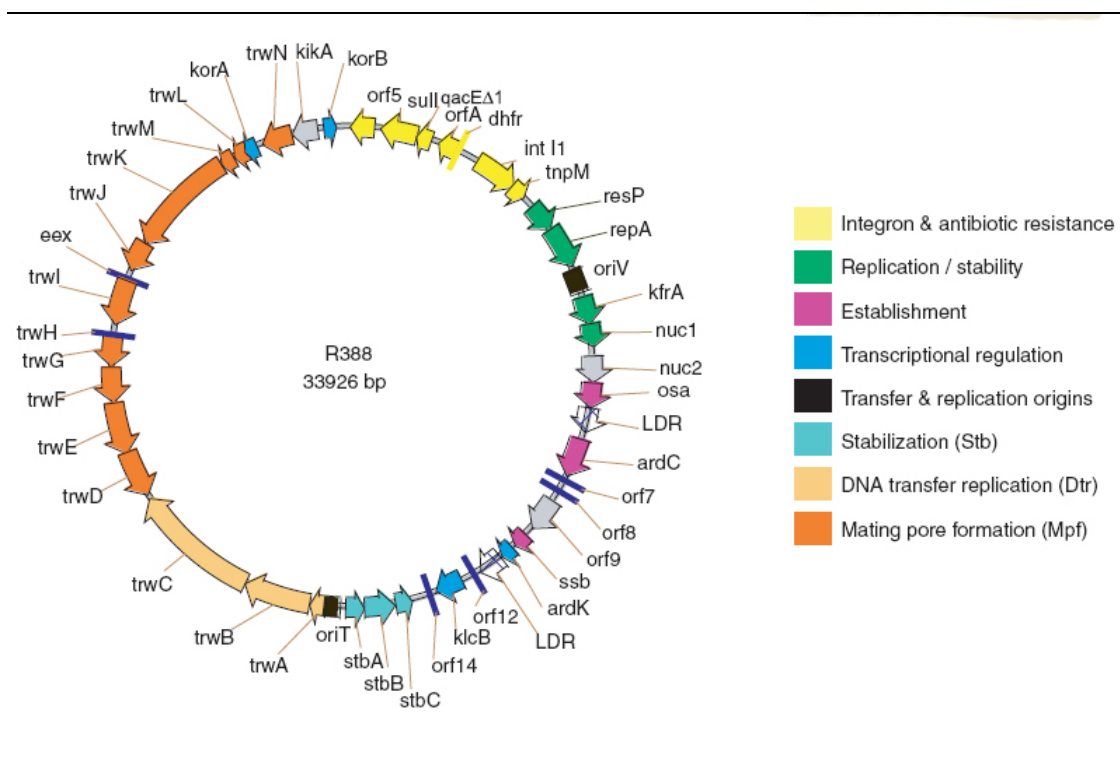


Figura 16. Representación del plásmido conjugativo R388, señalizándose el proceso en el que están envueltos cada uno de los genes. Imagen adaptada de (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006).

Casi la mitad del plásmido está dedicada a codificar los genes implicados en la transferencia conjugativa. Dicha región, denominada Tra_W, se divide en dos regiones: la

región Dtr o Mob_w, y la región Mpf o Pil_w (Figura 17). La región Dtr comprende el *oriT* (lugar donde se inicia la transferencia) y los genes *trwA*, *trwB* y *trwC*, que están implicados en el metabolismo conjugativo del plásmido. La región Mpf contiene los genes que codifican las proteínas que forman el T4SS (TrwD-TrwN) y sus reguladores. Ambas regiones pueden ser separadas y aportadas en *trans*, restituyéndose la capacidad de conjugación (Bolland *et al.*, 1990). El único elemento necesario en *cis* es el *oriT*.

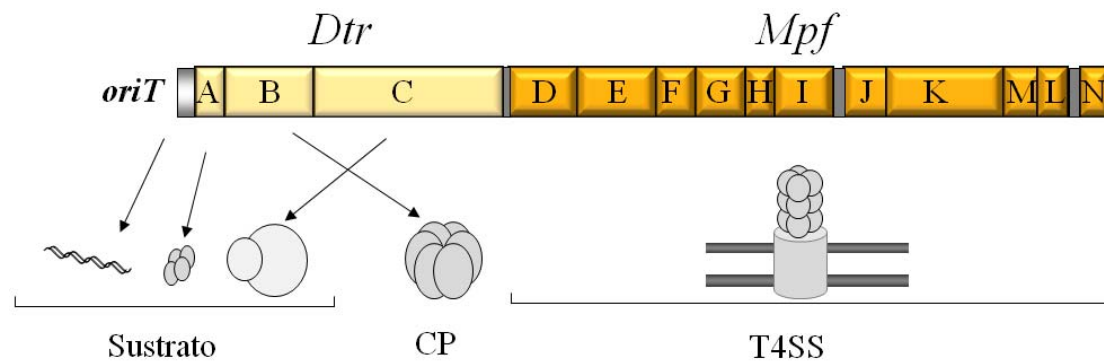


Figura 17. Representación de la región de transferencia del plásmido R388, señalizando los elementos que codifica. Imagen adaptada de Llosa and de la Cruz, 2005.

2.5.2. La región Mpf de R388

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

Se ha estudiado la similitud entre el T4SS de R388 y otros T4SS. Esta región puede intercambiarse por la región Mpf del plásmido IncN pCU1 para movilizar plásmidos con la región Dtr de R388. Sin embargo, los genes individuales de la región Mpf no son intercambiables entre ambos plásmidos. Estos datos sugieren que existe una alta especificidad de reconocimiento entre las proteínas Mpf, mientras que el

reconocimiento del relaxosoma por el T4SS completo es más inespecífico (Bolland et al., 1990).

El análisis bioquímico de los componentes del T4SS de R388 se ha limitado al estudio de TrwD y TrwK, como ya se ha mencionado en secciones anteriores.

2.5.3. La región *Dtr* de R388

Esta región incluye el *oriT* y el operón *trwABC*, que codifica las proteínas TrwA (proteína accesoria del relaxosoma), TrwB (la T4CP), y TrwC (la relaxasa) (Figura 17). Por ensayos de mutantes se ha visto que los genes *trwB* y *trwC* son indispensables para la conjugación de R388 (Llosa et al., 1994a), y la ausencia de *trwA* produce una disminución de la conjugación de 10^5 veces (Moncalian et al., 1997).

Salvo TrwB, que se tratará en la siguiente sección, el resto de integrantes de la región *Dtr* forman parte del relaxosoma, un complejo nucleoproteico que interviene en el procesamiento del DNA para su transferencia. La Figura 18 esquematiza la arquitectura propuesta para el relaxosoma del plásmido R388, que está formado por el *oriT*, la relaxasa TrwC, la proteína accesoria para el corte TrwA, y el factor de integración IHF (Moncalian et al., 1999), éste último codificado por el huésped. Ni TrwA ni TrwC pueden ser sustituidas por sus homólogas en los plásmidos IncN (R46 y pKM101), lo que indica una alta especificidad en la interacción de éstas con el *oriT* (Llosa et al., 1994b).

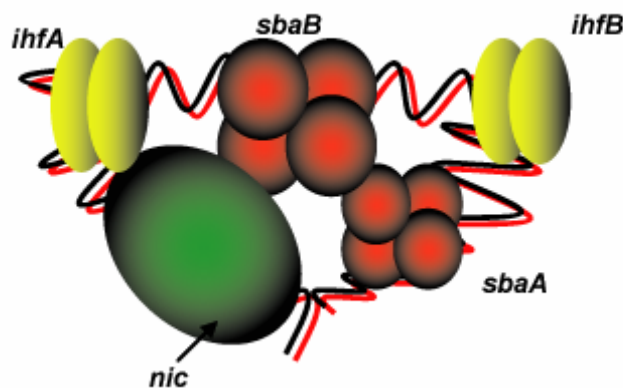


Figura 18. Arquitectura del relaxosoma del plásmido R388. TrwA está representada en rojo, IHF en amarillo y TrwC en verde. Imagen tomada de (Moncalian et al., 1999).

oriT. El *oriT* es definido como la mínima secuencia necesaria en una molécula de DNA para que ese DNA sea transferido eficientemente por conjugación cuando están presentes en *cis* el resto de componentes. En R388, el *oriT* es una secuencia de 330 pb (Llosa *et al.*, 1991), que incluye el sitio *nic*, localizado en el nucleótido 176 (Llosa *et al.*, 1995), una secuencia consenso para la unión de IHF, y una serie de repeticiones directas e invertidas que incluyen los sitios de unión de las proteínas TrwA y TrwC (Moncalian *et al.*, 1997).

TrwA. TrwA es una proteína de 121 aa que tetrameriza en solución formando un complejo de 53 kDa. Contiene en su secuencia una cremallera de leucinas que puede ser responsable de las interacciones proteína-proteína en la oligomerización. TrwA se une específicamente al *oriT* del plásmido R388 en dos sitios, *sbaA* y *sbaB*. La afinidad por el sitio denominado A es 10 veces mayor que por el sitio B. La unión de TrwA a ambos sitios es importante para obtener altas frecuencias de conjugación. A través de esta unión TrwA lleva a cabo dos funciones en la conjugación del plásmido R388. Por una parte, es un represor transcripcional del operón *trwABC*, y por otra parte, aumenta la actividad de relajación de DNA superenrollado por TrwC *in vitro*. El efecto represor también se refleja en el hecho de que su sobreexpresión hace que disminuya la frecuencia de conjugación (Moncalian *et al.*, 1997). Ensayos de *footprinting* con DMSO *in vivo* indican que TrwA está unida al *oriT* en todo momento (Moncalian *et al.*, 1997).

TrwC. TrwC es la relaxasa-helicasa responsable de las reacciones de iniciación y terminación en el procesamiento conjugativo del DNA de R388. Esta proteína pertenece por homología de secuencia a la familia de la relaxasa del plásmido F (Llosa *et al.*, 1994a). Se trata de una proteína de 966 aa que forma dímeros en solución en presencia de 550 mM NaCl (Grandoso *et al.*, 1994). La región de dimerización se encuentra en el extremo Ct (Llosa *et al.*, 1996).

TrwC está compuesta por dos dominios funcionales, uno Nt con actividad relaxasa y otro Ct con actividad helicasa. Se ha comprobado esta división purificando y ensayando diferentes segmentos de la proteína (Llosa *et al.*, 1996). En el proceso conjugativo, el dominio relaxasa produce el corte en el sitio *nic* y el dominio helicasa desenrolla la cadena sencilla que va a ser transferida a la célula receptora. Un mutante

de TrwC con una inserción de 24 aa en el motivo helicasa III tiene un efecto dominante negativo en conjugación, lo que sugiere que TrwC actúa en el proceso conjugativo como un multímero seguramente asociado a su función helicasa (Llosa *et al.*, 1996). Se conoce la estructura 3D del dominio relaxasa (Figura 19) (Guasch *et al.*, 2003) así como los residuos catalíticos (Grandoso *et al.*, 2000). Además de estas dos actividades, TrwC produce recombinación sitio-específica entre secuencias de *oriT in vivo* (César *et al.*, 2006).

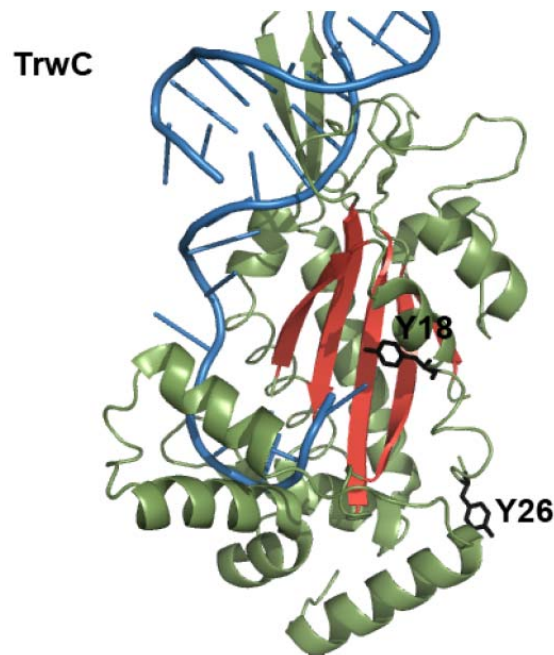


Figura 19. Estructura cristalográfica del dominio relaxasa de TrwC de R388. El dominio central más conservado que corresponde a las 5 hélices β se muestra en rojo. La cadena de DNA unida a TrwC se muestra en azul. Las tirosinas catalíticas son representadas en negro tomada de (Draper *et al.*, 2005).

Se sabe que TrwC entra en la célula receptora, presuntamente guiando a la cadena de DNA, y una vez allí es activa (Draper *et al.*, 2005), lo que sugiere un papel en la terminación de la conjugación. De hecho, la expresión de anticuerpos anti-TrwC en la bacteria receptora, inhibe el proceso conjugativo (Garcillan-Barcia *et al.*, 2007).

2.5.4. La proteína acopladora de R388, TrwB

TrwB es la T4CP del plásmido R388, encargada de poner en comunicación el relaxosoma con el T4SS. Las T4CP están presentes en todos los sistemas conjugativos y presentan una serie de características comunes. Por ejemplo, no están implicadas en las

reacciones de procesamiento del DNA (Llosa *et al.*, 1995; Scheiffele *et al.*, 1995; Tinland *et al.*, 1995) ni en la producción del pilus (Bolland *et al.*, 1990; Lai and Kado, 2000). Poseen una región N-terminal que les ancla a la IM, y motivos Walker A y B en el dominio citoplasmático que sugieren actividad ATPasa. Guardan homología tanto funcional como estructural con las proteínas SpoIIIE y FstK. SpoIIIE es imprescindible en la esporulación de *Bacillus Subtilis*. Su región citoplasmática contacta con el DNA cromosómico y consigue movilizarlo desde la célula madre hacia la preespora (Sharp and Pogliano, 2002). SpoIIIE tiene actividad ATPasa y es capaz de “caminar” a través del DNA en presencia de ATP (Bath *et al.*, 2000; Errington *et al.*, 2001). Por otro lado, la proteína FstK de *Ec*, está implicada en la resolución de dímeros cromosómicos durante la división bacteriana (Recchia *et al.*, 1999). Todos estos datos apuntan a que las T4CP tengan también un papel de motor molecular, bombeando la molécula de DNA al exterior de la bacteria donadora, tal y como sugiere el modelo “shoot and pump” (Llosa *et al.*, 2002; Figura 15).

El prototipo de proteína acopladora es TrwB, relacionada con la T4CP VirD4 de *At*. TrwB es una proteína integral de membrana que contiene en su extremo Nt dos hélices transmembrana teóricas, separadas por un segmento periplasmático pequeño, que le mantienen anclada a la membrana. No obstante, la función de la región transmembrana no es meramente de anclaje a la membrana. TrwB presenta una estabilidad mayor frente a distintos agentes desnaturizantes que su derivado citoplasmático, TrwB Δ N70 (Hormaeche *et al.*, 2004). Este último se comporta como un monómero en solución, mientras que TrwB forma hexámeros (Hormaeche *et al.*, 2002). La región transmembrana también afecta a la especificidad de unión a nucleótidos. TrwB presenta una preferencia por purinas frente a pirimidinas, mientras que la proteína truncada TrwB Δ N70 no presenta ninguna preferencia (Hormaeche *et al.*, 2006).

El término de proteína acopladora se acuñó tras obtenerse evidencias genéticas de que eran proteínas que debían interactuar tanto con el relaxosoma como con el T4SS (Cabezón *et al.*, 1997). Desde entonces, se han buscado las interacciones moleculares de las T4CP con los otros módulos funcionales de las maquinarias conjugativas de diversos sistemas. TrwB es hasta el momento la única T4CP para la que se ha determinado la interacción tanto con el T4SS como con el relaxosoma. TrwB interactúa no sólo con el DNA sino también con las proteínas TrwA y TrwC, que forman parte del relaxosoma

de R388, y con TrwE, proteína que forma parte de la estructura central del T4SS (Llosa *et al.*, 2003).

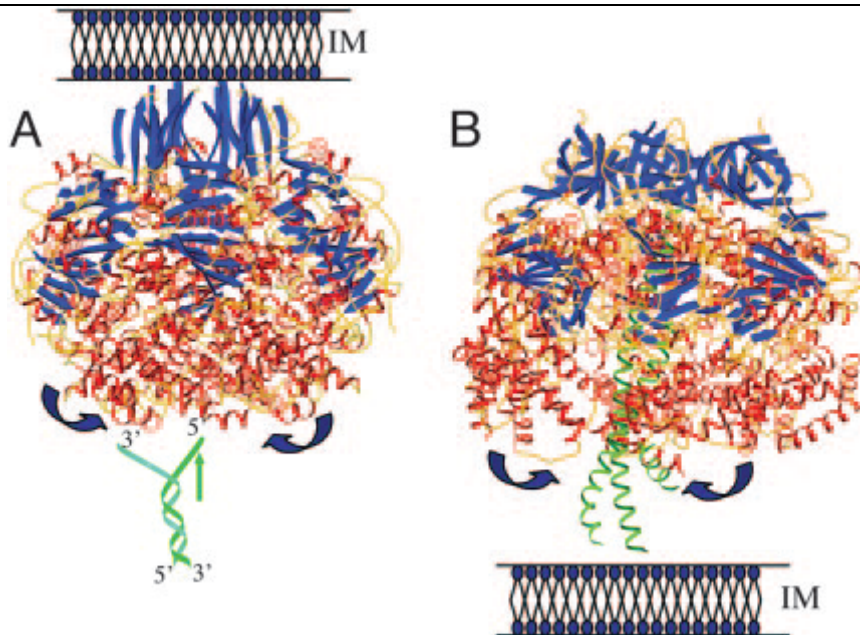


Figura 20. Estructura de la ATPasa F₁ (A) y TrwB (B) en orientaciones opuestas respecto a la membrana interna (IM). Imagen tomada de (Cabezon and de la Cruz, 2006).

La purificación del dominio citoplasmático TrwB Δ N70 permitió la determinación de la estructura 3D (Figura 20). TrwB Δ N70 muestra una estructura cuaternaria consistente en un hexámero que forma una estructura casi esférica con un canal central de unos 20Å (Gomis-Ruth *et al.*, 2001; Gomis-Ruth *et al.*, 2002). Cada monómero está compuesto de dos dominios principales: el dominio de unión a nucleótidos (NBD, de nucleotid binding domain) y un dominio todo alfa (AAD, de all-alpha domain). El dominio NBD tiene una topología α/β , similar a RecA y helicasas de anillo. El dominio AAD se encuentra enteramente en el citoplasma de la bacteria y presenta homología con la región Nt de la recombinasa sitio específica XerD y también con un segmento de unos 40 aa del dominio de unión a DNA de la proteína TraM, componente del relaxosoma de plásmidos tipo F y que interacciona con su T4CP TraD. Es interesante señalar también la identidad en secuencia y similitud estructural entre los residuos Ct, desde el 426 al 787, existentes entre VirB4 (el homólogo a TrwK en *At*) y TrwB de R388 (Middleton *et al.*, 2005).

TrwB Δ N70 es capaz de unirse a ATP y a DNA de manera inespecífica (Moncalian *et al.*, 1999). De hecho, se ha mostrado su actividad ATPasa *in vitro*, inducida en presencia de DNA (Tato *et al.*, 2005) y de TrwA (Tato *et al.*, 2007). Parece que un mínimo de 3 moléculas de ATP se unen cooperativamente, indicando la presencia de al menos 3 sitios catalíticos en la proteína (Tato *et al.*, 2005). La ATPasa F₁ contiene 6 sitios de unión a ATP, de los cuales sólo tres son catalíticos (Boyer, 1993). Las similitudes entre ambas ATPasas ha hecho proponer un modelo de actuación similar que se esquematiza en la Figura 20. La unión de TrwB al DNA podría promover una conformación asimétrica, donde los distintos sitios de unión a nucleótidos de TrwB podrían secuencialmente hidrolizar ATP mientras el DNA es translocado a través del poro central (Tato *et al.*, 2005).

Se cree que TrwB podría bombear DNA de cadena sencilla hacia el canal del T4SS, usando la energía derivada de la hidrólisis de ATP. La unión de TrwB al DNA es inespecífica, provocando en éste un incremento de la superhelicidad negativa, independientemente de la unión de ATP (Moncalian *et al.*, 1999). TrwB es capaz de unirse tanto a DNA de doble cadena como DNA de cadena sencilla.

Es interesante hacer notar que, además del presumible rol de TrwB como transportadora de DNA, también es requerida para la transferencia de la relaxasa TrwC en ausencia de transporte de DNA (Draper *et al.*, 2005), lo que sugiere una vez más un papel directo en el reconocimiento del sustrato proteico del T4SS.

Al tratarse de una proteína con tantas actividades asociadas, muchos trabajos se han centrado en diseccionar los dominios funcionales de las T4CPs:

- En TraD, la proteína acopladora de los plásmidos del grupo F, se ha determinado que su extremo Ct es fundamental para la especificidad de interacción con el relaxosoma, probablemente a través de la interacción con TraM (Beranek *et al.*, 2004; Sastre *et al.*, 1998). Además, se ha estudiado el efecto que una serie de mutantes al azar tiene en la oligomerización de TraD, que incluyen la región Nt transmembrana y una región en el dominio citoplasmático (Haft *et al.*, 2007).

Introducción

- Estudios en VirD4, la T4CP del sistema VirB de *At*, han puesto de manifiesto que tanto el dominio periplasmático como una serie de residuos del dominio de unión a nucleótido (NBD), son necesarios para que VirD4 se localice en los polos de la bacteria, donde está presente el T4SS (Kumar and Das, 2002), y que la región transmembrana Nt no es necesaria para la interacción con su sustrato VirE2 (Atmakuri *et al.*, 2003).

- En el caso de TraG, la T4CP del plásmido R27, análisis mutacionales indican la importancia de ciertos residuos periplasmáticos para la interacción con el T4SS (Gunton *et al.*, 2005).

- Cuando a PcfC, la T4CP del plásmido pCF10 de *Enterococcus*, se le elimina la región Nt transmembrana, pierde la capacidad de anclarse a la membrana, pero la habilidad de unirse con los compuestos del relaxosoma no se ve afectada (Chen *et al.*, 2008).

- En el caso de TrwB, la región TMD es necesaria para la interacción con el T4SS pero no para la interacción con los componentes del relaxosoma TrwA y TrwC, como así pone de manifiesto el hecho de que TrwB Δ N70 interaccione con estas proteínas pero no con TrwE (Llosa *et al.*, 2003).

Por lo tanto, en general, podríamos decir que en las T4CP, la región Nt TMD es importante para la interacción con el T4SS, la oligomerización de la proteína y la localización celular, mientras que la región Ct citoplasmática es necesaria para la interacción con los componentes del relaxosoma y para la actividad ATPasa asociada al transporte del DNA. Sin embargo, también ha sido descrito que TraG (la T4CP del plásmido RP4) pierde la interacción con su relaxasa TraI cuando la región Nt es delecionada (Schroder and Lanka, 2003).

En muchos casos, las T4CP pueden ser intercambiadas de un sistema a otro, siendo muy específicas con el relaxosoma que reconocen, pero no tanto con el T4SS. En diversos sistemas conjugativos, se pueden emplear distintos T4SS para que la transferencia tenga lugar, siempre que la T4CP y el relaxosoma sean del mismo sistema (Llosa *et al.*, 2003). Esto podría ser debido en parte a que una misma T4CP interacciona con distintos homólogos de VirB10. De hecho, se ha visto que TrwB interacciona con

las proteínas homólogas a VirB10 TraF y PilX10, de los plásmidos pKM101 y R6K respectivamente (Llosa *et al.*, 2003), observándose una relación directa entre la fuerza de interacción de TrwB con la homóloga de TrwE y la eficiencia en la movilización del derivado de R388 a través del T4SS correspondiente (Llosa *et al.*, 2003).

También se ha demostrado que TrwB es capaz de interactuar con homólogos de TrwE de T4SS implicados en virulencia y no en conjugación (de Paz *et al.*, 2005). Este es un dato muy interesante, que abre la posibilidad de que un sistema conjugativo como el de R388 pueda acoplarse a un T4SS implicado en patogenicidad.

2.6. RELACIÓN DE LOS T4SS CON LA PATOGENICIDAD

Muchas bacterias utilizan T4SS para infectar células de mamífero. Los T4SS son utilizados para secretar proteínas, denominadas efectores, que de algún modo facilitan el proceso infectivo de la bacteria. Los efectores pueden ser transportados de la bacteria al medio, de la bacteria a la célula por contacto directo, o de la bacteria intracelular al citoplasma de la célula eucariota infectada (Figura 21). Además, como ya se ha mencionado, *At* utiliza su T4SS no sólo para transferir el T-DNA oncogénico, sino también para transferir proteínas efectoras a la célula vegetal (Christie and Vogel, 2000). Todos estos sistemas están relacionados ancestralmente con los T4SS conjugativos.

Entre estos T4SS se encuentran los de muchos patógenos humanos, como por ejemplo *Helicobacter pylori*, un agente causal de patologías gástricas, que utiliza el T4SS Cag para enviar la proteína CagA a células epiteliales gástricas humanas (Bagnoli *et al.*, 2005; Covacci *et al.*, 1999). Algunos patógenos intracelulares, entre los que se incluyen *Legionella pneumophila* (Segal and Shuman, 1999), *Brucella suis* (O'Callaghan *et al.*, 1999), *B. abortus* (Sieira *et al.*, 2000) y *Bh* (Padmalayam *et al.*, 2000) utilizan T4SS para transferir proteínas efectoras que les permiten sobrevivir intracelularmente.

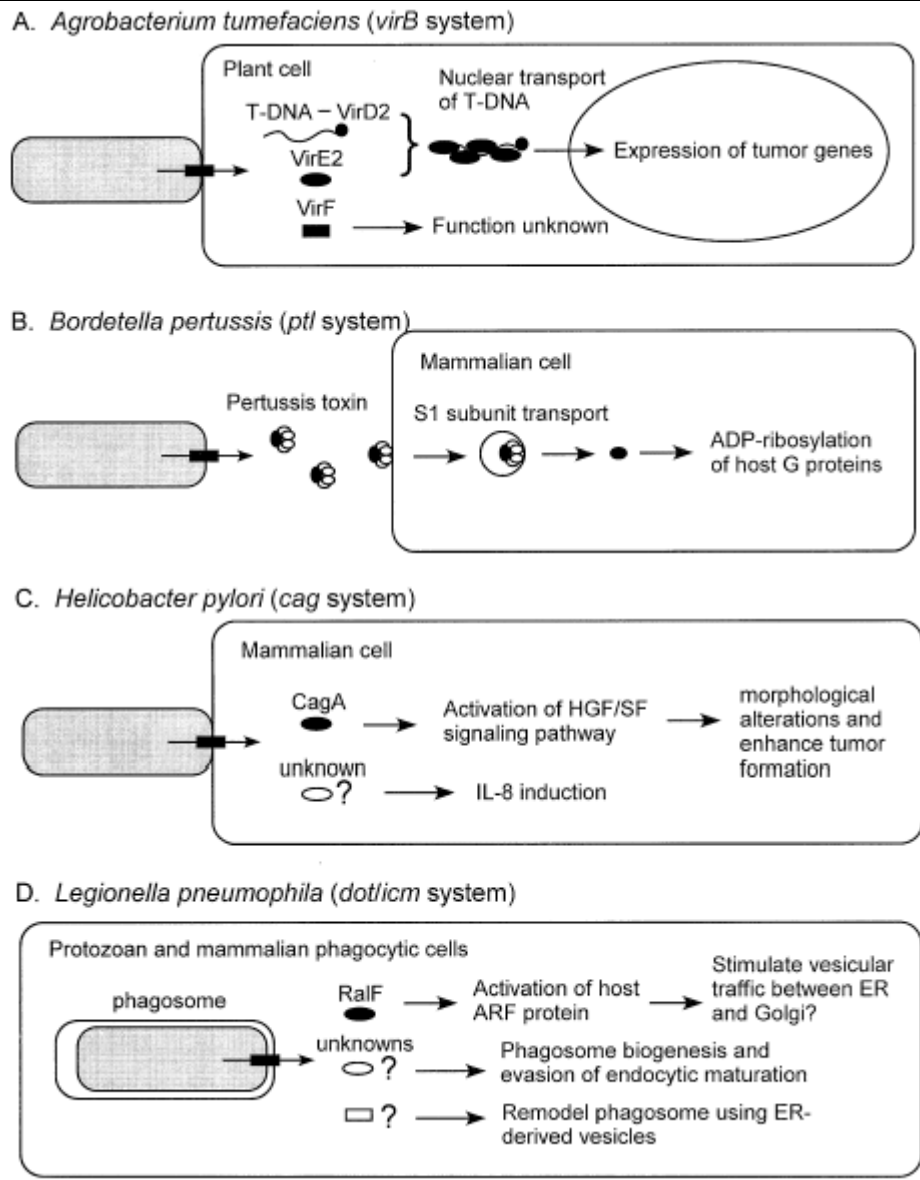


Figura 21. Modulación de las funciones celulares eucariotas mediante los efectores de T4SSp. Tomada de (Nagai and Roy, 2003).

Las proteínas translocadas por T4SS pueden afectar radicalmente la fisiología de la célula eucariota receptora de muy diversas maneras. Así, en *At*, los efectores tienen como misión fundamental favorecer la entrada e integración del T-DNA en el genoma de la planta. La expresión de este T-DNA integrado origina un descontrol en los niveles de hormonas de crecimiento de la planta y la producción de opinas por parte de la misma. Esto tiene como resultado la formación de neoplasias características en los sitios donde se han producido la infección.

El patógeno humano *H. pylori* induce rutas de señalización transduccional que tienen como resultado la fosforilación de tirosinas en las proteínas del huésped cercanas al sitio de infección. La cepa tipo I de este patógeno tiene una isla de patogenicidad *cag* que codifica para un T4SS, que secreta la proteína CagA a las células de mamífero. Después de la transferencia, CagA es fosforilada en un residuo tirosina específico por proteínas de membrana de la célula huésped. Además, también provoca reordenamientos en el citoesqueleto de la célula huésped e induce la producción de interleukina (IL)-8 (Crabtree *et al.*, 1999; Odenbreit *et al.*, 2000).

Bordetella pertussis es otro patógeno que emplea una maquinaria de secreción tipo IV. La toxina pertúsica (PT) es una toxina de la familia A/B, formada por cinco subunidades S1s5. Las subunidades de PT son secretadas a través de la membrana citoplasmática por la ruta general de secreción. Posteriormente, tiene lugar el ensamblaje de la holotoxina en el periplasma y la exportación a través de la membrana externa por el T4SS PTI (Farizo *et al.*, 2000). En el exterior, el dominio B, compuesto por las subunidades S2-S5, forma un oligómero con aspecto de anillo. Éste interactúa con los receptores glicoproteicos de la célula huésped y facilita la translocación del dominio A o S1 a través de la membrana eucariota. Una vez en el citosol, la toxina ADP ribosila las subunidades α de las proteínas G, interfiriendo así en la activación mediada por receptor y las rutas de señalización asociadas (Burns, 1999).

El T4SS *Dot/icm* contribuye a la supervivencia del *L. pneumophila* en la célula huésped, sea ésta un protozoo de vida libre o un macrófago humano. Después del contacto con los macrófagos, la bacteria induce la formación de un poro y entra en una vacuola. Los fagosomas que contienen este microorganismo maduran a un orgánulo especializado que evade la fusión con los endosomas y liposomas. El sistema *dot/icm* está implicado en el control del tráfico de fagosomas. Se cree que exporta efectores que afectan los primeros estadios de la maduración del fagosoma, y otras muchas vías de la célula.

En los últimos años se están descubriendo muchos efectores de este T4SS, gran parte de ellos aún con función desconocida. Como ejemplo, un trabajo reciente refleja más de 100 efectores candidatos que en general provocan distintos cambios en el tráfico

vesicular de la célula (Heidtman *et al.*, 2009). Es interesante que efectores con una secuencia tan distinta sean transportados por un único sistema.

Bartonella henselae es un patógeno que causa un amplio rango de manifestaciones clínicas en animales y humanos (Dehio, 2003). Presenta dos T4SS con implicaciones diferentes, como se detallará en la próxima sección. El T4SS VirB es necesario para la infección de las células endoteliales, que constituyen el nicho primario (Schmid *et al.*, 2004). El otro T4SS presente en la bacteria es el Trw (relacionado con T4SSc), indispensable para la infección de su nicho secundario (los eritrocitos) (Seubert *et al.*, 2003b).

Brucella spp es un patógeno intracelular Gram-negativo para muchas especies de mamífero, incluidos los humanos. Es una bacteria capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos (O'Callaghan *et al.*, 1999). Para conseguir esto, *Brucella* altera la maduración de los fagosomas cambiando el tráfico vesicular de la célula infectada, creando un nicho intracelular donde se multiplica (Arenas *et al.*, 2000). El T4SS VirB codificado por la bacteria se ha mostrado esencial para su capacidad infectiva. Así, mutantes en los genes *virB* son incapaces de sobrevivir y multiplicarse en el huésped (O'Callaghan *et al.*, 1999). El rol del T4SS es secretar proteínas a la célula huésped que le permitan escaparse de la ruta clásica endosomal y así establecerse y replicarse en la célula (Krall *et al.*, 2002). Hasta hace poco tiempo no se conocía ningún sustrato de este T4SS. Se ha determinado que las proteínas VceA y VceC son translocadas a las células de mamífero mediante el T4SS, y que su extremo Ct es el responsable del reclutamiento (de Jong *et al.*, 2008).

Éstos son tan sólo los ejemplos mejor estudiados de patógenos humanos que utilizan sus T4SS para secretar efectores que les permitan tomar el control de sus huéspedes. Sin embargo, con la obtención de un número creciente de genomas bacterianos, se ha puesto de manifiesto que son muchos los patógenos que cuentan con T4SS. Algunos están empezando a ser caracterizados, con lo que la lista de T4SS implicados en patogenicidad no deja de crecer.

3. EI GÉNERO *BARTONELLA*

3.1. CICLO GENERAL DE INFECCIÓN DE *BARTONELLA HENSELAE*

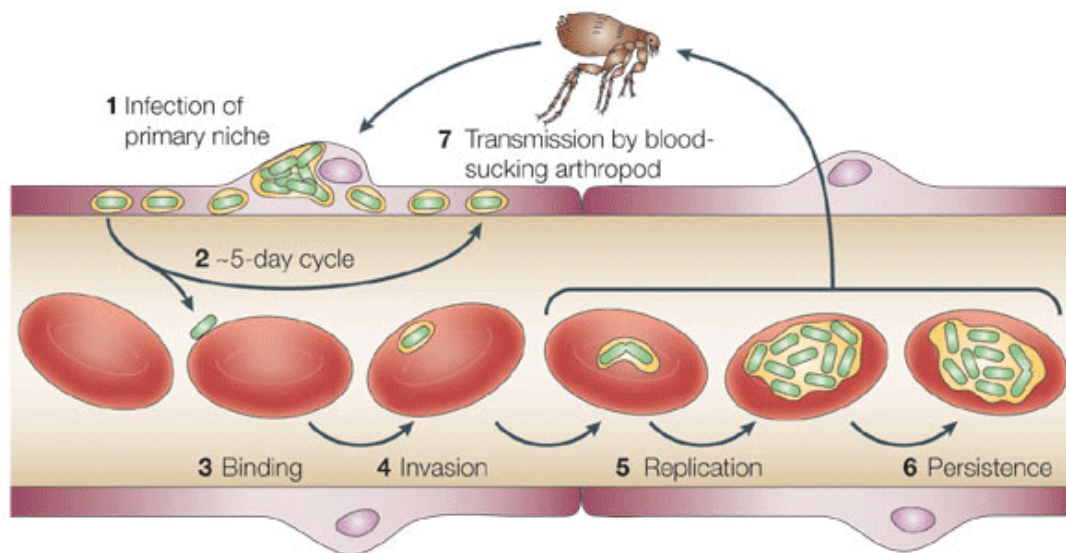


Figura 22. Representación del ciclo completo en la infección por *Bartonella henselae*. Tomada de (Dehio, 2005).

Bartonella es un patógeno de mamíferos capaz de invadir eritrocitos y células vasculares endoteliales (Dehio, 2004). Los vectores de transmisión son principalmente artrópodos, aunque también puede haber un contagio por transmisión directa. Las células endoteliales son el nicho primario en el huésped y probablemente también en los hospedadores no habituales (Dehio, 2005). El ciclo de infección (Figura 22) es iniciado tras la transmisión por parte de algún vector y la posterior colonización del nicho primario que forman las células vasculares endoteliales, y posiblemente también macrófagos del tejido conectivo reticular. Una vez transcurridos aproximadamente 5 días tras la infección, las bacterias entran al torrente sanguíneo desde el nicho primario, permitiendo su dispersión por todo el cuerpo, e infectan los eritrocitos, donde las bacterias se dividen, y reinfectan otras células endoteliales. Por último, aproximadamente en intervalos de 5 días, las bacterias vuelven a dispersarse por el torrente sanguíneo hasta que existe una respuesta inmune (Koesling *et al.*, 2001;

Schulein *et al.*, 2001). Las bacterias pueden persistir en los eritrocitos desde varias semanas a meses (salvo en el caso de *B. bacilliformis* que lisa los eritrocitos infectados). El hecho de que puedan permanecer largo tiempo dentro de los eritrocitos representa una adaptación específica al modo de transmisión vía artrópodos (Schulein *et al.*, 2001).

Bartonella consta de 17 especies que infectan a distintos hospedadores primarios como por ejemplo perros, ratones, gatos o ratas. Dos de estas especies, tienen como huésped primario a los humanos. Además, otras 8 especies son capaces de infectar a los humanos como huésped accidental (Figura 23).

3.2. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DE LOS DISTINTOS T4SS EN EL GÉNERO *BARTONELLA*

Aparte de los T4SS Trw y VirB ya mencionados, la secuencia del genoma de *B. tribocorum* reveló la presencia de un tercer T4SS. Este T4SS, denominado Vbh (VirB-homologous), es muy cercano filogenéticamente al T4SS VirB de *At* (Saenz *et al.*, 2007). Tal y como se puede ver en la Figura 23, varios T4SS pueden coexistir en una misma especie de *Bartonella*.

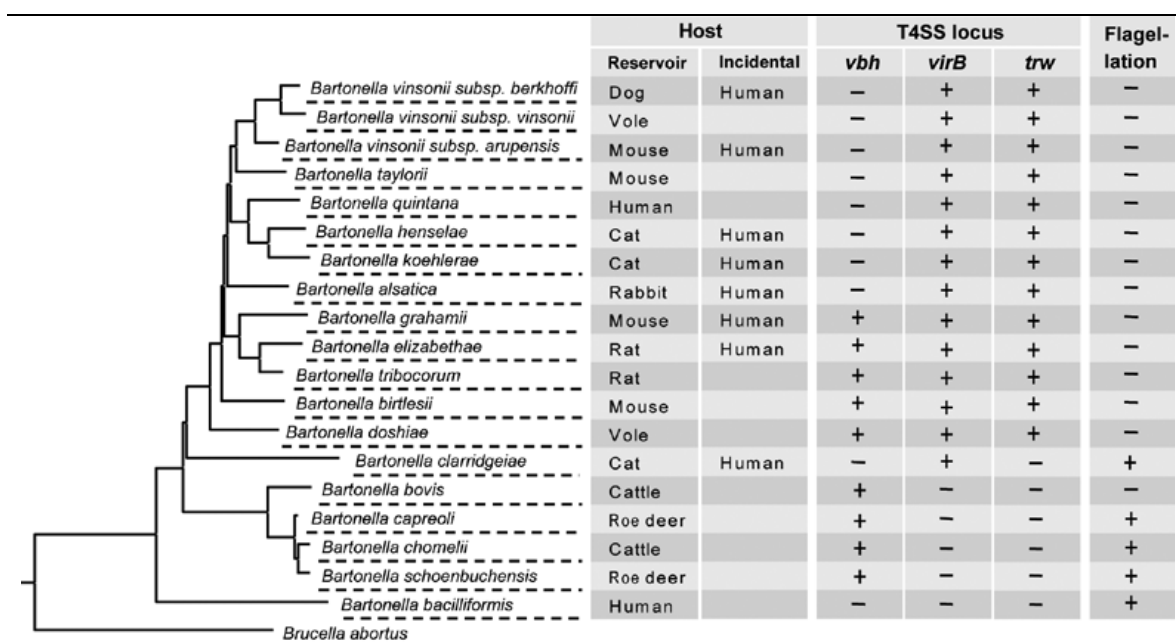


Figura 23. Árbol filogenético de las distintas especies de *Bartonella*, especificándose sus huéspedes, los T4SS presentes, así como si son bacterias flageladas o no. Tomada de (Dehio, 2008).

B. bacilliformis, patógeno humano muy virulento que puede causar la muerte, representa el linaje ancestral más representativo de *Bartonella*, en el cual no se encuentra ninguna clase de T4SS, ni siquiera ningún remanente de ello que pudiera indicar la presencia de un T4SS en el antecesor y que luego se perdiera. En esta especie, el ciclo de infección de células endoteliales y eritrocitos se desarrolló en ausencia de ningún T4SS. Sin embargo, las especies modernas codifican al menos un T4SS que ha adoptado funciones esenciales en la estrategia de infección, pudiendo remplazar probablemente diversos factores de virulencia requeridos por *B. bacilliformis*, y permitiendo a la bacteria una mayor adaptación al huésped. Por lo tanto, en estos casos la pérdida de virulencia ha provocado una mayor adaptación y una rápida expansión (Dehio, 2008).

La adquisición del T4SS Trw, pudo facilitar la adaptación de las nuevas especies de *Bartonella* a nuevos huéspedes de una manera rápida. Interesantemente, la adquisición del sistema Trw por los nuevos linajes fue acompañada de la pérdida del flagelo, que es una estructura necesaria para la invasión de los eritrocitos por parte de *B. bacilliformis* y probablemente por otras especies de *Bartonella* flageladas (Dehio, 2004).

Los otros dos T4SS, Vbh y VirB, están fuertemente relacionados y probablemente tienen una función redundante, lo que provocó la pérdida del sistema Vbh en los linajes modernos. La redundancia es sugerida por la observación de que el sistema Vbh parece ser funcional sólo en especies que no codifican el sistema VirB, y además, aparece frecuentemente deteriorado en estos casos (Saenz *et al.*, 2007). El origen del sistema Vbh es desconocido, pero está relacionado con el sistema AvhB del plásmido pAT en *At* (Saenz *et al.*, 2007). El locus VirB pudo evolucionar por duplicación del sistema Vbh o ser adquirido por transferencia horizontal de forma similar al sistema Vbh o el Trw. Se considera que la adopción del sistema VirB facilitó la adaptación bacteriana, habiendo una pérdida de virulencia de las nuevas especies y también la adaptación a nuevos huéspedes (Saenz *et al.*, 2007). Por el contrario, *B. bacilliformis* presenta una capacidad limitada de adaptación al huésped, siendo una especie altamente virulenta. Probablemente la translocación de nuevos efectores a través de los nuevos T4SS adquiridos en las nuevas especies sean las causas de su mayor adaptabilidad. Interesantemente, los T4SS se encuentran altamente conservados entre las distintas

especies, y sin embargo los genes *bep* de los efectores translocados presentan un alto grado de variación, mutaciones, deleciones y duplicaciones, incluso en especies cercanas. Esta plasticidad genética sugiere que los genes *bep* evolucionan rápidamente, probablemente como consecuencia de una selección positiva durante su especialización (Saenz *et al.*, 2007).

3.3. PAPEL DEL T4SS VIRB

El primer T4SS en *Bartonella* fue identificado relativamente hace poco, al tratar de encontrar el gen que codificaba la proteína frente a la cual se creaban antígenos (VirB5) tras una infección por *Bh* (Padmalayam *et al.*, 2000; Schmiederer and Anderson, 2000). La organización genética y la secuencia de los genes *virB* está altamente conservada entre distintas especies modernas de *Bartonella* (Saenz *et al.*, 2007). En el caso de *B.tricoborum*, el modelo de infección en rata, deleciones en *virB4* y *virD4* hacían perder la capacidad infectiva de la bacteria demostrando el rol esencial del sistema VirB para el curso de la infección (Schulein and Dehio, 2002). Además, ensayos de complementación de *virB4* y *virD4* demostraron que el sistema VirB era requerido para la colonización del nicho primario (Schulein and Dehio, 2002), descubriéndose años más tarde que el endotelio vascular constituye dicho nicho primario (Dehio, 2005). El sistema VirB resulta imprescindible para todos los fenotipos asociados con una infección por *Bh* de células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano (HUVECs) (Schmid *et al.*, 2004). Los efectores secretados a la célula huésped provocan en ella una serie de cambios y respuestas como:

- Reordenamientos masivos del citoesqueleto de la célula permitiendo la formación de una estructura llamada invasoma (Figura 24). Primero se forma una reagrupación de las bacterias formando esta estructura, y posteriormente se internalizan (Dehio *et al.*, 1997).
- Activación de la respuesta inflamatoria. Se piensa que la activación de la respuesta inflamatoria provoca el reclutamiento de fagocitos que tras la infección por parte de *Bh* liberan factores proangiogénicos, como el factor VEGF (vascular endotelial

growth factor), lo que promueve la proliferación celular (Dehio, 2005; Fuhrmann *et al.*, 2001; Resto-Ruiz *et al.*, 2002).

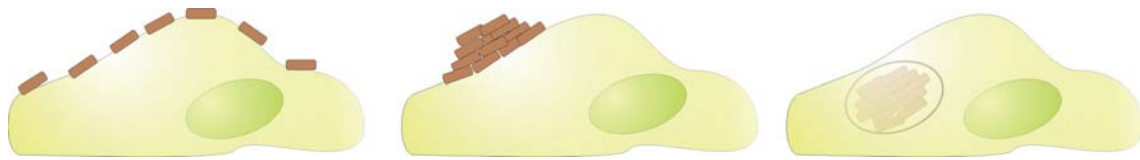


Figura 24. Esquema de la formación del invasoma y su posterior incorporación. De izquierda a derecha se observa cómo las bacterias, repartidas homogéneamente van formando la estructura del invasoma y posteriormente son internalizadas por la célula.

- Inhibición de la muerte celular por apoptosis. Debido a la supresión de la activación de caspasas y la inhibición de la fragmentación del DNA se evita la muerte celular. Como resultado de esta inhibición de la apoptosis, se forman lesiones vasoproliferativas *in vivo* (Kirby and Nekorchuk, 2002). La inhibición de la apoptosis protege el hábitat celular de *Bartonella* en el nicho primario y contribuye indirectamente al crecimiento vasoproliferativo debido al incremento de la vida celular.

Explorando los genes corriente abajo del locus *virB* se identificaron 7 sustratos de este sistema, de BepA a BepG (Schulein *et al.*, 2005), que representan los efectores que causan toda la cascada de respuestas celulares. De hecho, una delección en *bepA-bepG* es deficiente en todos los fenotipos descritos anteriormente (Schulein *et al.*, 2005). Aparte de las señales de translocación por el T4SS (sección 2.4), se han encontrado en las proteínas Bep diversos motivos de interés (Figura 14B). BepA, B y C contienen un dominio FIC (filamentation induced by cAMP) con función desconocida aunque está presente en muchas bacterias así como en células eucariotas como las de mamífero. BepD, E y F contienen además péptidos de tirosinas repetidos en tandem en su región Nt que se parecen a motivos de fosforilación de células eucariotas (Schulein *et al.*, 2005). De hecho, BepD sufre fosforilación en sus tirosinas (Schulein *et al.*, 2005) y por ello interfiere potencialmente con los procesos de señalización del huésped (Backert and Selbach, 2005). La fosforilación de las tirosinas es una característica frecuente de

efectores de otros patógenos como el efector T4SS CagA de *H. pylori* o los efectores Tir y Tarp del T3SS de *Ec* y *Chlamydia trachomatis* respectivamente (Backert and Selbach, 2005).

El papel de BepA es fundamental para inhibir la apoptosis. Este efector dirige la producción de un segundo mensajero, todavía desconocido, que cicla AMP. Como resultado, se produce un aumento en la concentración de AMPc que bloquea la muerte celular (Schmid *et al.*, 2006).

Bh tiene dos posibles rutas para invadir células endoteliales humanas: por endocitosis, donde una bacteria es contenida en una vacuola, o mediante la internalización mediada por el invasoma. En este aspecto, BepG juega un papel importante, ya que inhibe la primera vía de endocitosis, promoviendo así la internalización del invasoma (Rhomberg *et al.*, 2009).

3.4. EL PAPEL DEL T4SS TRW

Este T4SS fue descubierto en *Bh* en una búsqueda de promotores desreprimidos durante la infección (Seubert *et al.*, 2003b). Se observó que este T4SS es requerido para el parasitismo intraeritrocitario (Seubert *et al.*, 2003b). De hecho, mutantes por delección del gen *trwE* son deficientes para establecerse en los eritrocitos; sin embargo, como a los 5 días de la infección las bacterias aparecían en el torrente sanguíneo, todo parecía indicar que estos mutantes sí que eran capaces de colonizar el nicho primario (Dehio, 2004; Schroder and Dehio, 2005). Por ello, el sistema Trw parece dispensable para la infección de las células endoteliales pero esencial para la colonización de los eritrocitos. De hecho, *Bartonella birtlesii* es una bacteria que lleva una serie de mutaciones en su locus *trw* y no causa bactericemia en ratones (Mavris *et al.*, 2005) y es incapaz de invadir eritrocitos *in vitro* (Le Rhun *et al.*, 2009).

El locus *trw* está representado en la Figura 25. Varios genes *trw* aparecen amplificados repetitivamente en tandem. Tanto las 7 repeticiones de *trwL* (componente mayoritario del pilus) como las 5 repeticiones de *trwJ* (que codifica el componente minoritario del pilus) presentan una gran variación en su secuencia. Por el contrario, las

repeticiones de los genes que codifican para la lipoproteína TrwH, que une el pilus con el core complex (Krall *et al.*, 2002), y la proteína TrwI, esencial para la estabilización de TrwJ (Krall *et al.*, 2002), son prácticamente idénticas.

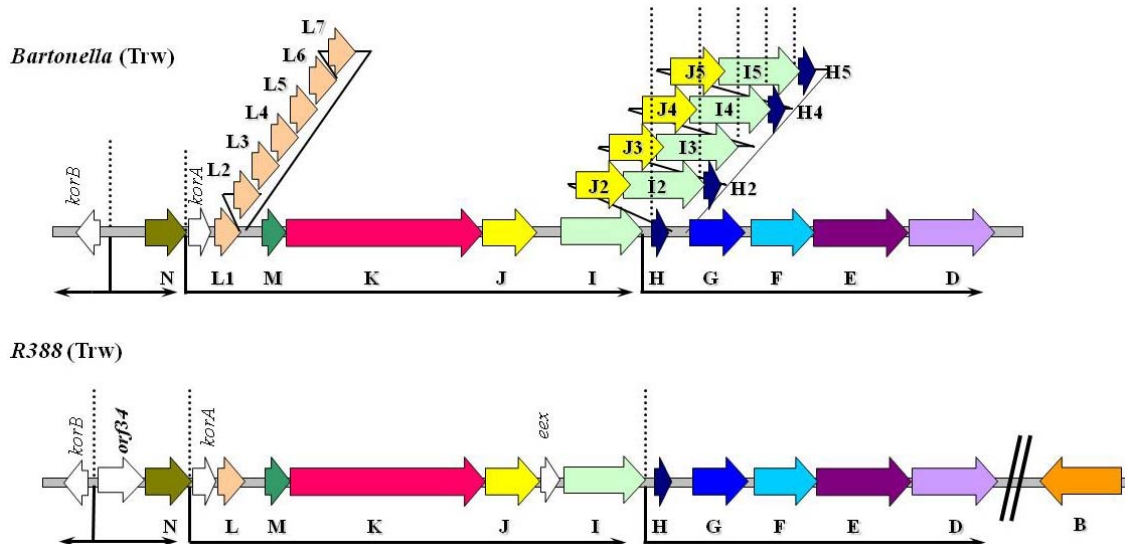


Figura 25. Esquema de los T4SS Trw de *Bt* y R388. Los genes homólogos están representados con el mismo color. Las dos barras negras oblicuas representan discontinuidades genéticas. El prefijo de los genes (*trw*) ha sido omitido. Los propuestos operones se indican como flechas negras que empiezan en los promotores propuestos e indican la dirección de transcripción. Las líneas verticales punteadas indican los *Kor* boxes.

Las diferencias existentes entre los parálogos de los co-amplificados genes *trwJIH*, parecen indicar que después de la duplicación genética estos genes sufrieron una distinta presión selectiva. Tanto *trwI* como *trwH* parecen haber sufrido una presión selectiva negativa en contra de la acumulación de mutaciones, quizás porque parálogos de estos genes podrían producir dominancias negativas deletéreas como se han descrito en sistemas homólogos (Nystedt *et al.*, 2008; Sagulenko *et al.*, 2001). Por su parte, la selección positiva para los mutantes TrwJ y TrwL, pudo generar una variedad de pili diferentes, permitiendo así a la bacteria interactuar con distintas estructuras de la superficie de la célula huésped (antígenos de superficie de los eritrocitos), o quizás represente un mecanismo para escapar de la respuesta inmune del huésped (Nystedt *et al.*, 2008; Seubert *et al.*, 2003b).

Según estudios recientes, la hipótesis de que la variedad de pili permita interaccionar con más estructuras cobra más fuerza. Así, cuando a una cepa de *Bh*, capaz de infectar eritrocitos de gatos o humanos pero no de ratas, se le introducen los genes que codifican el T4SS Trw de *Bt*, que infecta eritrocitos de rata, adquiere la capacidad de infectar también eritrocitos de rata (Llosa *et al.*, 2009). Además, el hecho de que, al menos hasta el momento, no se conozcan efectores ni proteína acopladora de este sistema puede apoyar la teoría de que este T4SS no funcione como sistema de secreción propiamente dicho, sino más bien como una estructura de adhesión celular.

3.4.1. Relación entre los T4SS Trw de R388 y *Bh*

Los T4SS, al igual que otras estructuras biológicas, han sufrido procesos evolutivos, tanto convergentes como divergentes, a lo largo del tiempo. Por ejemplo, si nos centramos en los plásmidos de amplio rango de huésped R388 y pKM101, vemos que ambos codifican dos T4SS conjugativos, Trw y Tra respectivamente, que conservan una organización genética similar incluyendo su regulación negativa por KorA y KorB (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006; More *et al.*, 1996). Pero a pesar de tener una estructura y una función muy similar, su homología en secuencia es baja (menos de un 38% en identidad de aa), indicando un ancestro común lejano. Algo distinto parece ocurrir cuando comparamos los T4SS de R388 y *Bt*. El T4SS Trw de *Bt*, no está implicado en conjugación, sino que es necesario para que la bacteria parasite los eritrocitos del huésped convirtiéndose en sus reservorios. La transferencia de DNA en el género *Bartonella* es bastante improbable, y sólo *Bartonella grammy* ha sido descrita como portadora de un plásmido nativo (Seubert *et al.*, 2003a).

A pesar de esta diferencia funcional, la organización genética de la región *trw* de *Bt* es similar a la región *trw* de R388 (Figura 25) (y a la región *tra* de pKM101) con dos salvedades. La primera es la ausencia en el caso de la región *trw* de *Bt* del gen *eex*, que codifica un factor de exclusión de superficie. Éste, evita la conjugación a células que ya tengan el plásmido conjugativo, por lo que es lógico que se haya perdido en *Bt* ya que no tiene función posible. En segundo lugar, las mencionadas duplicaciones de ciertos genes en tandem, únicamente encontradas en la región *trw* de *Bartonella*.

Hay que remarcar que el T4SS Trw de *Bt* presenta una homología al sistema Trw de R388 de entre el 35% y el 90% en identidad aminoacídica, según los componentes. Estos datos sugieren que los sistemas Trw de *Bartonella* y de R388 puedan tener un ancestro común cercano (Seubert *et al.*, 2003b). La conservación de ambos sistemas ha sido demostrada a nivel funcional. Mutantes de R388 en *trwD* y *trwH* pueden ser complementados por sus homólogos de *Bt*. Pero la conservación también llega al nivel de la regulación transcripcional. Tanto los genes reguladores *korA* y *korB*, como sus *kor boxes*, se encuentran conservados en ambos sistemas Trw. Interesantemente, uno de los *kor boxes* situados por delante del gen *trwH* también ha sido duplicado 5 veces en el caso de *B. tribocorum*. Además, también se ha observado que estos elementos reguladores pueden ser intercambiables en ambos sistemas (Seubert *et al.*, 2003b)

Los genes *trw* de *Bartonella* se encuentran codificados en el DNA cromosómico. La ausencia de homólogos en otras especies cercanas y relacionadas, y la presencia de una integrasa del tipo de fagos crípticos al borde de esta región (*trw*), sugiere una adquisición por transferencia horizontal seguida de una integración en el cromosoma mediada por una integrasa (Seubert *et al.*, 2003b). Posteriormente, una cierta acumulación de mutaciones en la integrasa podría haber estabilizado esta región tal y como ha sucedido en otros sistemas (Hacker *et al.*, 1997).

En líneas generales, todos los datos recogidos hasta ahora parecen indicar que ambos sistemas Trw, el de *Bartonella* y el de R388, proceden de un antecesor común que fue transferido horizontalmente a *Bartonella*, donde se integró en el cromosoma y sufrió una readaptación en un periodo muy corto.

2

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1. CEPAS BACTERIANAS

Cepas	Genotipo	Referencia
<i>Bartonella henselae</i>		
MFE133	RSE247 $\Delta trwE$	Dehio C, sin publicar
MFE137	RSE247 $\Delta trwE \Delta virB2-B11$	Dehio C, sin publicar
MFE114	RSE247 $\Delta virB2-B11$	Dehio C, sin publicar
RSE242	RSE247 $\Delta virB4$	(Schmid <i>et al.</i> , 2004)
RSE247	Sm ^R espontáneo de “Houston-1”	(Schmid <i>et al.</i> , 2004)
TRB148	RSE247 $\Delta virD4$	(Schulein <i>et al.</i> , 2005)
CHDE105	Rf ^R espontáneo de “Houston-1”	Dehio C, sin publicar
<i>Bartonella tribocorum</i>		
RSE148	Sm ^R espontáneo de <i>Bt</i> 5065	(Seubert <i>et al.</i> , 2003)
<i>Escherichia coli</i>		
C41	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ (DE3)</i>	(Miroux and Walker, 1996)
D1210	Sm ^R <i>recA hspR hsdM rpsL laqI^q</i>	(Sandler and Clark, 1990)
DH5 α	Nx ^R F ⁻ <i>supE44 $\Delta lacU169$ (β80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Grant y cols., 1990)
DHM1	Nx ^R <i>cya-854 recA1 gyrA96 (NaI) thi1 hsdR17 spoT1 rfbD1 glnV44(AS)</i>	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
DY380	Sm ^R λ C1857 (<i>cro-bioA</i>) tet (DH10B)	(Lee <i>et al.</i> , 2001)

Tabla 1. Relación de cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

2. PLÁSMIDOS USADOS EN ESTE TRABAJO

Se muestran a continuación dos tablas con los plásmidos ajenos que han sido utilizados en el presente trabajo (Tabla 2) y los plásmidos construidos para este trabajo (Tabla 3).

Plásmido	Fenotipo	Descripción	Referencia
pAB2	Km ^R Tc ^R	pLAFR5-Km:: región <i>trw Bt</i>	(Seubert <i>et al.</i> , 2003)
pCEP4::eGFP	Ap ^R	Contiene cassette de expresión eGFP en eucariotas	Pérez-Luz S ,sin publicar
pCIG1077	Ap ^R	pKK223-3::P _{ABC} . <i>trwA-trwL</i>	(César, 2007)
pET29: <i>trwAC</i>	Km ^R	pET29C:: <i>trwA+trwC</i>	(Draper <i>et al.</i> , 2005)
pFJS134	Gm ^R	pRL662::Dtr _w (<i>oriT + trwABC</i>)	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pHG329	Ap ^R	Vector de clonación, Rep (pMB1)	(Stewart <i>et al.</i> , 1986)
pKD20	Ap ^R	Plásmido de expresión del sistema recombinasa Red	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKM101 Δ <i>mob</i>	Ap ^R	pKM101 Δ <i>Dtr</i>	(Draper <i>et al.</i> , 2005)
pLA25	Gm ^R Neo ^R	pBBR6:: <i>oriT trwABC</i> :: <i>BID + eGFP + Neo^R</i>	L. Agúndez, sin publicar
pMTX513	Ap ^R	pUT18c:: <i>trwB</i> R388	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pMTX514	Cm ^R	pT25:: <i>trwB</i> R388	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pMTX525	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> Q390A	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX527	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> R240A E241A	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX528	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> H244A W245A	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX533	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> D252A D253A	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX549	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> N271D	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX550	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> K275A	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX553	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> K398A	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX582	Cm ^R	pSU4633:: <i>trwB</i> K275A K398A	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
pMTX601	Ap ^R	pUT18c:: <i>trwB</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pMTX631	Ap ^R	pUT18c:: <i>trwE</i> R388	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pMTX632	Cm ^R	pT25:: <i>trwE</i> R388	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pMTX664	Ap ^R	pUT18c:: <i>trwE</i> R388 con sitio <i>StuI</i> en fase tras región transmembrana	Llosa M, sin publicar
pMTX671	Ap ^R	pUT18c:: <i>virB10 At</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pMTX673	Cm ^R	pT25:: <i>virB10 At</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pMTX688	Cm ^R	pT25:: <i>virB10 Bs</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pMTX689	Ap ^R	pUT18c:: <i>virB10 Bs</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pMTX697	Ap ^R	pUT18c:: <i>trwE Bt</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pMTX698	Cm ^R	pT25:: <i>trwE Bt</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pMTX701	Gm ^R	pBBR6: <i>oriT trwABC</i> R388 + <i>trwE</i> R388	Llosa M., sin publicar
pSU18	Cm ^R	Vector de clonación, Rep (p15A)	(Bartolome <i>et al.</i> , 1991)

Plásmido	Fenotipo	Descripción	Referencia
pSU19	Cm ^R	Vector de clonación, Rep (p15A)	(Bartolome <i>et al.</i> , 1991)
pSU24	Cm ^R	Vector de clonación, Rep (p15A)	(Bartolome <i>et al.</i> , 1991)
pSU1423	Cm ^R	pSU18:: <i>oriT</i> + <i>trwABC</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU1443	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac en <i>trwB</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 1994)
pSU1445	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac en <i>trwC</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 1994)
pSU1621	Ap ^R	pET3a:: <i>trwC</i>	(Guasch <i>et al.</i> , 2003)
pSU2007	Km ^R	R388 con cassette Km ^R en el gen Su ^R	(Martinez and de la Cruz, 1988)
pSU4035	Cm ^R	pSU1087::inserto Ω en <i>trwG</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU4051	Ap ^R	pHG327:: <i>oriT</i> + <i>trwABC</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU4058	Ap ^R	pHG327:: <i>trwL-trwD</i>	(Bolland <i>et al.</i> , 1990)
pSU4063	Ap ^R Km ^R	pSU4058::Tn5tac1 en <i>trwD</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4105	Ap ^R Km ^R	pSU4058::Tn5tac1 entre <i>trwH</i> y <i>trwI</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4130	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwL</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4131	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwH</i>	(Seubert <i>et al.</i> , 2003)
pSU4132	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwD</i>	(Rivas <i>et al.</i> , 1997)
pSU4133	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwK</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pSU4134	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwE</i>	(Llosa <i>et al.</i> , 2003)
pSU4135	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwF</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4136	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwJ</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4137	Km ^R Tp ^R	pSU1425::Tn5tac1 en <i>trwI</i>	(de Paz <i>et al.</i> , 2005)
pSU4633	Cm ^R	pSU24::P _{<i>trwABC</i>} - <i>trwA-trwB</i> KpnI/NdeI	(Moncalian <i>et al.</i> , 1999)
pT25	Cm ^R	Vector para fusiones T25, Rep (p15A)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pT25zip	Cm ^R	Control positivo para ensayo de dos híbridos bacteriano	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18c	Ap ^R	Vector para fusiones T18, Rep (pMB1)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18czip	Ap ^R	Control positivo para ensayo de dos híbridos bacteriano	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

3. PLÁSMIDOS CONSTRUIDOS EN ESTE TRABAJO

Plásmido	Descripción	Vector	Inserto/Molde	Construcción ⁽¹⁾
				Enzimas / Oligonucleótidos 5' 3'
pHP100 ⁽²⁾	pSU24: <i>trwE Bt</i>	pSU24	pMTX697	- CCAGTCGACGGAGGAAAATAATGTTTGACA - CCAGAATTCTCTTTTTGTATAGGGTAAAC
pHP101 ⁽²⁾	pSU24:: <i>virB10 Bs</i>	pSU24	pMTX689	- CCAGTCGACGGGGAGAACCTGCAATGAC - CCAGAATTCTCACTTCGGTTGGACATCA
pHP102 ⁽²⁾	pSU24:: <i>trwE R388</i>	pSU24	pMTX513	- CCAGTCGACAAGGAGGCAACTAATGTTTCGG - CCAGAATTCCGGTTCGCTACTTAGT
pHP106	pUT18c:: <i>trwB V74I</i>	pMTX601	pMTX601	KpnI BamHI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP107	pUT18c:: <i>trwB P18S S95N</i>	pMTX601	pMTX601	KpnI BamHI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP108	pUT18c:: <i>trwB P18S</i>	pMTX601	pMTX601	KpnI BamHI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP109 ⁽²⁾	pSU18:: <i>korA+trw H-D R388</i>	pSU18	R388+pSU4105	<i>korA</i> EcoRI-BamHI + <i>trwH-D</i> BglII-HindIII
pHP111	pHG329:: <i>trw L- I</i>	pHG329	pSU4105	EcoRI HindIII
pHP113	pUT18c:: <i>trwB P18S</i>	pMTX601	pMTX601	KpnI BamHI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP114	pUT18c: <i>trwB P18S S95A</i>	pMTX601	pMTX601	KpnI BamHI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP116 ⁽²⁾	pUT18c:: <i>trwE Bt::trwE R388</i>	pMTX664	pMTX697	BamHI StuI - CTTAGGCCTTCCAAGTCAAAGCAATTGG - GAAGTTCTCGCCGGATGT

Plásmido	Descripción	Vector	Inserto/Molde	Construcción ⁽¹⁾
				Enzimas / Oligonucleótidos 5' 3'
pHP117 ⁽²⁾	pUT18c:: <i>trwE</i> R388:: <i>trwE</i> <i>Bt</i>	pMTX664	pMTX697	StuI KpnI - ACCAGGCCTTTAAAATGCGTAATACCGTAG - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP119	pT25:: <i>trwE</i> <i>Bt</i> T107S	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP120	pT25:: <i>trwE</i> <i>Bt</i> P57A	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP121	pT25:: <i>trwE</i> <i>Bt</i> P57L T107A	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP122	pT25:: <i>trwE</i> <i>Bt</i> P57S	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP123	pT25:: <i>trwE</i> <i>Bt</i> V54L T126A	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP124	pT25:: <i>trwE</i> <i>Bt</i> V52L	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP125	pT25:: <i>trwE</i> <i>Bt</i> P57S	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GGAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP126	pT25:: <i>trwB</i> V74I	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP127	pT25:: <i>trwB</i> P18S	pMTX698	pMTX697	BamHI NdeI / PCR Mutagénica ⁽³⁾ - GAAGTTCTCGCCGGATGT - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG

Plásmido	Descripción	Vector	Inserto/Molde	Construcción ⁽¹⁾
				Enzimas / Oligonucleótidos 5' 3'
pHP128 ⁽²⁾	pSU1423::Km::N133 TrwB	pSU1423	pSU4131	Wanner ⁽⁴⁾ -ATTGAGGTTTGGACACCGGAGGGGAAGGAGGATTGAGATGGA TCCATCAAGAGACAGGATGAGGATCGT - CGGTATAAGCAAGCTCACGAAGCAACACCGATTTACCGGTAC CAACCCAGAGTCCCGCTCAG
pHP129 ⁽²⁾	pSU1423::trwB	pHP128	pMTX601	BamHI KpnI
pHP130 ⁽²⁾	pSU1423::trwB V74I	pHP128	pHP106	BamHI KpnI
pHP131 ⁽²⁾	pSU1423::trwB P58S	pHP128	pHP113	BamHI KpnI
pHP132	pBBR6::oriT trwABC	pFJS134	pHP129	EcoRI HindIII
pHP133	pBBR6::oriT trwAB ^{V74I} C	pFJS134	pHP130	EcoRI HindIII
pHP134	pBBR6::oriT trwAB ^{P18S} C	pFJS134	pHP131	EcoRI HindIII
pHP135	pET29c::trwC	pET29c	pSU1621	NdeI BamHI
pHP138	pET29c::oriT+trwAC	pET29:trw AC	pSU2007	- TTACTCTAGATTGTAGTGGCATAAACTA - TTACTCTAGACTCATTCTGCATCATTGT
pHP139	pSU19::trwB	pSU19	pMTX601	HindIII EcoRI - TTACAAGCTTAGGAGGATCCATATGCATCCAGACGATCAAA - ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP140	pHP139::trwB Q390A	pHP139	pMTX525	KpnI EcoRI
pHP141	pHP139::trwB R240A E241A	pHP139	pMTX527	KpnI EcoRI
pHP142	pHP139::trwB H244A W245A	pHP139	pMTX528	KpnI EcoRI
pHP143	pHP139::trwB D252A D253A	pHP139	pMTX533	KpnI EcoRI
pHP145	pHP139::trwB N271D	pHP139	pMTX549	KpnI EcoRI
pHP146	pHP139::trwB K275A	pHP139	pMTX550	KpnI EcoRI
pHP147	pHP139::trwB K398A V291D E207K	pHP139	pMTX553	KpnI EcoRI
pHP148	pHP139::trwB K275A K398A	pHP139	pMTX582	KpnI EcoRI
pHP149	pHP139::trwB Val74Ile	pHP139	pHP106	BamHI KpnI
pHP150	pHP139::trwB P18S S95N	pHP139	pHP107	BamHI KpnI
pHP151	pHP139::trwB NdeI	pHP139	pMTX589	BamHI KpnI
pHP157	pBBR6::oriT trwAB ^{V74I} C::eGFP (F) ⁽⁵⁾	pHP133	pCEP4:eGFP	- ACATATCGATTGTTTGGACAGCTTATCATCGC - ACTTATCGATCCCCGACACCCGCC

Plásmido	Descripción	Vector	Inserto/Molde	Construcción ⁽¹⁾
				Enzimas / Oligonucleótidos 5' 3'
pHP159	pBBR6::oriT <i>trwABC</i> ::eGFP(R) ⁽⁵⁾	pHP132	pCEP4:eGFP	- ACATATCGATTGTTTGACAGCTTATCATCGC - ACTTATCGATCCCCGACACCCGCC
pHP160	pBBR6::oriT <i>trwAB</i> ^{P18S} <i>C</i> ::eGFP(F) ⁽⁵⁾	pHP134	pCEP4:eGFP	- ACATATCGATTGTTTGACAGCTTATCATCGC - ACTTATCGATCCCCGACACCCGCC
pHP161	pBBR6::oriT <i>trwABC</i> ::eGFP(F) ⁽⁵⁾	pHP132	pCEP4:eGFP	- ACATATCGATTGTTTGACAGCTTATCATCGC - ACTTATCGATCCCCGACACCCGCC
pHP169	pSU19:: <i>trwB</i> K421A D425A	pHP139	pMTX552	KpnI EcoRI
pHP170	pSU19:: <i>trwB</i> K398A R417	pHP139	pMTX553b	KpnI EcoRI
pHP171	pSU19:: <i>trwB</i> K398A	pHP139	pMTX553	ApaI EcoRI
pHP178 ⁽²⁾	pHP161 Δ <i>trwB</i> :Cm	pHP161	pMTX698	Wanner ⁽⁴⁾ -GGACACCGGAGGGGAAGGAGGATTGAGATGCATCCAGACGAT <u>AGGCTCCACATGAAGCACTTCACTGACA</u> -GGTCAATACCATGTGACTGAGCATTAGATAGTCCCCTCAACAG <u>GCCTCGCCCCGCCCTGCCACTCAT</u>
pHP179	pHP161 Δ <i>trwB</i>	pHP178	religación	StuI
pHP180 ⁽²⁾	pHP161 Δ <i>trwC</i> Km	pHP161	pMTX698	Wanner ⁽⁴⁾ - TGCAAACCGGCAACCGGCCTTTGTTGAGGGGACTATCTAAGGC <u>CTATCAAGAGACAGGATGAGGATCGT</u> - CCCGTAGCACGCGCTACGGGCTTTTTCTTGTCCCTGCTTAGGCC <u>TAACCCAGAGTCCCGCTCAG</u>
pHP181	pHP161 Δ <i>trwC</i>	pHP180	religación	StuI

Tabla 3. Plásmidos construidos para este trabajo

⁽¹⁾ Se indica el procedimiento utilizado para la construcción de los plásmidos. Las posibilidades son: a) Por PCR con los oligonucleótidos especificados a partir de un molde. Los sitios de restricción introducidos en los oligonucleótidos están subrayados. b) Mediante restricción enzimática con las enzimas indicadas. Se señala en la tercera y cuarta columna el vector y el inserto utilizado. c) por recombinación, siguiendo el método descrito por Wanner tal como se detalla en el apartado 5.5.

⁽²⁾ Las construcciones que necesitan una mayor explicación que la aportada en esta tabla se comentan seguidamente.

⁽³⁾ En este caso se realizó una PCR mutagénica para obtener mutantes al azar tal y como se explica en el apartado 4.3 de este capítulo.

⁽⁴⁾ Construcciones realizadas por el método de recombinación (método Wanner).

⁽⁵⁾ (F) indica la orientación en la cual el cassette eGFP está en la misma orientación que el Plac del propio vector, mientras que (R) indica la orientación opuesta.

3.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS QUE REQUIEREN MENCIÓN ESPECIAL

En la Tabla 3 hacemos referencia a las estrategias básicas que hemos seguido para la construcción de plásmidos. Bien por restricción, tomando un fragmento de un plásmido y clonándolo en otro. Bien por PCR, cuyo amplicón luego se inserta en un vector mediante restricción y ligación. Y por último, por recombinación basada en la inducción transitoria del sistema Red, método comúnmente conocido como el método de Wanner y que se explica detalladamente en el apartado 5.5.

A continuación haremos referencia a algunos plásmidos cuya explicación en la tabla 3 queda incompleta o que merecen una especial atención.

pHP100, pHP101 y pHP102

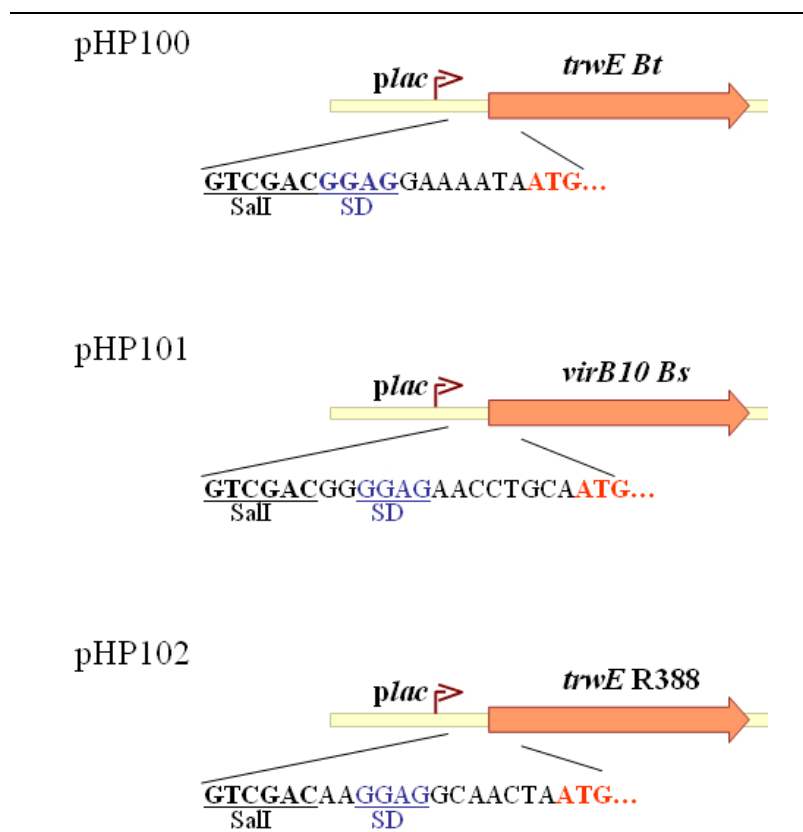


Figura 1. Representación de las construcciones, señalándose el sitio de corte, la secuencia Shine-Dalgarno (azul) y el codón de inicio del gen (rojo).

Para realizar los plásmidos pHP100, pHP101 y pHP102, clonamos en el plásmido pSU24 el gen *trwE* de R388 y sus homólogos en *Bt* y *Bs* detrás de un promotor lactosa inducible por IPTG. Para ello, realizamos una PCR diseñando los oligonucleótidos de tal manera que cada gen llevara su secuencia SD para que pudiera expresarse correctamente.

pHP109

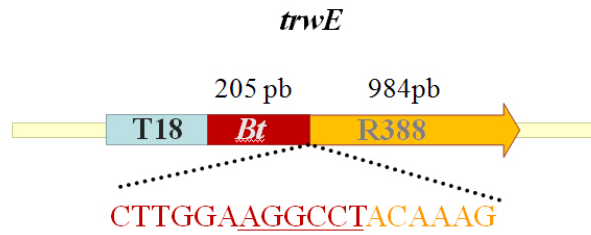
Es un plásmido pSU18 que porta el operón de R388 que codifica los genes desde *trwH* hasta *trwD*. Como este operón incluye una función Kil (Bolland *et al.*, 1990), que es letal en ausencia de su correspondiente gen *kor*, el plásmido fue construido en dos pasos: primero, el gen *korA* de R388 fue amplificado por PCR y clonado en los sitios EcoRI-BamHI del vector pSU18, seleccionando la orientación que permite la expresión de *korA* desde el promotor lactosa del vector. En el segundo paso, un fragmento BglII-HindIII del plásmido pSU4105 fue insertado en los sitios BamHI-HindIII de la construcción previa.

pHP116 y pHP117

Para realizar proteínas quiméricas entre TrwE de R388 y TrwE de *Bt*, utilizamos como molde el plásmido pMTX664 (M. Llosa, sin publicar), que cuenta con una proteína de fusión en fase entre el dominio T18 del enzima adenilato ciclasa (Aci) y *trwE* de R388. Dicha *trwE* presenta un corte StuI justo después del segmento transmembrana de TrwE que no provoca cambio alguno en la secuencia proteica.

Tal y como se indica en la Tabla 3, añadiendo un sitio de corte StuI en *trwE Bt*, mediante PCR, y posteriormente mediante digestión-ligación, se clonaron en un caso la región Nt de TrwE *Bt* (pHP116) y en el otro la región Ct (pHP118) en el plásmido pMTX664, sustituyendo a las correspondientes regiones de TrwE de R388. Dando lugar así a proteínas quiméricas entre las dos proteínas TrwE, fusionadas en fase con el dominio T18 de la Aci.

pHP116



pHP117

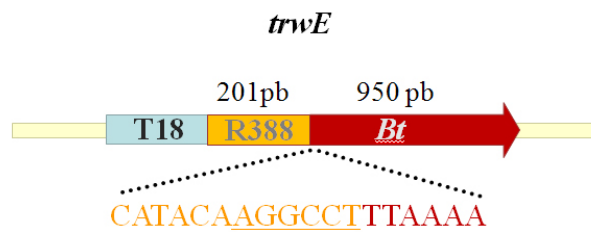


Figura 2. Representación de las construcciones. En azul el dominio T18, en naranja la región de R388 y en Rojo la región de Bt. Debajo de cada figura se establece la secuencia entre ambas regiones, subrayando el sitio de corte.

pHP128

El objetivo de la construcción de este plásmido fue obtener derivados del plásmido pSU1423 con sitios de restricción determinados para poder clonar posteriormente distintos mutantes de TrwB y analizarlos.

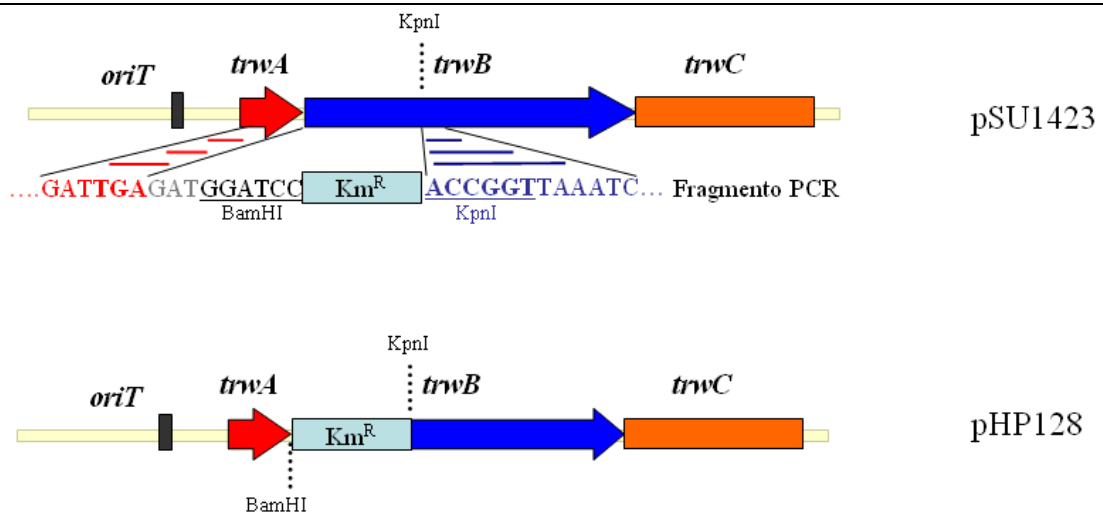


Figura 3. Representación de las construcciones. Arriba se señala tanto el plásmido sobre el cual se hace la recombinación como el fragmento de PCR. Las rayas horizontales hacen referencia a la región de homología, representando sólo parte de la secuencia.

Para construir pHP128 utilizamos un método de recombinación Red explicado en el apartado 5.5 (método de Wanner). Amplificamos por PCR un gen de resistencia a antibiótico (Km en este caso). Los oligonucleótidos con los que realizamos la PCR portan en su extremo 5' unas 40pb de homología con el plásmido sobre el que queremos hacer la recombinación. Además, podemos añadir secuencias de corte, como es el caso de BamHI en este caso. Así obtenemos un fragmento de PCR que codifica un gen de resistencia a Km, flanqueado por dos sitios de corte, y unas colas de homología, representada por las líneas de color.

Forzamos la recombinación (apartado 5.5) obteniendo así un plásmido donde se han perdido los primeros 400 pb de *trwB* y además hemos añadido un sitio de restricción BamHI justo después de *TrwA*. En el plásmido pHP128 podemos clonar ahora fácilmente por restricción los distintos mutantes de la región transmembrana de *TrwB* obtenidos anteriormente.

pHP129, pHP130 y pHP131

Como se explica en la Tabla 3, estos plásmidos son construidos mediante enzimas de restricción, clonando las primeras 401 pb de *trwB* que provienen de plásmidos de fusión T18::*trwB*, en el plásmido pHP128. Los genes *trwB* de fusión llevan 2 aa distintos justo al principio de *trwB*. El plásmido pHP129 se ha utilizado siempre por lo tanto como control de *trwB* con dichos residuos cambiados, que siempre se ha comportado como el gen wt. Los plásmidos pHP130 y pHP131 portan mutaciones en *trwB* (ver Tabla 3).

pHP178 y pHP179: Explicados en resultados sección 3.2.3 (Figura 23)

pHP180 y pHP181

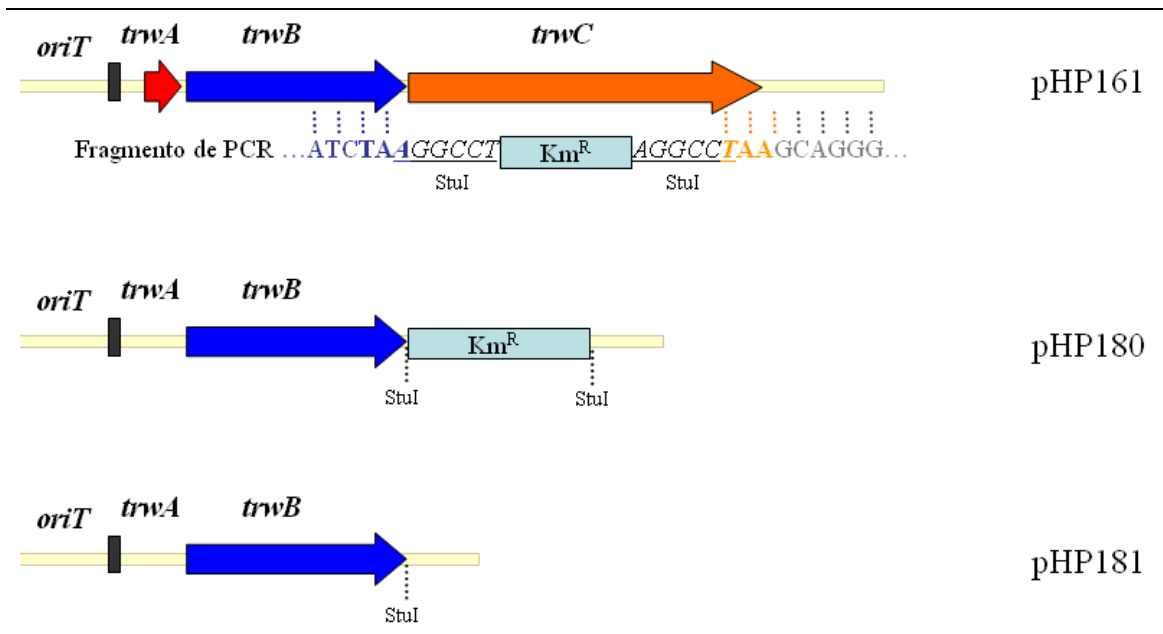


Figura 4. Representación de las construcciones. Arriba se señala tanto el plásmido sobre el cual se hace la recombinación como el fragmento de PCR. Las líneas verticales y los colores hacen referencia a la región de homología, representando sólo parte de la secuencia. En negrita se señalan los codones de stop. Abajo, pHP181 como resultado de cortar pHP180 con *StuI* y religar.

El plásmido pHP180 lo realizamos por recombinación de igual manera que el plásmido pHP128. En este caso queríamos sustituir *TrwC* por el gen de resistencia a Km (pHP180), añadiendo además sitios de restricción a ambos lados para posteriormente poder quitar la resistencia por digestión y religación (pHP181). Las líneas discontinuas muestran la región de homología.

4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1. EXTRACCIÓN DE DNA

Para las extracciones de DNA de cepas de *E.coli* se utilizaron kits comerciales de Sigma siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. En el caso de extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit *GenElute Plasmid Miniprep Kit*. Para la extracción de

bandas de gel de agarosa, se utilizó el *GenElute Gel Extraction Kit* y, por último para limpiar DNA o cambiarle el tampón se utilizó el *GenElute PCR Clean-Up Kit* (Sigma).

En el caso de *Bartonella spp.*, el DNA fue extraído con la ayuda del *Instagene Matrix* de BioRad, siguiendo paso a paso el protocolo dado por el fabricante.

Cuando fue necesario obtener el DNA a altas concentraciones y libre de endotoxinas, con el fin de transformarlo a células eucariotas, fue usado el kit *EndoFree Plasmid Maxi* de Quiagen.

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

4.2. AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR

Para la amplificación de fragmentos de DNA, siempre que se requirió una alta fidelidad en la polimerización, como en los casos de clonación, se utilizó la polimerasa Vent (BioLabs) o la PCR extender system (5prime) que permite amplificar tanto con alta fidelidad como grandes fragmentos de DNA. En el resto de las amplificaciones, como el caso de la comprobación de colonias, se utilizó la polimerasa Biotaq (Bioline).

Las reacciones se llevaron a cabo según la recomendación de cada fabricante y en un termociclador iCycler (Biorad). Todos los programas de amplificación incluyeron un primer paso de desnaturalización de 5 min a 95°C. Después se llevaron a cabo entre 26 y 30 ciclos de amplificación propiamente dicho, incluyendo cada uno un paso de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, uno de 30 segundos a la temperatura de hibridación adecuada para que los oligos hibriden con el DNA, y un último paso de extensión a 72 °C cuya duración depende del tamaño de DNA a amplificar (1 min por 1 Kb). Una vez concluida la amplificación las muestras se conservan a 4 °C.

4.3. PCR MUTAGÉNICA

Para obtener fragmentos de PCR con mutaciones al azar se utilizó el GeneMorph™ II PCR Mutagenesis Kit de Stratagene siguiendo el manual de instrucciones. La base de la reacción es la de una PCR normal, donde la polimerasa introduce una serie de mutaciones por Kb de fragmento amplificado. El número de mutaciones por Kb puede ser calculado en función de la cantidad de DNA molde utilizado en cada reacción.

4.4. DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo con enzimas de restricción de Fermentas siguiendo las instrucciones dadas por la casa comercial. Los volúmenes típicos de la reacción variaron de 20 a 50 µl, así como el tiempo de la reacción, entre 1 y 3 horas. La temperatura es dependiente según el enzima. Para inactivar las enzimas de restricción las reacciones fueron calentadas 20 minutos a 65 u 80 °C en función de la enzima.

4.5. LIGACIONES

Tanto los vectores de clonación como los insertos, provenientes de otros plásmidos o de reacciones de PCR, fueron digeridos con los enzimas correspondientes. Para aumentar la eficacia de la ligación y disminuir la aparición de falsos positivos se eliminaron los fosfatos terminales del vector digerido. La enzima utilizada para dicha reacción fue la fosfatasa alcalina (Fermentas) según las indicaciones del fabricante, manteniéndola 30 minutos a 37 °C e inactivándola posteriormente a 65 °C durante 20 minutos.

Por lo general, las reacciones de ligación se llevaron a cabo poniendo una relación vector/inserto de 1:5. Usando típicamente unos 100 ng de DNA en 20 µl de volumen final de la reacción. La enzima utilizada fue la ligasa del fago T4 (Fermentas),

manteniendo la reacción a 16 °C o/n. Como control negativo de las ligaciones se utilizó la misma reacción pero sin inserto, añadiendo el volumen equivalente de agua.

4.6. SECUENCIACIÓN DE DNA

Para comprobar la secuencia de los clones obtenidos, las muestras de DNA se enviaron al “Servicio de secuenciación de DNA HUMV-UNICAN” (Unidad de Genética Molecular, Hospital de Valdecilla, Santander), o al “Servicio de Secuenciación de DNA del CIB” (SECUGEN S.L. Madrid).

4.7. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Para analizar y manipular el DNA se utilizaron electroforesis en geles de agarosa al 0,8 o al 1 % (p/v) según el tamaño del DNA que se resolvía. La agarosa se disolvió en tampón TBE 0,5X a partir de TBE 10X (BioRad). Para la visualización del DNA se añadió a la agarosa bromuro de etidio a 0,25 mg/L, y en las últimas etapas de la tesis SYBR safe (Invitrogen) en una relación 1:100.000. Para cargar las muestras en el gel se utilizó tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) usando una relación 2/10 con el volumen de la muestra a cargar. Como marcador se utilizó el patrón HyperLadder I (Bioline).

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales (BioRad) en tampón TBE 0.5X a voltajes comprendidos entre 80 y 120 V. Las imágenes de los geles se obtuvieron en un transiluminador de luz ultravioleta GelDoc 2000 y se analizaron con el programa Quantity One (BioRad).

5. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo de *E. coli* en medio líquido se utilizó LB (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g por litro, Pronadisa). En medio sólido se utilizó LB-agar (se suplementa el LB con agar 1,5 % (p/v), Pronadisa) para las cepas de *E. coli* y Columbia Agar Sangre (Columbia Agar Base, Pronadisa, con 5 % de Sangre de Carnero desfibrinada, Oxoid) para las cepas de *Bartonella*. Todos los medios de cultivo se esterilizaron autoclavándolos a 120 °C durante 20 min. Para conservar las cepas de *E. coli*, se centrifugaron los cultivos en fase estacionaria y se resuspendieron en 50% de peptona 1,5% (p/v) y 50% de glicerol y se guardaron a -20 °C y -80 °C. En el caso de *Bartonella*, se recogieron con un hisopo las bacterias crecidas de una placa durante 3 ó 4 días, y se resuspendieron en 60% de LB y 40 % de glicerol guardándolas posteriormente a -20°C y -80°C.

Se añadieron antibióticos a los medios de cultivo para hacerlos selectivos. El cloranfenicol y la rifampicina se prepararon disueltas en etanol. En el resto de los casos, los antibióticos se prepararon disueltos en agua a una concentración 1000 veces mayor de la concentración final utilizada. Las concentraciones a las que se utilizaron son las que siguen:

Selección de *E. coli*

Ap: 100 µg/ml de ampicilina sódica (Apollo)

Cm: 25 µg/ml de cloranfenicol (Sigma)

Km: 50 µg/ml de sulfato de kanamicina (Sigma)

Nx: 25 µg/ml de ácido nalidíxico (Sigma)

Sm: 300 µg/ml de sulfato de streptomycin (Apollo)

Gm: 10 µg/ml de sulfato de gentamicina (Normon)

Rf: 100 µg/ml de Rifampicin (Sigma)

Selección de *Bartonella*

Gm: 10 µg/ml de sulfato de gentamicina (Normon)

Km: 30 µg/ml de sulfato de kanamicina (Sigma)

Sm: 100 µg/ml de sulfato de streptomycin (Apollo)

Rf: 50 µg/ml de Rifampicin (Sigma)

Tabla 4. Relación de antibióticos y concentraciones finales

5.2. TRANSFORMACIONES

Para introducir DNA plasmídico en células de *Ec* se utilizaron dos métodos, dependiendo de la muestra de partida. Cuando se transformaron con DNA obtenido a partir de la extracción de un cultivo, se empleó el método con TSB. Sin embargo, cuando el DNA procedía de una mezcla de ligación, se utilizó la electroporación ya que es 100 veces más eficiente que el método anterior.

5.2.1. Transformación por TSB

La transformación de DNA por medio de TSB (LB pH 6,1, con 10% de PEG, 5% DMSO, 10mM de MgCl₂ y 10mM de MgSO₄) (Chung and Miller, 1988), es un método con el que se pueden conseguir frecuencias de transformantes de hasta 10⁸ por µg de DNA.

Primero se necesita obtener las células competentes, creciendo 20 ml de LB hasta una DO₆₀₀ de 0,4-0,6. Las células son recogidas por centrifugación a 4000g y resuspendidas en 1ml de TSB a 4°C. Se deja incubar en hielo durante 10 min y se hacen alícuotas de 100 µl. Seguidamente se añaden de 10 a 100 pg del plásmido que se quiere transformar y se incuba en hielo de 10 a 30 min. Pasado este tiempo se añaden 900 µl de TSB con 20 mM de glucosa y se incuba a 37°C con agitación durante 60-90 min (según el antibiótico que porte el plásmido transformado) y se siembra en placas de LB-Agar con el antibiótico adecuado para seleccionar.

5.2.2. Transformación por electroporación

La transformación por electroporación tiene una frecuencia de transformación superior a la transformación por TSB, llegando a frecuencias de 10¹⁰ transformantes por µg de DNA (Dower *et al.*, 1988). Esta técnica se utiliza para transformar principalmente ligaciones y plásmidos de baja eficiencia de transformación. Para obtener las células competentes para electroporar se crecen 200 ml de cultivo hasta una DO₆₀₀ de 0,5-0,7 y se centrifuga a 4000g durante 15 min a 4°C. Es importante trabajar

en todo momento a ésta temperatura. Se hacen dos lavados con agua destilada miliQ estéril a 4°C y finalmente se resuspenden en un 0,5 % del volumen inicial con glicerol al 10%. Se reparte en alícuotas de 50 µl, y si no van a ser utilizadas inmediatamente se congelan con hielo seco para luego guardarlas a -80°C para su posterior utilización.

Para las transformaciones por electroporación se dializa el DNA en filtros Millipore GS de 0,05 µM de tamaño de poro en una placa Petri con agua MilliQ durante 20-30 min, de manera que se pierda la mayor cantidad de sales posibles. El DNA se recoge y se añade de 1 a 100 pg de este DNA a una alícuota de las células competentes. La mezcla se coloca en una cubeta de electroporación de 0,2 cm *Gene Pulser* de BioRad (Hercules, California), estando todo preenfriado y manteniéndolo posteriormente a 4°C. Para la transformación se utilizó un electroporador Micropulser™ de BioRad a 2,5 kV, 25µF y 200 Ω. Rápidamente se añade 1 ml de LB estéril y se resuspenden las células en él. Pasamos este ml a un microtubo y lo incubamos a 37 °C con agitación para la expresión de la resistencia del antibiótico correspondiente (de 60 a 90 min en función del antibiótico). Por último plaqueamos 100 µl en LB-Agar con el antibiótico correspondiente.

5.3. CONJUGACIONES

5.3.1. De *E.coli* a *E.coli*

Las conjugaciones se realizaron básicamente como se describe en (Grandoso *et al.*, 2000). Las cepas donadoras, así como las receptoras, han sido según el caso *Ec* DH5α o *Ec* D1210 siendo siempre donadoras y receptoras dos cepas con distinta selección de antibiótico, nunca se ha utilizado una misma cepa como donadora y receptora.

Se crecen los cultivos hasta fase estacionaria con los antibióticos correspondientes. Se mezclan de 100 a 250 µl de células donadoras con las mismas de células receptoras en un mismo microtubo (el número de bacterias no varía la frecuencia conjugativa pero sí puede permitirnos aumentar la detección cuando la eficiencia conjugativa es muy baja). Para retirar los antibióticos se lavan las bacterias con LB. En

un microtubo con 1 ml de LB se añaden donadoras y receptoras. Se centrifuga 1 min a 12.000 G, se retira el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de LB. Tras la posterior centrifugación y descartado el sobrenadante se resuspende en 50 µl de LB. Tanto la conjugación del plásmido R388 como sus derivados es más eficiente en medio sólido que en medio líquido (Bradley, 1980), las conjugaciones se realizaron en filtros de nitrocelulosa (GS Millipore de 0,22 µm de tamaño de poro y 25mm de diámetro) sobre placas de LB-Agar. Se colocan los 50 µl de las células lavadas sobre el filtro de conjugación y la placa se mantiene a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, el filtro es retirado con pinzas estériles, se introduce en 2 ml de LB estéril y se resuspende con vórtex. Constituyendo estos dos mililitros la dilución cero.

Para calcular la eficiencia de conjugación se hacen las diluciones adecuadas y se siembran en placas de LB-Agar con el antibiótico apropiado para seleccionar donadoras por un lado y transconjugantes por el otro. Las frecuencias de conjugación son determinadas calculando el número de transconjugantes por donador. Como las frecuencias de conjugación siguen una distribución de Poisson, se han medido los logaritmos en base 10 de las frecuencias, se han calculado los logaritmos neperianos de las frecuencias, y se han realizado las medias pertinentes.

5.3.2. De *E.coli* a *Bartonella* spp.

La técnica es similar pero con ligeras diferencias, pues las especies de *Bartonella* no crecen ni en LB ni en medio líquido. Las donadoras fueron crecidas como se ha detallado en el apartado anterior. Las receptoras, *Bartonella* spp., fueron crecidas en medio sólido Columbia Agar (Pronadisa) con 5 % de Sangre de oveja defibrinada (Oxoid) durante 3-4 días con los antibióticos adecuados. Se recogen las bacterias de media placa con ayuda de unos hisopos y se resuspenden en 1 ml de PBS. De igual manera, a 1 ml de PBS añadimos 200 µl de células donadoras crecidas en medio líquido. Centrifugamos y resuspendemos de nuevo en 1 ml de PBS. Tras la última centrifugación y decantación del sobrenadante resuspendemos las células donadoras (*E.coli*) en el volumen inicial cogido del cultivo (200 µl) y *Bartonella* spp. es resuspendida en 80 µl de PBS. A estos 80 µl añadimos 20 µl de las células donadoras y depositamos la mezcla sobre un filtro de nitrocelulosa (GS Millipore de 0,22 µm de diámetro) colocado previamente en una placa de Columbia Agar Sangre sin antibióticos.

La placa la mantenemos a 37 °C en una estufa húmeda con el 0,5 % de CO₂ durante 6 horas.

Para calcular la eficiencia de conjugación se procede de igual manera que en el apartado anterior, usando PBS para hacer las diluciones y plaqueando donadoras y receptoras en sus medios y con sus antibióticos adecuados. Donadoras *Ec* DH5α en LB agar Nx Gm y crecidas o/n a 37°C. Transconjugantes *Bt* (Sm Gm) o *Bh* (Rf Gm) en estufa de CO₂ al 5% a 37°C durante 6-9 días.

Por otro lado, todos los plásmidos ensayados en *Bartonella spp.* fueron introducidos por conjugación. En este caso, la eficiencia de conjugación no era relevante, sino la obtención de los transconjugantes en sí. Para ello, con un asa de siembra de plástico, recogimos una pequeña cantidad del disco de conjugación pasadas las 6 horas, y se hizo un restreaking en estría para obtener colonias aisladas.

5.3.3. De *Bartonella tribocorum* a *E. coli* (DH5α)

El procedimiento es el mismo que en el caso anterior pero utilizando, en lugar de 20 µl de *E. coli* durante la conjugación, 200 µl.

Para la selección de donadoras se plaquea en placas de Columbia Agar sangre con Sm Gm y los transconjugantes en placas de LB agar con Nx Gm.

5.3.4. De *Bartonella tribocorum* a *Bartonella henselae*

En este caso ambas cepas de *Bartonella* se tratan como se describe en el apartado 5.3.2. Para la conjugación se utilizan bacterias previamente crecidas en placas adecuadas, recogiendo la mitad de la placa con un hisopo y lavando varias veces. Posteriormente, donadoras y receptoras se mezclan como se describe en los apartados anteriores y se procede a calcular el número de donadoras y receptoras mediante selección con antibióticos adecuados. La selección para donadoras es Sm Gm y para los transconjugantes en Rf Gm, ambas en placas Columbia Agar sangre.

5.4. ENSAYO DE DOS HÍBRIDOS BACTERIANO

El ensayo de dos híbridos es una técnica que permite analizar interacciones proteína-proteína, pudiendo llegar a establecerse la intensidad de dichas interacciones. Nosotros hemos utilizado para estos análisis la cepa DHM1 (deficiente en Adenilato ciclasa (Aci)) co-transformada con dos plásmidos que codifican nuestras proteínas de estudio fusionadas a los dominios T25, por un lado y T18, por el otro, de la Aci. De este modo, si las dos proteínas estudiadas interaccionan, los dos dominios de la Aci están suficientemente cerca como para realizar su función y activar ciertos genes *reporter*, en este caso el gen *lacZ* (Karimova et al., 1998) (Figura 1).

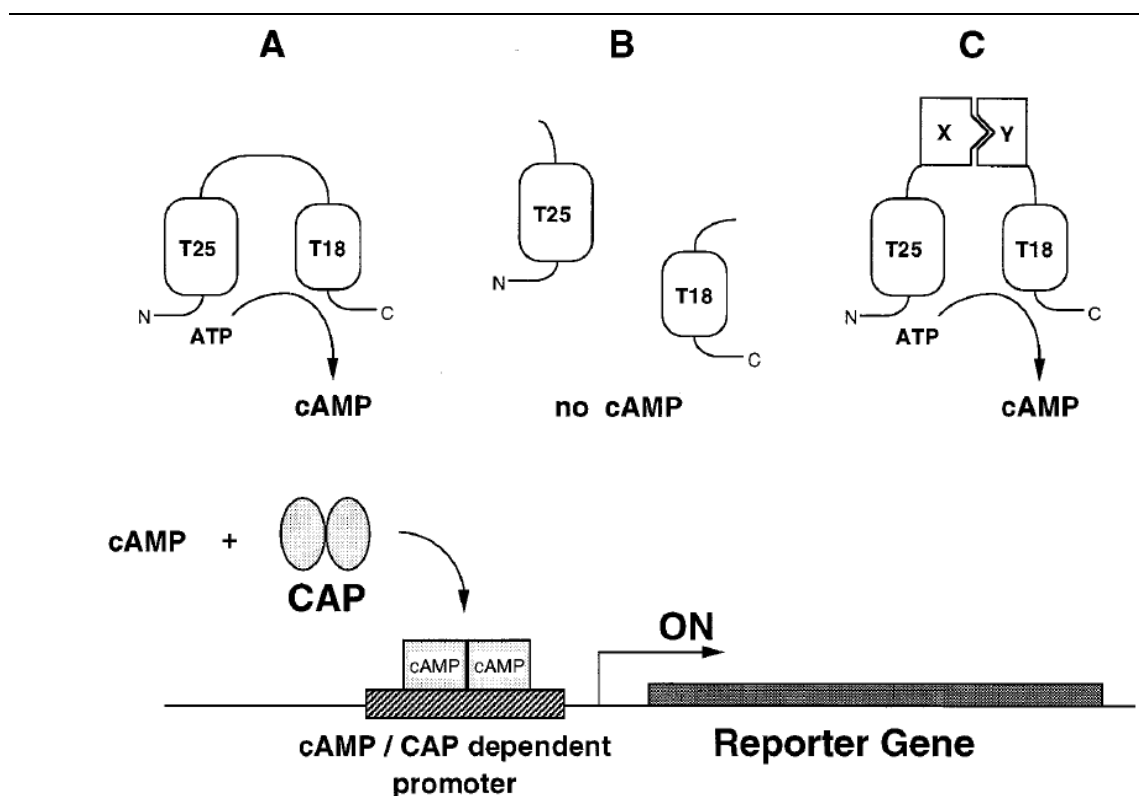


Figura 1. Principio del ensayo de dos híbridos bacteriano basado en la complementación funcional de fragmentos de Aci. T25 se corresponde con los aminoácidos 1-224 de la Aci y T18 a los aminoácidos 225-399. **A.** Estructura catalítica de la Aci. **B.** los dos fragmentos son coexpresados independientemente y al no interaccionar no producen AMPc. En **C,** dos proteínas que interaccionan (X e Y) son fusionadas a ambos dominios de la Aci y como resultado, de la proximidad de ambos dominios se produce la expresión de AMPc que puede observarse, a su vez, por la expresión de un gen reportero (abajo), en nuestro caso, *LacZ*. Tomada de (Karimova et al., 1998).

En cada ensayo se utiliza un control negativo, los plásmidos vacíos (donde a los dominios T25 y T18 no se les ha fusionado ninguna proteína), y un control positivo, plásmidos donde ambos dominios están fusionados a una región que codifican una cremallera de leucinas (lo que asegura que las dos proteínas interactúen fuertemente).

5.4.1. Ensayo en placa

Se introdujeron por transformación los dos plásmidos con las fusiones a ensayar en la cepa DHM1, que se manejó siempre a 30°C. Si la transformación se siembra en placas con X-gal, se puede observar el color directamente. Sin embargo, para poder comparar la intensidad del color sin que éste dependiese de la placa en particular, el tamaño de la colonia, etc, tres transformantes independientes son crecidos juntos en LB a 30°C durante toda la noche. Al día siguiente, bien se deja caer una gota de 5-10 µl de medio, bien se hacen restreakings con esa misma cantidad de medio en secciones de una misma placa de LB agar con los antibióticos correspondientes y X-Gal, y se incuban a 30°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo pueden observarse los niveles de color azul de cada gota o sección y compararse con los de la misma placa. Siempre se introdujeron los controles positivo y negativo en cada placa.

5.4.2. Ensayo β-galactosidasa

Este ensayo se utiliza para medir de manera cuantitativa la actividad β-galactosidasa, utilizando ONPG (orto-nitrofenil-β-galactopiranosido) como sustrato cromogénico.

Se crecen las cepas en LB durante toda la noche poniendo los controles adecuados. Al día siguiente se diluye la muestra para poder medir la DO₆₀₀, anotando el valor. Se mezclan 50µl de cultivo con 450 µl de buffer Z (60 mM Na₂HPO₄·H₂O, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1mM MgSO₄·7H₂O y 50 mM β-mercaptoetanol; pH 7). A estos 500 µl se añaden 50 µl de cloroformo y 25 µl de SDS al 0.1% y se agitan en vórtex durante 10 seg, incubando posteriormente 5 min a 30°C para que se equilibre la temperatura.

La reacción se inicia añadiendo 200 µl de ONPG (Sigma) (4 mg/ml) diluido en buffer Z y hecho en el día; se mezcla bien y se coloca a 30°C. Es importante tomar el tiempo, pues posteriormente, nada más empezar a aparecer color amarillo en la mezcla, se para la reacción añadiendo 500 µl de 1M Na₂CO₃ y se anota el tiempo pasado desde el inicio de la reacción hasta que se paró. Si hay varias muestras, hasta que se mida su DO, es importante guardarlas en oscuridad pues la mezcla es fotosensible.

Por último, se mide la DO de la mezcla a 420 y 550 nm. Como blanco se utiliza una muestra con todos los reactivos con 50 µl de LB en lugar de los del cultivo.

Para calcular las unidades se utiliza la siguiente fórmula:

$$1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / \text{minutos} \times \text{vol de células (ml)} \times \text{DO}_{600} \text{ (antes del ensayo)}$$

5.5. INDUCCIÓN DEL SISTEMA RECOMBINATIVO RED

Los siguientes métodos fueron utilizados para tratar de inducir fenómenos de recombinación entre plásmidos. La cepa DY380, además, ha sido utilizada para realizar construcciones plasmídicas según el método conocido como Wanner, basado en la recombinación homóloga entre un plásmido determinado y un producto de PCR con secuencias homólogas a dicho plásmido.

5.5.1. Utilización de la cepa DY380

Este sistema ha demostrado ser altamente eficiente para realizar construcciones por recombinación homóloga entre DNA cromosómico o plasmídico y un fragmento linear de PCR. Dicha recombinación es eficiente con secuencias de homología cortas (de 30 a 50 pb). La cepa DY380 tiene la peculiaridad de tener los genes implicados en la recombinación Red bajo el fuerte control de un represor sensible a temperatura. Así, cuando se expone a la bacteria a una temperatura de 42°C, se induce la expresión de los genes recombinativos, y un inhibidor de las nucleasas RecBCD que impide el ataque del DNA linear electroporado.

El uso de esta cepa ha de ser siempre a 32°C, porque el sistema recombinativo es inducible por calor. Para preparar electrocompetentes y generar recombinantes se procedió según el método descrito por (Lee et al., 2001).

Construcción de plásmidos. Las bacterias con el plásmido a ser modificado por recombinación fueron crecidas en 50 ml de medio hasta llegar a una DO. de 0,6. A continuación el cultivo se mantuvo a 42°C durante 15 min (activándose así el sistema recombinativo). Seguidamente se colocó el cultivo en hielo durante 20 min. Se centrifugaron las células durante 10 min a 4000 rpm y se lavaron con 50 ml de agua estéril enfriada en hielo 3 veces. Por último las células son resuspendidas en 250 µl de agua estéril fría (obteniendo así 5 alicuotas de 50 µl). Para la transformación por electroporación se utilizó una alicuota y unos 100-300 ng DNA lineal. Tras la electroporación se añadió 1 ml de LB y se incubó el cultivo a 32 °C durante 1 hora y 30 min. Posteriormente las bacterias son crecidas siempre a 32 °C. Para la selección del recombinante, el fragmento de DNA lineal obtenido por PCR además de los 40 pb homólogos, en ambos extremos del fragmento, contenía un gen de resistencia a antibiótico flanqueado por sitios de restricción, favoreciendo así su posterior eliminación o manipulación de la construcción.

Recombinación entre dos plásmidos con secuencias homólogas. En este caso, se crecieron las bacterias (DY380) portando el plásmido pAB2 y se realizaron electrocompetentes con el sistema Red previamente activado tal y como se ha descrito anteriormente. El DNA electroporado no fue un fragmento de PCR sino derivados de R388 con mutantes para cada uno de los genes de la región Mpf sin capacidad conjugativa. Las bacterias electroporadas fueron crecidas durante toda la noche en placas con antibióticos para seleccionar ambos plásmidos (Tp y Tc). Al día siguiente, las colonias resultantes fueron recogidas con un hisopo, lavadas, y utilizadas como donadoras en una conjugación donde las bacterias receptoras fueron *E.coli* DH5α. Tras dos horas de conjugación a 30°C, se plaqueó y se seleccionó Nx Tp, buscando plásmidos derivados de R388 capaces de conjugar a las bacterias receptoras. Para aumentar la expresión del sistema Red y tratar de obtener recombinantes también se hicieron ensayos donde la conjugación se realizó a 37°C.

5.5.2. Utilización del plásmido pKD20

Este sistema recombinativo es utilizado principalmente para inactivar genes cromosómicos de *E. coli* por recombinación homóloga con productos de PCR. La homología necesaria para la recombinación oscila entre los 30 y 50 nt. El plásmido pKD20 codifica el sistema Red recombinasa del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (Datsenko and Wanner, 2000). Además, es un plásmido que se puede perder posteriormente de manera sencilla al eliminar la selección y crecer a 37°C.

En nuestro caso lo utilizamos para potenciar la recombinación entre dos plásmidos que comparten regiones con una alta homología, el plásmido pAB2 y derivados de R388. Así el plásmido pKD20 fue introducido a bacterias que portaban dichos plásmidos (el pAB2 y algunos de los mutantes de la región *Mpf* de R388). Las condiciones de inducción variaron de 1 a 6 horas de inducción por arabinosa. Posteriormente, tras la inducción se utilizaron estas bacterias como donadoras en conjugación tal y como se ha desarrollado anteriormente.

6. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR

6.1. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo (Tabla 5) fueron crecidas en DMEM con GlutaMax (Gibco), suplementadas con un 10 % de suero fetal bovino (Cambrex), a 37 °C y 0,5 % CO₂.

Línea Celular	Descripción	Origen ATCC
HeLa	Células humanas de carcinoma de cérvix	CCL-2
EA.hy 926	Fusión de células HUVEC y la línea A549 de carcinoma de pulmón	CRL-2922
HEK293T	Células de riñón de embrión humano	CRL-11268

Tabla 5. Relación de líneas celulares humanas utilizadas en este trabajo.

6.2. TRANSFECCIONES

Para la transfección de células HEK293T se utilizó el agente catiónico de transfección JetPEI™ (Marca) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Las transfecciones fueron realizadas con el ánimo de comprobar que las construcciones hechas para analizar la expresión de eGFP en células eucariotas eran funcionales.

6.3. INFECCIONES DE CÉLULAS HUMANAS CON *BARTONELLA* SPP.

En las infecciones de células humanas por *Bartonella* se incuban cultivos celulares con una cierta cantidad de bacterias en el mismo pocillo. En nuestro caso utilizamos células Ea.hy 926 por ser las idóneas para ser infectadas por *Bartonella henselae*. En una placa de seis pocillos (Corning) se colocan 70.000 células iniciales por pocillo. Para ello, de un cultivo celular casi confluyente levantamos las células con Tripsina (Gibco) y añadimos medio DMEM con el 10% de FBS para llevarlo al volumen original. Contamos el número de células que tenemos con una cámara de Neubauer y realizamos los cálculos pertinentes para saber la dilución correcta para poner 3 ml de medio y 70.000 células por pocillo. Las células se dejan crecer aproximadamente durante 16 horas en un incubador húmedo a 37 °C y 5 % de CO₂.

Al día siguiente, se aspira el medio con cuidado de no levantar las células y se reemplaza por medio M199 (Gibco) al 10% de FBS. Dejamos incubar las células mientras seguimos con el proceso.

De una placa de agar sangre, previamente crecida durante 3-4 días con los antibióticos correspondientes a 37 °C y 5 % de CO₂, recogemos las bacterias con un hisopo y las resuspendemos en PBS. Medimos la DO a 600nm para conocer el número de bacterias que tenemos y calculamos los microlitros que necesitamos poner en cada pocillo para tener la cantidad de bacterias deseadas por célula. Se estima que a una $DO_{600} = 1$ hay unas 10^9 bacterias por ml (Kirby and Nekorchuk, 2002). Añadimos la cantidad concreta de las bacterias en suspensión a las células previamente incubadas en M199 10% FBS e incubamos todo durante 3 días a 37 °C y 5 % de CO₂. En el caso de

que las bacterias porten un plásmido que les confiera resistencia, también se añade el antibiótico adecuado al medio de infección.

6.4. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La detección por este sistema es una buena técnica para determinar el aspecto de la célula y ver, por ejemplo, si la proteína GFP está distribuida por todo el citoplasma o si se distribuye en regiones concretas. Para detectar la expresión de GFP por microscopía se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400.

6.5. CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)

Es la técnica más sensible y precisa de las utilizadas en este trabajo para la detección de eGFP. Se utilizó un citómetro de flujo modelo BD FACS Canto II por el cual se pasaron las células para determinar el porcentaje de células positivas para GFP y la intensidad de la señal.

Después de haber incubado durante tres días las bacterias y las células a 37°C en una estufa húmeda al 5% de CO₂, retiramos el sobrenadante y lavamos con 1ml de PBS por pocillo para eliminar bien las células muertas y la mayor parte posible de bacterias. Se retira el PBS y se levantan las células con Tripsina. Se añadieron 10 ml de PBS y se centrifugaron las células a 1.000 rpm durante 5 min, retirando cuidadosamente el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en 200-300 µl de PBS que se pasan a tubos especiales para FACS (Deltalab). Así conseguimos tener las células limpias, resuspendidas en PBS. Por último, cada muestra es pasada por el FACS y se analizan los resultados.

Primero se establece la población, eliminando los agregados, células muertas y bacterias. Esto es posible ya que el citómetro separa las células en función de su tamaño y complejidad. Posteriormente, utilizando un control negativo se ajusta la línea basal a partir de la cual se establece una señal positiva de GFP.

7. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

7.1. EXTRACTOS PROTEICOS

La obtención de extractos proteicos a partir de cultivos celulares se realizó utilizando un FASTPREP FP120 (Bio 101 Thermo Savant). Este aparato rompe por cizalladura las bacterias, permitiendo tener un pool de proteínas citosólicas, periplásmicas y de membrana. El protocolo es el siguiente: Se parte de 50 ml de cultivo con $DO_{600} = 1$. Se centrifuga 10 min a 3.500 rpm y resuspendemos el precipitado en 500 μ l de PBS que contiene 1mM EDTA, 1 mM PMSF y 10 mM de benzamidina. La suspensión se transfiere a tubos de FASTPREP conteniendo lysing matrix B, y las células son lisadas en el aparato durante 2 ciclos de 30 s a una velocidad de 6.0. Se centrifuga a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C, así bacterias enteras y segmentos grandes de las mismas precipitan. Por último se hacen alicuotas del sobrenadante, parte es usada para determinar la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford, y el resto es guardado a -80°C para su posterior utilización.

7.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. BRADFORD

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

Para llevarlo a cabo, se hace una dilución 1:5 del reactivo y se añaden 800 µl de esta dilución a cada una de las muestras. Para la recta patrón se preparan 6 muestras de 200 µl cada una con concentraciones crecientes de seroalbúmina bobina (BSA, Sigma), de 0 a 9 µg de proteína. Se mezcla y se dejan pasar 10 min antes de medir la DO₅₉₅. Al mismo tiempo que se han preparado las muestras de la recta, se preparan las muestras problema.

Éste ha sido el método utilizado para determinar la concentración de las proteínas, calculando la concentración como la media de 4 muestras con diferentes volúmenes de medida.

7.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-PAGE

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

Una vez realizada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Azul Brillante Coomassie R250 0,1%(p/v), metanol 40% (v/v) y ácido acético glacial 10% (v/v) durante 15 min con agitación a temperatura ambiente. Una vez teñidos, la destinción se realizó en una solución que contenía metanol al 40% (v/v) y ácido acético glacial al 10% (v/v), nuevamente a temperatura ambiente y con agitación. Las imágenes de los geles fueron tomadas con un sistema Fluor-STM Multimager (BioRad).

7.4. WESTERN BLOT

Las muestras que han sido corridas en un gel de poliácridamida pueden ser transferidas a un filtro de nitrocelulosa para identificar las proteínas allí presentes

mediante la utilización de anticuerpos específicos que las reconozcan. Seguimos el método descrito por (Towbin *et al.*, 1979).

Para realizar la transferencia se empleó un Mini Trans-Blot (BioRad). Se coloca sobre el soporte una esponja empapada en buffer de transferencia o TGM (Tris 20 mM, glicina 15 mM y metanol al 20%, pH 9,2). Sobre la esponja se sitúa papel de filtro Whatman 3MM Chr (también empapado), el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa previamente mojada. Sobre ésta, se coloca de igual manera papel de filtro y otra esponja. Una vez cerrado el soporte, se introduce en una cubeta con TGM y un bloque de TGM congelado para evitar el sobrecalentamiento del buffer. La transferencia se lleva a cabo durante 1h ó 1h 30 min a 360-400 mA (según tamaño de la proteína).

Una vez terminada la transferencia, se recoge la membrana con unas pinzas y se bloquea con Membrane blocking agent (Marca, y/o composición) al 3% en TBST (Tris H-Cl 50mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien a 4°C durante la noche. Posteriormente se incuba durante 1-1,5 horas en TBST con Membrane blocking agent al 3% y con el anticuerpo primario a la dilución que se indica en la Tabla 6.

Transcurrido el tiempo necesario se hacen de nuevo 3 lavados con TBST, 10 min cada uno y cambiando el buffer cada vez. Seguidamente, se incuba con el segundo anticuerpo, IgG anti-rabbit conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich), en una relación 1:5.000 en TBST con 3% de Membrane blocking agent. Tras la incubación, se lava 3 veces la membrana durante 10 min, con TBST.

Anticuerpo	Concentración	Referencia
Anti TrwC	1:10.000	(Grandoso <i>et al.</i> , 1994)
Anti TrwB	1:5.000	(de Paz <i>et al.</i> , 2010)
Anti TrwK	1:5.000	(Arechaga <i>et al.</i> , 2008)
Anti TrwD	1:50.000	(Rivas <i>et al.</i> , 1997)
Anti TrwJ	1:10.000	(Sastre, 1996)

Tabla 6. Lista de anticuerpos y proporciones utilizadas

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

3

PANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Los distintos miembros de la familia de T4SS presentan una gran homología entre sí, y sin embargo realizan roles biológicos muy diferentes. Los T4SS Trw del plásmido R388 y de *Bartonella spp.* son los sistemas de secreción más parecidos a nivel genético, pero sus funciones son bien distintas: uno es fundamental en el proceso conjugativo del plásmido R388, y el otro es requerido en el proceso infectivo de distintas cepas de *Bartonella*.

Consideramos interesante abordar un estudio comparativo de ambos T4SS, para entender cuáles son los elementos claves que determinan la versatilidad biológica de los T4SS. Además, pensamos que esta similitud permitiría la manipulación de los T4SS y la proteína acopladora que recluta el sustrato, con el fin de intercambiar sustratos y obtener así transferencia de DNA a través del sistema Trw de *Bartonella*, un T4SS sin función conjugativa conocida.

Por todo esto, en este trabajo nos planteamos tres objetivos principales:

- 1- Estudiar si los componentes de ambos sistemas pueden ser intercambiables, tanto a nivel estructural como a nivel funcional.
- 2- Analizar la base molecular de las interacciones de la proteína acopladora, tanto con el sustrato como con el T4SS, y obtener mutantes que afectasen dicha interacción.
- 3- El objetivo más ambicioso es el de conseguir transferencia de DNA a través del T4SS de *Bartonella henselae* a las células humanas que infecta.

Los objetivos propuestos tienen una vertiente básica, pues persiguen ahondar en el conocimiento sobre la biología de los T4SS, y otra aplicada, al intentar usar ese conocimiento para manipular los T4SS con vistas a la obtención de una nueva técnica de manipulación de células humanas con gran potencial biomédico y biotecnológico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS T4SS “TRW”
DE R388 Y *BARTONELLA*

Capítulo 2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA PROTEÍNA
ACOPLADORA DE R388

Capítulo 3. TRANSFERENCIA DE DNA DESDE *BARTONELLA*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO 1

1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS T4SS “TRW” DE R388 Y *BARTONELLA*

1.1. HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS T4SS

Para llevar a cabo los ensayos comparativos entre los T4SS de R388 y *Bt* contábamos con una serie de plásmidos ya construidos, y otros creados en el presente trabajo.

El análisis de la secuencia de DNA (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006) sugiere que los genes involucrados en la formación del T4SS de R388 están presentes en los operones, que llamaremos operón 1 (*trwL-I*) y operón 2 (*trwH-D*). Como la eficiencia de conjugación, al menos en condiciones de laboratorio, no se ve afectada por la falta de *trwN* (Bolland *et al.*, 1990), hemos trabajado con los mutantes del operón 1 y el operón 2 sin la presencia de dicho gen. Ambos hipotéticos operones están presentes en el plásmido pSU4058 (Bolland *et al.*, 1990). El plásmido pFJS134 contiene la misma región *Dtr_w* en un replicón compatible.

Para analizar la región R388 en detalle, se trabajó con una serie de mutantes por inserción del transposón Tn5tac1 o del interposón Ω [(Bolland *et al.*, 1990). Figura 1 y Tabla 2 de Metodología (M)]. Mediante una serie de complementaciones (de Paz *et al.*,

2005) se comprobó que estas mutaciones son no polares, a excepción del mutante pSU4133, en *trwL*, que puede presentar un efecto polar sobre *trwK* (de Paz et al., 2005).

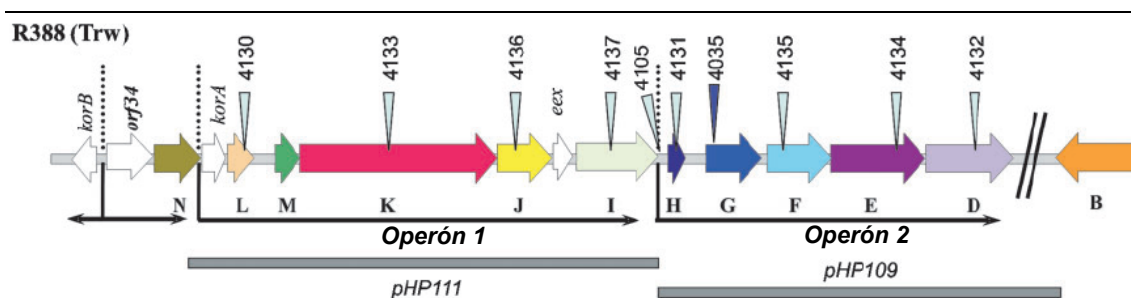


Figura 1. Esquema de los genes que codifican el T4SS de R388. El prefijo de los genes (*trw*) ha sido omitido por claridad. En el mapa, las unidades transcripcionales están indicadas con flechas negras que comienzan en los promotores propuestos y van en la dirección de la transcripción. Los “*kor* boxes” están indicados con líneas punteadas verticales. Los mutantes por inserción del transposón Tn5tacl1 en R388 utilizados en esta tesis están indicados con triángulos azules, que marcan el sitio de inserción del transposón y el nombre del plásmido, sin su prefijo pSU. El triángulo azul oscuro indica la inserción Ω en el plásmido pSU4035. Los rectángulos grises indican los fragmentos *trw* clonados en los plásmidos pHP109 y pHP111.

Además, en este trabajo construimos los plásmidos pHP111 y pHP109 (Tabla 3, M) que contienen el operón 1 y 2 respectivamente (Figura 1). Por razones de compatibilidad entre plásmidos, los operones 1 y 2 tuvieron que ser clonados en plásmidos diferentes que presentan un número de copias distinto.

Por otro lado, contamos con un cósmido, pAB2, que contienen todo el sistema *trw* del T4SS de *Bt* (Seubert et al., 2003).

1.2. ANÁLISIS DE LA REGIÓN TRW DE R388

Con las herramientas descritas, realizamos una serie de ensayos de complementación de los mutantes de R388 en los distintos genes *trw*, que se suman en la Tabla 1.

Plásmido	Región Trw de R388	Frecuencia de transferencia con plásmido helper *				
		Ninguno	pSU4058 (operón 1 y 2)	pHP109 (operón 2)	pHP111 (operón 1)	pHP109 + pHP111 (operones 2+1)
pSU2007	Todo	7.0×10^{-1}	ND	ND	ND	ND
pSU4130	Sin TrwL	$<10^{-6}$	2.6×10^{-1}	ND	8.6×10^{-5}	1.0×10^{-2}
pSU4133	Sin TrwK	$<10^{-6}$	8.0×10^{-2}	ND	3.2×10^{-4}	8.4×10^{-3}
pSU4136	Sin TrwJ	$<10^{-6}$	9.0×10^{-2}	ND	5.0×10^{-2}	1.0×10^{-2}
pSU4137	Sin TrwI	$<10^{-6}$	3.3×10^{-1}	ND	2.3×10^{-3}	1.8×10^{-2}
pSU4131	Sin TrwH	5.2×10^{-5}	1.5×10^{-1}	1.6×10^{-3}	ND	1.6×10^{-2}
pSU4035§	Sin TrwG	$<10^{-6}$	5.1×10^{-2}	ND	ND	ND
pSU4135	Sin TrwF	$<10^{-6}$	3.0×10^{-1}	7.0×10^{-3}	ND	2.2×10^{-2}
pSU4134	Sin TrwE	$<10^{-6}$	1.8×10^{-1}	7.9×10^{-3}	ND	9.8×10^{-3}
pSU4132	Sin TrwD	$<10^{-6}$	1.2×10^{-1}	9.1×10^{-3}	ND	3.5×10^{-2}
pFJS134	TrwABC	$<10^{-6}$	1.1×10^{-1}	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	2.1×10^{-1}

Tabla 1. Frecuencias conjugativas de los mutantes de R388 al ser complementados por distintos plásmidos *helpers*.

*Cada mutante de R388 fue introducido en *Ec* D1210 con el plásmido helper indicado. Como cepa receptora de la conjugación se utilizaron *Ec* DH5 α .

§ El mutante pSU4035 no fue ensayado por complementación de pHP109 porque ambos plásmidos tienen el replicón p15A.

Los nueve mutantes con inserciones en los distintos genes *trw* son incapaces de movilizarse por sí solos, a excepción del mutante en *trwH*, que conjuga, pero unas 5.000 veces peor que el salvaje. Por lo tanto, todos los componentes del T4SS son necesarios para su funcionalidad. Cuando los mutantes son complementados en *trans* por el plásmido pSU4058, que contiene los operones 1 y 2 (*trwL-D*), las frecuencias de conjugación recuperan los valores normales. Si los mutantes son complementados por uno de los dos operones por separado, la movilidad también se recupera, pero las eficiencias son inferiores a las presentadas por la complementación del plásmido pSU4058. Cuando los dos plásmidos pHP109 y pHP111 están presentes a la vez, los niveles de complementación fueron más altos, aunque a pesar de todo, la eficiencia fue unas 10 veces inferior que al complementar con el plásmido pSU4058. Hay que recordar la importancia de las relaciones estequiométricas en los complejos formados por varias proteínas, que en este caso, parece ser más crítica entre las proteínas de un mismo operón que entre los dos operones.

Para analizar la integridad y funcionalidad de los supuestos operones 1 y 2 cuando se expresan por separado, realizamos ensayos de movilización del plásmido pFJS134, que contiene sólo la región *Dtr* de R388. Los resultados fueron comparados con la movilización de dicho plásmido por pSU4058, que contiene ambos operones. Como se observa en la (Tabla 1), los operones expresados separadamente pueden movilizar al plásmido pFJS134, y lo hacen con una frecuencia similar a la del plásmido pSU4058 que expresa los dos operones juntos. Esto evidencia que el T4SS se está ensamblando adecuadamente cuando los dos operones están expresándose separadamente, apoyando los análisis de DNA que sugerían la posibilidad de que estas regiones fueran dos unidades transcripcionales.

1.3. INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE LOS T4SS TRW DE R388 Y *BARTONELLA*

Son varios los ejemplos de complementaciones heterólogas entre diferentes T4SS: VirB1 de *Bs* y TraL de pKM101 pueden complementar, en parte, estructural y funcionalmente mutantes de *At* para VirB1 (Hoppner *et al.*, 2004). Schmidt-Eisenlohr y colaboradores (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999b) demostraron que el homólogo de VirB5, TraC de pKM101, podía complementar parcialmente una cepa de *At* deficiente en VirB5. También se han demostrado complementaciones estructurales y funcionales de VirB4 de *At* por parte de VirB4 de *Bs* (Yuan *et al.*, 2005).

Estudios previos han demostrado complementación parcial por TrwD *Bt* y TrwH *Bt* en mutantes de R388 defectivos en TrwH y TrwD (Seubert *et al.*, 2003). Para extender estos resultados y ver si existe complementación funcional en el resto de genes, realizamos una serie de ensayos de complementación usando el cósmido pAB2, que porta todo el locus *trw* de *Bt* y es capaz de replicar en *Ec*, para complementar los mutantes en los genes *trw* de R388. Así, obtendríamos datos de si otros componentes de R388 podrían ser sustituidos por sus homólogos de *Bt*. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Plásmidos en el donador	R388 Trw	<i>Bt</i> T4SS	Frecuencia de conjugación
pSU1423§+ pSU4058	TrwABC + TrwL-D	-	4×10^{-1}
pSU1423§+ pSU4058 + pAB2	TrwABC + TrwL-D	+	5×10^{-1}
pSU1423§+ pAB2	TrwABC	+	$< 10^{-6}$
pSU1423§+ pAB2 + pHP111	TrwABC + TrwL-I	+	$< 10^{-6}$
pSU4051§+ pAB2 + pHP109	TrwABC + TrwH-D	+	$< 10^{-6}$
pSU4130	Sin TrwL	-	$< 10^{-6}$
pSU4130+ pAB2	Sin TrwL	+	$< 10^{-6}$
pSU4133	Sin TrwK	-	$< 10^{-6}$
pSU4133+ pAB2	Sin TrwK	+	$< 10^{-6}$
pSU4136	Sin TrwJ	-	$< 10^{-6}$
pSU4136+ pAB2	Sin TrwJ	+	$< 10^{-6}$
pSU4137	Sin TrwI	-	$< 10^{-6}$
pSU4137+ pAB2	Sin TrwI	+	$< 10^{-6}$
pSU4131	Sin TrwH	-	5.2×10^{-5}
pSU4131+ pAB2	Sin TrwH	+	1.6×10^{-4}
pSU4035	Sin TrwG	-	$< 10^{-7}$ *
pSU4035+ pAB2	Sin TrwG	+	2.9×10^{-6}
pSU4134	Sin TrwE	-	$< 10^{-6}$
pSU4134+ pAB2	Sin TrwE	+	1.1×10^{-5}
pSU4132	Sin TrwD	-	$< 10^{-6}$
pSU4132+ pAB2	Sin TrwD	+	2.1×10^{-2}

Tabla 2. Complementación de los mutantes de R388. Los plásmidos de la primera columna fueron introducidos en *Ec* D1210 y conjugados a *Ec* DH5 α . La frecuencia de conjugación es el ratio de transconjugantes por donador.

*En este ensayo se incrementó el número de bacterias para aumentar el rango de detección y así discriminar entre baja frecuencia de transferencia y nula.

§Los plásmidos pSU1423 y pSU4051 contienen la misma región de R388 que pFJS134 pero en diferentes replicones.

Nuestro primer acercamiento fue tratar de movilizar un derivado de R388 a través del T4SS de *Bt*. Dicho derivado (pSU1423) es un plásmido que contiene la región *Dtr* de R388 (*oriT*, *trwABC*). Este plásmido puede ser movilizado por otro que contenga la región desde *trwL* hasta *trwD* de R388 (pSU4058). Sin embargo, no hay movilización, al menos a niveles detectables, a través del T4SS Trw de *Bt*, expresado por el plásmido pAB2 (Tabla 2). De igual manera, no se obtuvieron transconjugantes cuando además del T4SS de *Bt*, contamos con la presencia de un plásmido adicional que llevaba uno de los dos operones (operón 1 u operón 2) de R388 (pHP109 o pHP111) (Tabla 2). Estos resultados indican que, a pesar del gran parecido entre ambos T4SS, uno no puede adoptar la función del otro. Hay que resaltar que según parecen indicar estudios recientes, el pilus del T4SS de *Bt* podría estar dirigido a establecer contacto con ciertas

proteínas de membrana eucariota (Llosa et al., 2009), lo que podría causar su falta de funcionalidad en conjugación entre bacterias.

Otro dato a tener en cuenta es que las dos regiones *Trw* de los sistemas de R388 y *Bt* son compatibles estando presentes en la misma bacteria, puesto que el plásmido pSU1423 puede ser movilizado por el pSU4058 con la misma eficiencia en presencia o en ausencia del plásmido pAB2 (Tabla 2).

Debido a estos resultados, que indican que no puede haber una sustitución en bloque del T4SS, decidimos hacer un estudio pormenorizado, viendo si existía la posibilidad de sustituir alguno de los genes en concreto.

Como ya se vio en la Tabla 1, los distintos mutantes derivados de R388 pierden la eficiencia conjugativa, a excepción del mutante en *trwH*, si bien su eficiencia decae más de 10.000 veces. Al añadir el T4SS de *Bt*, se observa que los mutantes en *trwD*, *trwE*, *trwF*, *trwG* y *trwH* muestran un incremento en la eficiencia de transferencia en presencia del plásmido pAB2, mientras que los mutantes de R388 en *trwI*, *trwJ*, *trwK* y *trwL* no pueden ser complementados por los genes de *Bt* (Tabla 2).

Para descartar la posibilidad de que los transconjugantes obtenidos sean fruto de una recombinación entre las dos regiones *trw* homólogas de ambos plásmidos, analizamos la sensibilidad a tetraciclina (resistencia presente en el pAB2) de los transconjugantes y además los usamos como donadores en una nueva serie de conjugaciones. Los resultados confirmaron que los transconjugantes son sensibles a tetraciclina y que son tra⁻ (deficientes en conjugación), descartando así la recombinación como posible explicación.

Por lo tanto, sólo los genes que pertenecen al operón 2 de la región *trw* de R388 pueden ser complementados por los genes de *Bt*. Los genes intercambiables son los que forman parte del llamado núcleo central o “core-complex”, más conservado entre distintos T4SS (más del 50% de homología), que podría jugar una función similar en ambos T4SS. Además, dicha conservación frecuentemente implica una necesidad de co-expresión para que los productos de los genes sean totalmente funcionales, lo que explicaría la agrupación de los genes en dos operones distintos. En cambio, los

componentes del pilus como TrwL y TrwJ podrían ser los responsables de interacciones específicas con la célula huésped o receptora, siendo por lo tanto proteínas más especializadas y menos conservadas (Llosa *et al.*, 2009). La única proteína que se encuentra en el primer operón y que sí presenta una gran homología entre ambos sistemas es TrwK, y sin embargo, no puede complementar una a la otra. La ausencia de complementación de *trwK* contrasta con estudios en *At*, en los cuales se ha demostrado complementación funcional entre VirB4 *At* y VirB4 *Bs*, proteínas que comparten un 52% de similitud (Yuan *et al.*, 2005). Los T4SS de ambas bacterias están estrechamente relacionados y presentan un alto grado de homología, pero menor del que existente entre los T4SS Trw de R388 y *Bartonella*. Además, una diferencia a tener en cuenta, es que en el caso de *At* y *Bs* ambos T4SS VirB secretan proteínas, teniendo pues, roles más similares que entre los T4SS de R388 y *Bt*.

1.4. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN ESTRUCTURAL

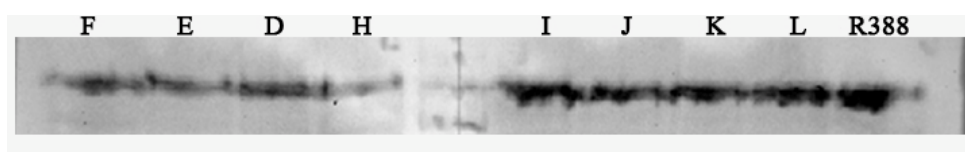
Al analizar las interacciones entre dos distintos T4SS, es interesante diferenciar las posibles interacciones funcionales de las estructurales. Esto es, una proteína de un sistema podría estar sustituyendo a su homóloga del otro sistema, permitiendo el ensamblaje del canal aunque éste no fuera funcional.

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

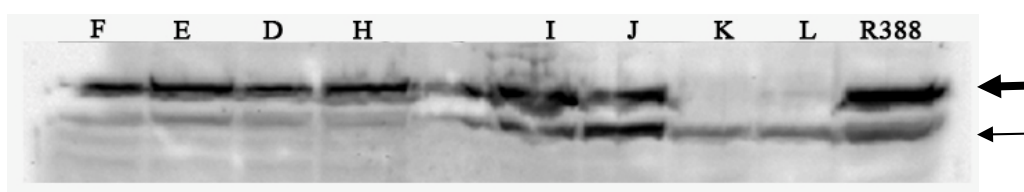
De esta manera, con los distintos mutantes del T4SS de R388 con los que contábamos y los anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio, realizamos una serie de Western blots para analizar el efecto de la ausencia de cada proteína en la estabilidad de otras, y la complementación estructural con otras homólogas del T4SS *trw* de *Bt*.

Los distintos mutantes de la región Trw de R388, sin y con la presencia de cósmido pAB2, fueron transformados en cepas de *Ec* DH5 α . Posteriormente fueron

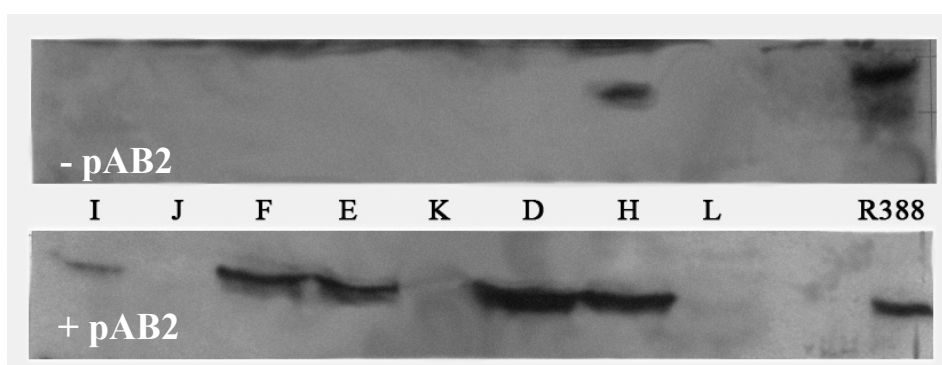
A) Anti TrwC



B) Anti TrwK



C) Anti TrwJ



D) Anti Trw D

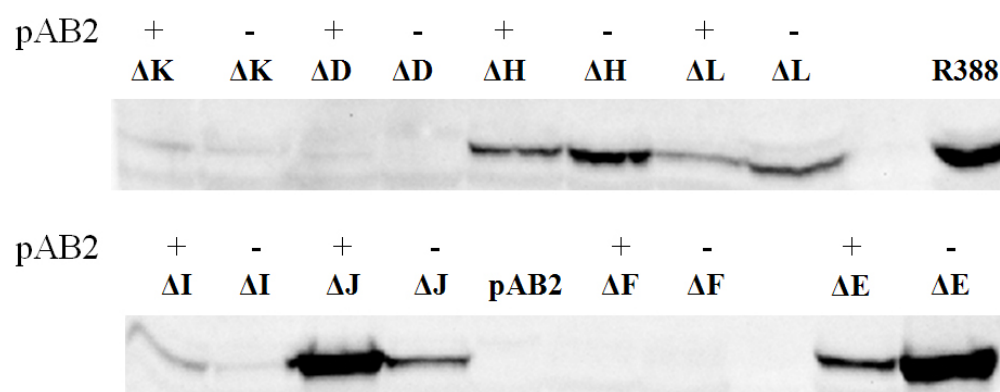


Figura 2. Western blots mostrando los niveles de distintas proteínas Trw en extractos celulares de *Ec* DH5 α . En cada calle se indican los mutantes de R388 que están representados por la letra de la proteína que no codifican (el prefijo Trw ha sido obviado para simplificar). **A.** Western blot con anti-TrwC. **B.** Western blot con anti-TrwK. La flecha grande indica TrwK mientras que la pequeña es una banda inespecífica. **C.** Western blot con anti-TrwJ. El Western blot inferior representa las mismas muestras en presencia del cósmido pAB2. **D.** Western blot con anti-TrwD. +/- Representa la presencia o ausencia, respectivamente, del cósmido pAB2.

obtenidos los extractos proteicos totales. Para cargar en los geles una cantidad similar de proteína se midió la concentración de proteína total de los extractos. Las muestras fueron analizadas en SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa y analizadas posteriormente mediante Western blot.

Aunque no se pudieron analizar con todos los anticuerpos deseados, teníamos una representación muy interesante de anticuerpos para proteínas que son expresadas en el primer y en el segundo operón, así como contra proteínas que se encuentran en la membrana interna y en la membrana externa. Los resultados los representamos en la Figura 2 y se recopilan en la Tabla 3 para facilitar su discusión.

Plásmidos	Trw T4SS	Transferencia	Anti C	Anti K	Anti J	Anti D
R388	R388	10^{-1}	+++	+++	+++	+++
pSU4130	R388 Δ L	$<10^{-7}$	+++	+	-	+
pSU4130+ pAB2	R388 Δ L+Bt	$<10^{-7}$	+++	+	-	+
pSU4133	R388 Δ K	$<10^{-7}$	+++	-	-	- *
pSU4133+ pAB2	R388 Δ K+Bt	$<10^{-7}$	+++	-	-	- *
pSU4136	R388 Δ J	$<10^{-7}$	+++	+++	-	++
pSU4136+ pAB2	R388 Δ J+Bt	$<10^{-7}$	+++	+++	-	++++
pSU4137	R388 Δ I	$<10^{-7}$	+++	+++	-	-
pSU4137+ pAB2	R388 Δ I+Bt	$<10^{-7}$	+++	+++	+	- *
pSU4131	R388 Δ H	10^{-5}	+++	+++	+	++
pSU4131+ pAB2	R388 Δ H+Bt	10^{-4}	+++	+++	+++	+
pSU4135	R388 Δ F	$<10^{-7}$	+++	+++	-	-
pSU4135+ pAB2	R388 Δ F+Bt	10^{-5}	+++	+++	++	- *
pSU4134	R388 Δ E	$<10^{-7}$	+++	+++	-	++++
pSU4134+ pAB2	R388 Δ E+Bt	10^{-5}	+++	+++	++	++
pSU4132	R388 Δ D	$<10^{-7}$	+++	+++	-	-
pSU4132+ pAB2	R388 Δ D +Bt	10^{-2}	+++	+++	+++	- *

Tabla 3. Resumen de los resultados de los Western blot. En la primera columna se indican los plásmidos presentes en la bacteria, indicando el derivado de R388 solo por la letra de su gen trw mutado con Δ . La segunda columna hace referencia a los T4SS presentes en la cepa. La tercera columna translada de manera resumida los resultados de conjugación de la Tabla 2. En las siguientes columnas se indican los resultados frente a los distintos anticuerpos analizados. +++ Valores wt de la cantidad de proteína. ++ Ligero descenso. + Marcado descenso. - No detectable. ++++ Aumento de la cantidad de proteína con respecto al wt. * Ligera interacción del anticuerpo anti TrwD (de R388) con TrwD de *Bt*.

TrwC es la relaxasa, proteína fundamental para la transferencia conjugativa, pero que no forma parte del complejo proteico que constituye el T4SS propiamente dicho. Por eso, la utilizamos como control negativo. Como se observa en la Figura 2A, los

niveles de TrwC son similares tanto en R388 como en cada uno de los mutantes, confirmando que la cantidad de dicha proteína no se ve afectada por la ausencia de un T4SS funcional. Además, este experimento nos sirve como control interno de la cantidad de proteína total de cada extracto.

Como puede verse en la figura 2B, los niveles de TrwK, una proteína citosólica que se encuentra unida a la membrana interna, no parecen verse afectados cuando falta cualquiera de las otras proteínas que forman el T4SS, salvo dos excepciones. Por un lado, no se detecta cuando falta la propia TrwK, lo que es lógico. Por otro, aunque se podría interpretar que la ausencia de TrwL está afectando a la cantidad de TrwK, tenemos que reseñar que se ha visto que dicho mutante es el único en presentar carácter polar, es decir, que la inserción del transposón en *trwL* afecta también en parte a la expresión de *trwK* (Bolland et al., 1990), por lo que no estaríamos viendo un efecto en su estabilidad sino en su expresión. En suma, estos datos indican que los niveles de TrwK no se ven afectados por la falta de un T4SS funcional. Esto podría sugerir que TrwK es uno de los primeros elementos en iniciar el ensamblaje del T4SS.

En contraste con esta situación, los niveles de TrwJ, el componente minoritario del pilus, se ven afectados por la falta de cualquiera de las proteínas que forman el T4SS (Figura 2C), a excepción de TrwH. Por tanto, TrwJ necesita un T4SS formado y estable para su propia integridad. En concordancia con nuestros datos, VirB5 (TrwJ) de *At* también se ve afectada por la ausencia de otras proteínas VirB (Hapfelmeier *et al.*, 2000; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999a).

Cuando complementamos esas mutaciones con el sistema *trw* de *Bt*, lo que observamos es que en los mutantes de los genes del operón 2 de R388 (y en parte también *trwI*), los más conservados, se restablecen los niveles de TrwJ. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los mutantes de los genes del primer operón. Es decir, existe una concordancia entre la complementación funcional, vista anteriormente en las conjugaciones, y la complementación estructural.

En la figura 2D está representada la cantidad de TrwD, proteína que se encuentra en el citosol anclada a la membrana interna. En este caso, TrwD se ve afectada de distinta forma por la ausencia de prácticamente todas las proteínas Trw. Los mutantes

en *trwK*, *trwI* y *trwF* provocan un descenso total de los niveles de TrwD; los mutantes en *trwL*, *trwJ* y *trwH* provocan un menor descenso en la cantidad de TrwD; mientras que el mutante *trwE*, por el contrario, aumenta la cantidad de TrwD. En conjunto, esto sugiere que la estabilidad de TrwD depende de la presencia de un T4SS funcional. Incluso podría aventurarse un orden de ensamblaje core complex \rightarrow pilus, ya que en ausencia del core, la cantidad de proteína está fuertemente afectada, mientras que en ausencia de los componentes del pilus la variación es más ligera.

La complementación heteróloga por pAB2 en la mayoría de los casos no parece reconstituir los niveles originales de TrwD. Es llamativo cómo en el caso de la complementación del mutante TrwJ, se alcanzan cantidades de TrwD por encima de lo normal. Por su parte, TrwI *Bt* parece ejercer cierta complementación estructural, aumentando ligeramente los niveles de TrwD. Por el contrario, las homólogas a TrwL, TrwH y TrwE de *Bt* afectan negativamente a la cantidad de TrwD. Este efecto dominante negativo podría deberse a que las proteínas de *Bt* fueran capaces de ensamblarse con algunas proteínas de R388 pero no con otras, teniendo así un efecto negativo en la estabilidad global del T4SS. Hay que recordar que TrwH, TrwI y TrwJ presentan 5 copias distintas en *Bt* (ver Fig. 25 de la Introducción, sección 3.4), lo que podría explicar el efecto ambiguo que tienen en TrwD.

Se han realizado trabajos similares en el T4SS de *At*, y los resultados coinciden sólo en parte con los nuestros. Un trabajo indica que la ausencia de VirB4 (TrwK) sólo afecta a la cantidad presente de VirB3 (TrwM) y VirB8 (TrwG), mientras que los niveles de las demás proteínas se mantienen iguales (Yuan et al., 2005), lo que no concuerda con nuestros datos, puesto que en nuestro mutante TrwK las proteínas TrwD y TrwJ no son detectables. Sin embargo, la ausencia de VirB4 sí que afecta a la localización de VirB5 (TrwJ). Aunque sus niveles no se ven alterados, VirB4 media indirectamente la interacción entre VirB2 (TrwL) y VirB5 y su posterior localización en el pilus. Por lo tanto, la falta de VirB4 no provoca unos niveles inferiores de VirB5 pero sí su localización periplásmica en lugar del pilus, mientras que en nuestro caso, la ausencia de TrwK afecta directamente a la cantidad de TrwJ. En este mismo trabajo se demostró además una complementación estructural de *At* VirB4 por parte de VirB4 de *Bs* (Yuan et al., 2005), mientras que en nuestro caso no se observa ningún tipo de complementación entre TrwK de R388 y *Bt*, a pesar del alto nivel de homología. Como

hemos dicho anteriormente, los de *At* y *Bs* son T4SS con roles parecidos, pudiendo haber una mayor conservación no sólo en las proteínas si no en la biogénesis y función del T4SS, lo que podría explicar esta diferencia.

Ensayos similares con VirB11 (TrwD) de *At* indican que la ausencia de esta proteína no influye en los niveles de VirB2, VirB4, VirB5 y VirB7, en concordancia con lo observado para TrwD. Sin embargo, tanto la ausencia de VirB11 como su actividad ATPasa parecen imprescindibles para la localización en el T-pilus de VirB2 y VirB5 (Sagulenko *et al.*, 2001). También se ha determinado que la ausencia de VirB6 (TrwI) no afecta a los niveles de VirB11 (TrwD), pero sí su sobreexpresión (Hapfelmeier *et al.*, 2000), mientras que en nuestro caso el mutante *trwI* provoca un total descenso de los niveles de TrwD.

Todas estas similitudes y diferencias ilustran probablemente que, aunque pueda existir un patrón general de ensamblaje de los T4SS, las interacciones específicas en cada sistema sean distintas.

1.5. T4SS HÍBRIDOS POR RECOMBINACIÓN

Hemos visto que parte de los componentes de los T4SS Trw de R388 y *Bartonella* son intercambiables; sin embargo, otra parte de ellos no lo son. Debido a que la coexpresión de ciertas proteínas es importante para conservar su equimolaridad (Hapfelmeier *et al.*, 2000), y que las proteínas en el T4SS se ensamblan en subcomplejos (Yuan *et al.*, 2005), quizá sustituir una serie de genes o regiones de éstos y no sólo un único gen, podría dar lugar a un T4SS híbrido entre R388 y *Bt* capaz de movilizar DNA.

Con este objetivo, planteamos realizar una serie de experimentos de recombinación entre el cósmido pAB2 y los distintos plásmidos derivados de R388 (pSU4130, pSU4133, pSU4136 y pSU4137), cuyas mutaciones no eran complementadas por los genes de *trw* de *Bt*. Por tanto, bacterias conteniendo pAB2 y uno de estos plásmidos no producen ningún transconjugante, lo que nos permitía seleccionar recombinantes funcionales por conjugación.

Para ello, utilizamos el sistema Red, que promueve la recombinación entre regiones con al menos 40 pb de homología (Metodología 5.5). Una vez inducida la recombinación de manera temporal, utilizamos esas bacterias como donadoras en conjugación, y seleccionamos transconjugantes para su posterior análisis.

Tras varios intentos y en distintas condiciones, aumentando los tiempos en los que el sistema *red* estaba inducido (Metodología 5.5), en ninguno de los casos obtuvimos transconjugantes para poder analizarlos, por lo que desistimos de continuar por esta vía de investigación. Es plausible que no sea viable obtener T4SS híbridos funcionales en conjugación de este modo.

CAPITULO 2

2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA PROTEÍNA ACOPLADORA DE R388

2.1. INTERACCIÓN DE TrwB CON EL T4SS

Como hemos mencionado anteriormente, trabajos previos han mostrado cómo una misma T4CP puede interaccionar con homólogos de TrwE (VirB10) de distintos T4SSc, y además, cómo la fuerza de dicha interacción es proporcional a la eficiencia del transporte de DNA a través de estos T4SSc (Llosa *et al.*, 2003). De Paz *et al.* (2005), extendieron el análisis de estas interacciones a sistemas patogénicos. Mediante el ensayo de dos híbridos bacteriano (Karimova *et al.*, 1998), se vio la existencia de interacciones proteína-proteína entre TrwB y distintos homólogos de TrwE, concretamente VirB10 de los T4SS Vir de *At* y *Bs*, y TrwE de *Bt*.

2.1.1. Complementación funcional entre homólogos de TrwE

Para ver si además de una interacción física existía homología funcional, realizamos ensayos de complementación con un mutante de R388, portando un transposón en *trwE* (pSU4134), y por lo tanto, deficiente también en su transferencia. El efecto no-polar de este mutante fue confirmado complementándolo con otro mutante de R388 (pSU4063) deficiente en TrwD, y viendo que se restauraban así los niveles normales de movilización (de Paz *et al.*, 2005).

Para las complementaciones utilizamos los plásmidos previamente construidos para ensayar las interacciones de TrwB con TrwE y sus homólogos en el ensayo de 2 híbridos bacteriano. Estos plásmidos producen proteínas de fusión entre TrwE o sus homólogos y los dominios de la Aci. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Plásmidos en donador	Descripción	Frecuencia de transferencia
pSU2007	R388	9×10^{-1}
pSU4134	R388 <i>trwE</i> ⁻	$< 1 \times 10^{-7}$
pSU4134 + pMTX631	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T18:: <i>trwE</i> R388	2.5×10^{-3}
pSU4134 + pMTX671	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T18:: <i>virB10 At</i>	$< 1 \times 10^{-7}$
pSU4134 + pMTX689	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T18:: <i>virB10 Bs</i>	$< 1 \times 10^{-7}$
pSU4134 + pMTX697	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T18:: <i>trwE Bt</i>	2.1×10^{-5}
pSU4134 + pMTX632	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T25:: <i>trwE</i> R388	2.7×10^{-4}
pSU4134 + pMTX673	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T25:: <i>virB10 At</i>	$< 1 \times 10^{-7}$
pSU4134 + pMTX688	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T25:: <i>virB10 Bs</i>	$< 1 \times 10^{-7}$
pSU4134 + pMTX698	R388 <i>trwE</i> ⁻ + T25:: <i>trwE Bt</i>	3.8×10^{-6}

Tabla 4. Complementación del plásmido pSU4134 con plásmidos que codifican distintas fusiones de homólogos de VirB10 a los dominios T18 o T25 de la Adenilato ciclasa.

El mutante de R388 que no produce TrwE se puede complementar en *trans* por los plásmidos que codifican las proteínas de fusión T18::*TrwE* R388 y T25::*TrwE* R388 (Tabla 4). Si bien, la eficiencia de conjugación cae más de 100 veces en comparación con el plásmido R388 salvaje. Además, los niveles de complementación varían unas 10 veces en función de en qué plásmido esté codificado la proteína (pUT18c y pT25), debido posiblemente al distinto número de copias que tienen dichos plásmidos, siendo el último el de menor número de copias. Ya habíamos visto que esta mutación puede ser complementada por el cósmido pAB2 que contiene toda la región *trw* de *Bt* (Tabla 2), aunque con una eficiencia 10^5 veces menor. Estas diferencias podrían deberse a que TrwE forma parte de un complejo multiproteico y necesita estar co-expresada con los otros componentes del sistema para tener una eficiencia óptima, como así suele ocurrir en complejos multiproteicos (Seubert et al., 2003).

En cuanto a las proteínas homólogas a TrwE, no se observó complementación heteróloga en el caso de *virB10 At* ni *virB10 Bs*, pero sí en el caso de *TrwE Bt*, el homólogo más cercano de *TrwE* R388, aunque la complementación cayó 100 veces con respecto a *TrwE*-R388 (Tabla 4). La homología de estas proteínas es de un 56% de identidad, siendo las regiones TM y adyacentes las más diferentes, mientras que la parte periplásmica presenta una mayor homología.

En todos los casos anteriores, fueron utilizados los plásmidos construidos para el ensayo de dos híbridos bacteriano, plásmidos que codifican proteínas de fusión. Por ello, para mejorar el estudio de complementación, construimos plásmidos que portaran los genes salvajes de *trwE* R388, *trwE Bt* y *virB10 Bs*, con las señales de expresión adecuadas y bajo el control del promotor lac del vector (plásmidos pHP102, pHP100 y pHP101 respectivamente; Tabla 3 y sección 3.1 de Metodología).

En la bibliografía está descrito cómo proteínas quiméricas pueden sustituir a proteínas nativas en otros T4SS. Uno de los ejemplos más recientes es el caso de VirB8 de *Bs*, donde una proteína quimérica que presenta la región TM de VirB8 y la región periplásmica de TraJ (homóloga de VirB8 en pSB102) es capaz de restituir parcialmente la virulencia de una cepa atenuada de *Bs* por la ausencia de VirB8. En este caso, también la región TM es la menos conservada, con un 39% de identidad frente al 65% de la región periplásmica (Patey *et al.*, 2006). Este antecedente, y el hecho de que la región TM y adyacentes sean las que probablemente estén involucradas en la interacción TrwB-TrwE (Llosa *et al.*, 2003), nos animó a construir dos plásmidos que codifican una proteína TrwE quimérica. Por un lado, el plásmido pHP116 codifica una proteína TrwE con la región transmembrana de *Bt* (los primeros 131 residuos) y la región periplásmica de R388, y por el otro, el plásmido pHP117, que codifica una proteína con la región transmembrana de R388 (los primeros 131 residuos) y la periplásmica de *Bt* (Tabla 3 y sección 3.1 de Metodología).

Con todas estas construcciones, realizamos nuevos ensayos de complementación, en presencia y en ausencia de IPTG 0,5mM para controlar la expresión de dichos genes. Los resultados (Tabla 5) muestran que los niveles de complementación por parte de TrwE de R388 y *Bt* son muy similares a las anteriores, si bien, también se observó un ligero grado de complementación por parte de VirB10 *Bs*. Además, las frecuencias obtenidas en todos los casos no variaron significativamente en presencia de IPTG. Cabe reseñar por tanto, que las proteínas de fusión con las que realizamos los ensayos iniciales se mostraron igual de funcionales que proteínas salvajes. Hay que hacer notar que los dominios T18 y T25 están fusionados al extremo N-terminal, donde quizás no interfieran con el ensamblaje y funcionalidad de la proteína fusionada.

Plásmidos	Fenotipo	Frecuencia de transferencia	
		-IPTG	+IPTG
pSU4134	R388 <i>trwE</i> ⁻	<1 x 10 ⁻⁷	<1 x 10 ⁻⁷
“ + pHP102	R388 <i>trwE</i> ⁻ + <i>trwE</i> R388	2·2 x 10 ⁻³	8·1 x 10 ⁻³
“ + pHP101	R388 <i>trwE</i> ⁻ + <i>virB10</i> <i>Bs</i>	1·4 x 10 ⁻⁷	3·3 x 10 ⁻⁷
“ + pHP100	R388 <i>trwE</i> ⁻ + <i>trwE</i> <i>Bt</i>	1·2 x 10 ⁻⁵	3·2 x 10 ⁻⁵
“ + pHP116	R388 <i>trwE</i> ⁻ + <i>trwE</i> <i>Bt</i> :R388	6·8 x 10 ⁻⁵	ND
“ + pHP117	R388 <i>trwE</i> ⁻ + <i>trwE</i> R388: <i>Bt</i>	6·9 x 10 ⁻⁶	ND

Tabla 5. Complementación del plásmido pSU4134 por parte de distintos plásmidos que codifican distintos de homólogos de VirB10, así como dos proteínas quiméricas de TrwE. La cuarta columna representa los valores de las frecuencias conjugativas en condiciones de IPTG mientras que la tercera representa los valores sin inducción por IPTG.

Las complementaciones de los genes quiméricos presentan unas frecuencias conjugativas menores a las de *trwE* R388 y parecidas a las de *trwE* *Bt*. Siendo el caso de *trwE* R388:*Bt* 10 veces menor que el de *trwE* *Bt*:R388. Si consideramos la región transmembrana de TrwE como la importante en la interacción con TrwB, el hecho de que la proteína quimérica TrwE *Bt*:R388 lleve la región TM de *Bt* podría explicar que la frecuencia de conjugación se pareciera más a la de TrwE *Bt* wt que a la de TrwE de R388 wt. En el otro caso, el hecho de que la región periplásmica, la más conservada, y que probablemente interacciona con varias proteínas del T4SS, sea la de *Bt* podría explicar que en este caso la frecuencia sea menor.

Teniendo en cuenta estos datos, la interacción mostrada por el ensayo de dos híbridos bacteriano entre TrwB y TrwE *Bt*, y que ésta puede sustituir parcialmente a TrwE R388 en su propio sistema, podemos hablar de una similitud funcional entre las proteínas TrwE de R388 y *Bt*. La posibilidad de intercambiar ciertos componentes entre distintos T4SS con roles distintos, ilustra la versatilidad de los T4SS, que pudieron distribuirse a distintas especies por transferencia horizontal, y una vez adquiridos ser adaptados con distintos propósitos.

2.1.2. Mutagénesis en *trwB* y *trwE* *Bt*

Visto que hay una complementación funcional entre las proteínas TrwE de R388 y *Bt*, y una interacción entre la T4CP y los homólogos de *virB10*, nos planteamos hacer

una mutagénesis de *trwB* para mapear la interacción TrwB-TrwE *Bt* y conseguir mutantes con una interacción más fuerte.

Mediante ensayo de dos híbridos se ha descrito la existencia de una interacción fuerte entre TrwB y TrwE de R388, mientras que la existente entre TrwB R388 y TrwE *Bt* es mucho más débil (Figura 3). Por lo tanto, si nosotros mutamos cualquiera de estas proteínas buscando interacciones más fuertes entre TrwB R388 y TrwE *Bt*, deberíamos buscar colonias que presenten un azul más intenso que el original existente entre TrwB R388 y TrwE *Bt*. Así, la manera de seleccionar las interacciones *in vivo*, mediante el ensayo de dos híbridos, es tan sencilla como buscar colonias azul intenso, lo que implica una mayor interacción entre las proteínas estudiadas. Por ello, este método nos permite realizar un gran screening, visualizando al mismo tiempo un gran número de distintas mutaciones.



Figura 3. Ejemplos de ensayos de dos híbridos. Se muestra la intensidad de color (proporcional a la fuerza de interacción) entre TrwB y TrwE R388 (2), y entre TrwB y TrwE *Bt* (3), además del correspondiente control negativo, los vectores pT25 y pUT18c (1).

Como ya se ha descrito en la introducción, tanto TrwB como TrwE son proteínas que se encuentran ancladas a la membrana interna por regiones transmembrana pero se localizan en el citoplasma y el periplasma respectivamente (Figura 4). TrwB es una proteína principalmente citoplasmática, con dos dominios transmembrana tras una pequeña región Nt también citoplasmática. Por otro lado, TrwE consta de una pequeña región citoplasmática (Nt), una región transmembrana y un gran dominio periplásmico. Por lo tanto, debido a su posición en la membrana y que al eliminar los segmentos Nt desaparece la interacción entre ambas (Llosa et al., 2003), es lógico pensar que la interacción entre estas dos proteínas tenga lugar preferentemente en sus regiones transmembrana o adyacentes a ellas. Por ello, decidimos mutar las

primeras 400 pb de cada gen (Figura 4), que engloba la región TM, por la existencia de un sitio de restricción favorable para nuestro propósito.

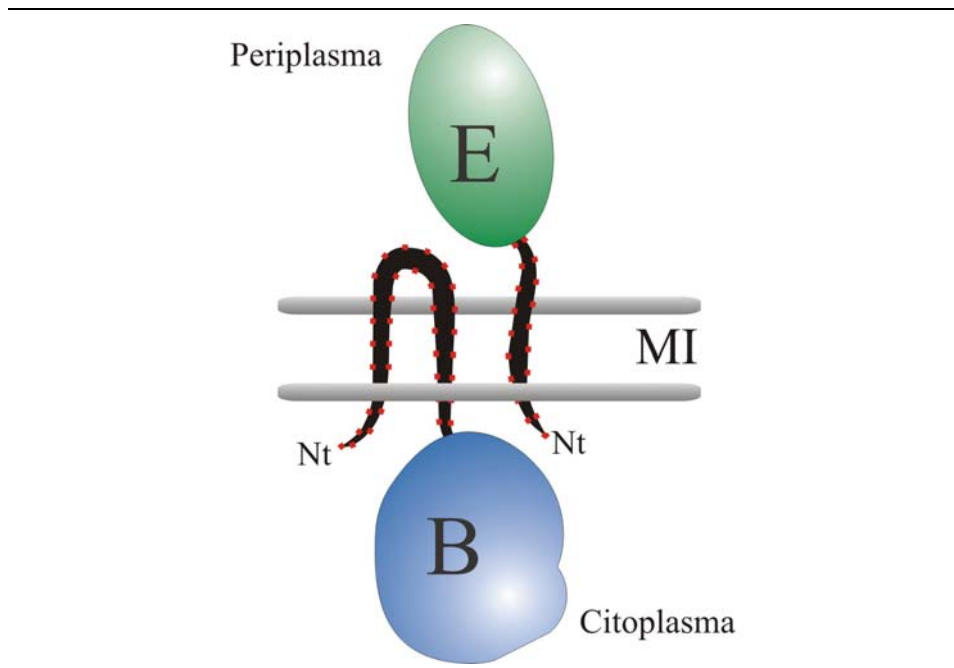


Figura 4. Representación de la posición en la membrana interna de las proteínas TrwB y TrwE. Los segmentos negros con puntos rojos representan respectivamente los primeros 133 y 132 residuos mutagenizados. *Nt*: *N terminal*. *MI*: *membrana interna*.

Para realizar mutaciones al azar tanto de *trwB* R388 como de *trwE Bt*, utilizamos el GeneMorphTM II PCR mutagénesis Kit (Stratagene) que consta de una polimerasa mutagénica que introduce errores de manera aleatoria. El número de errores por kb depende de la cantidad de DNA molde de la que conste cada reacción de amplificación. Utilizamos la cantidad de DNA molde necesaria para obtener productos amplificados con 1-2 errores de media cada 400 pb.

Tras la amplificación por PCR, procesamos el producto con enzimas de restricción adecuadas para clonar las 400 primeras pb de cada gen en los plásmidos que fueron utilizados anteriormente para estudiar la interacción TrwB-TrwE *Bt* (Figura 5). Así, obtenemos plásmidos idénticos, pero con mutaciones en su región Nt, pudiendo analizar el efecto de estas mutaciones en la interacción entre proteínas según el color de las colonias. En el caso de *trwB* se clonan los primeros 401 pb con cortes BamHI + KpnI, y en *trwE Bt* los primeros 393 pb con cortes BamHI + NdeI.

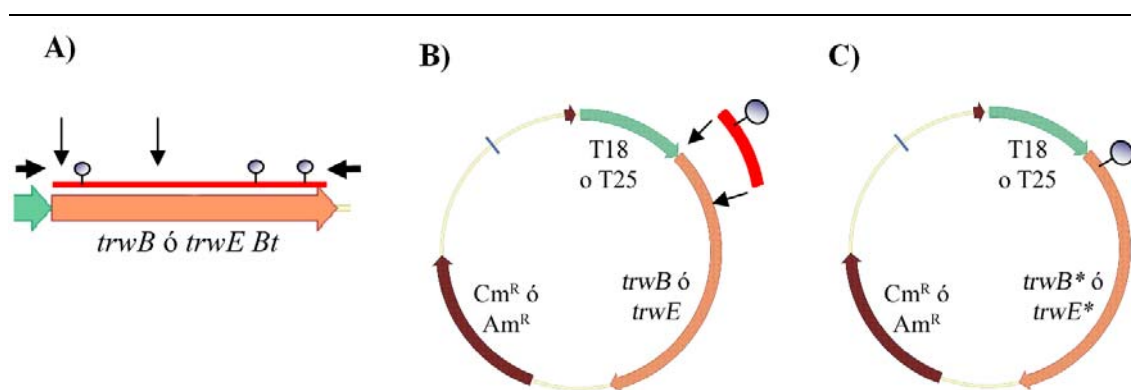


Figura 5. Esquema de la PCR mutagénica. **A.** Amplificación del gen con los oligonucleótidos determinados, flechas negras gruesas, y la polimerasa mutagénica. Posteriormente el resultado de la PCR, el inserto, y el vector se digieren con enzimas de restricción adecuadas (flechas verticales). **B.** Ligación de vector e inserto **C.** Plásmido utilizado en el ensayo de dos híbridos donde el gen de estudio presenta mutaciones.

Se electroporó la ligación conteniendo un *pool* de clones, cada uno con una serie de mutaciones distintas al azar, en una cepa DHM1 que porta el plásmido complementario para el ensayo. Así, bacterias DHM1 con pMTX698 (T25::*trwE Bt*) fueron electroporadas con los mutantes de *trwB* contenidos en pMTX601 (fusión T18::*trwB*) y bacterias DHM1 con pMTX514 (T25::*trwB*) fueron electroporadas con los mutantes de *trwE Bt* contenidos en pMTX697 (T18::*trwE Bt*). Posteriormente, sembrada la electroporación en placas suplementadas con X-Gal 60µg/ml, analizamos las colonias buscando aquellas que presentaran un azul más intenso, pues son los mutantes que interaccionan más fuertemente (Figura 6).

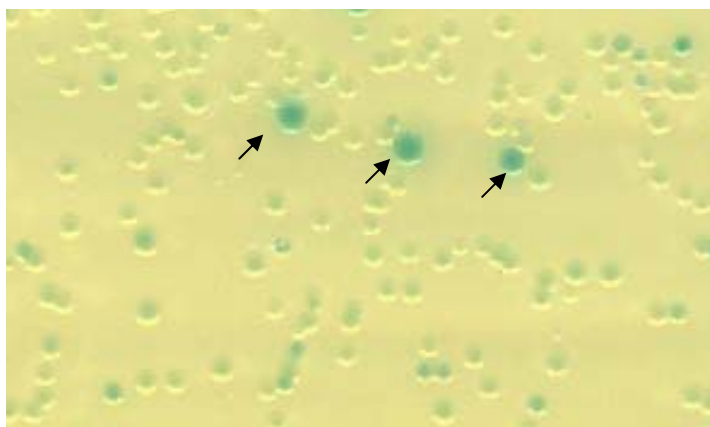


Figura 6. Resultado del screening *in vivo* tras la PCR mutagénica. Las flechas negras indican las colonias que contienen los mutantes que presentan una mayor interacción.

De esta manera se analizaron unas 2000 colonias para mutantes de TrwB R388 y 4000 para mutantes de TrwE *Bt*, encontramos 7 colonias azul oscuro y 18 blancas, y 7 colonias azul oscuro y 20 blancas, respectivamente.

Como las pérdidas de interacción pueden deberse a varias causas, como por ejemplo, la aparición de codones de parada a lo largo del gen, dichos mutantes (colonias blancas) no fueron caracterizados. Se analizaron solo los mutantes que presentaban una mayor interacción, determinando la secuencia de DNA del inserto amplificado por PCR mutagénica y caracterizando el lugar donde se habían producido las mutaciones seleccionadas. El resultado se resume en la Figura 7.

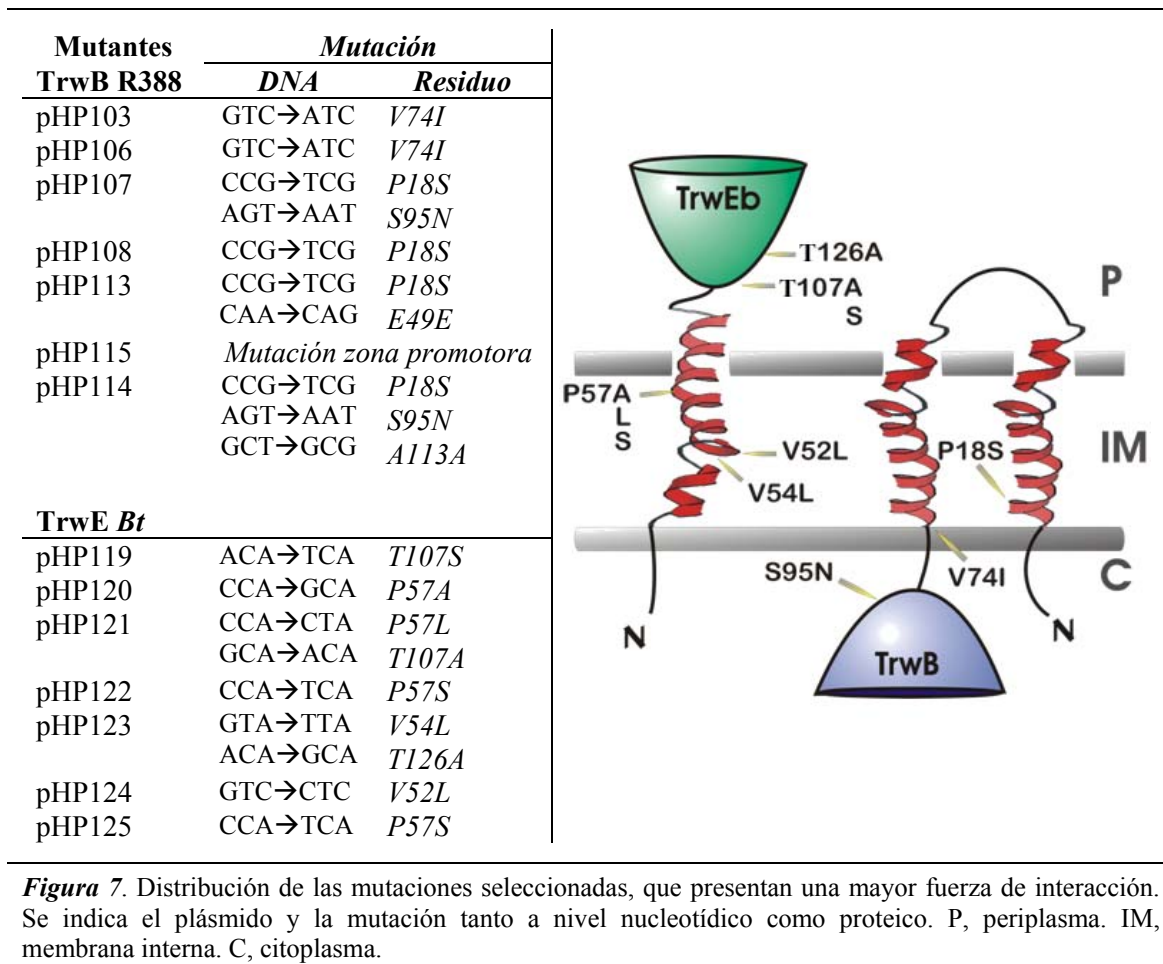


Figura 7. Distribución de las mutaciones seleccionadas, que presentan una mayor fuerza de interacción. Se indica el plásmido y la mutación tanto a nivel nucleotídico como proteico. P, periplasma. IM, membrana interna. C, citoplasma.

Como puede observarse, la mayoría de los mutantes que presentaban una mayor fuerza de interacción se localizan en las zonas transmembranales y adyacentes predichas, excepto T107S y T126A en TrwE *Bt*. Esto confirma que esta región es importante en la interacción TrwB-TrwE. Además, cabe destacar la reiterada mutación de algunos residuos concretos, en ocasiones por aminoácidos distintos. Uno de los residuos

mutados más repetitivamente es el residuo P18 de TrwB, que cambia a S en varios mutantes independientes, y P57 de TrwE *Bt* que cambia a diferentes residuos. Probablemente, esto se deba a que los residuos Prolina desestabilizan las α -hélices provocando cambios de dirección (Lee *et al.*, 2006), con lo que estas mutaciones podría provocar un cambio mejorando los contactos entre las regiones TM de TrwB y TrwE. La Figura 8 muestra un modelo del cambio estructural que se observa en el primer segmento de la región TM de TrwB al cambiar el residuo P18 a S.

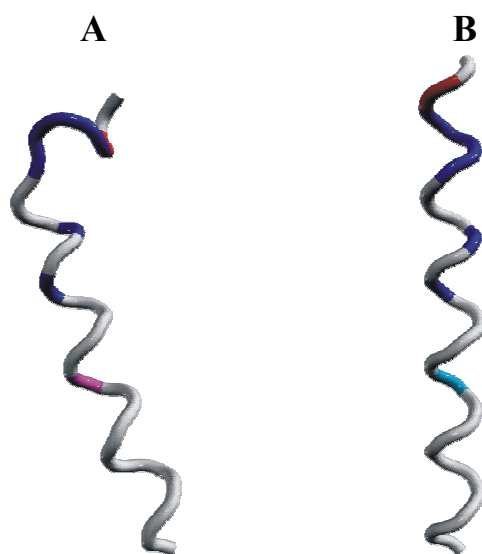


Figura 8. Modelaje teórico de la estructura del primer dominio transmembrana de TrwB. En rojo se representa el residuo prolina 18 y su mutación a serina. **A.** Estructura del mutante P18S. **B.** Estructura de TrwB wt. El modelo se ha realizado con el programa PyMOL.

Una vez obtenidos mutantes que presentan una mayor interacción entre TrwB y TrwE *Bt*, comprobamos su funcionalidad mediante ensayos de complementación. Para estudiar la funcionalidad de los mutantes de TrwB, complementamos el plásmido pSU1443 (R388 sin *trwB*) con dichos mutantes. Los mutantes de TrwE *Bt* los ensayamos con el plásmido pSU4134 (R388 sin *trwE*). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Según se observa en la Tabla 6, los distintos mutantes de *trwB* muestran un nivel de complementación similar al salvaje, indicándonos que las mutaciones no alteran la funcionalidad de la proteína en el sistema de R388. Como las interacciones mejoradas y seleccionadas fueron entre TrwB R388 y TrwE *Bt*, no esperamos que las mutaciones en

trwB mejoren la complementación con respecto a *trwB* salvaje, sino ver que los mutantes mantienen su funcionalidad. Lo mismo sucede básicamente con los mutantes de *trwE Bt*. Todos presentan una misma eficiencia a la hora de complementar la ausencia de TrwE en R388, siendo similar en todo caso a la eficiencia de complementación por parte de *trwE Bt*. Tan sólo el doble mutante TrwE *Bt* P57L T107A presenta una eficiencia 10 veces menor, aunque las mutaciones en P57 o T107 por separado mantienen la funcionalidad de la proteína.

Plásmidos en el donador	Mutación	Frecuencia conjugativa
pSU1443	R388 TrwB⁻	$< 10^{-8}$
pSU1443 + pMTX601	<i>TrwB wt</i>	4.8×10^{-3}
pSU1443 + pHP106	<i>TrwB V74I</i>	4.9×10^{-3}
pSU1443 + pHP107	<i>TrwB P18S S95N</i>	3.4×10^{-3}
pSU1443 + pHP108	<i>TrwB P18S</i>	3.8×10^{-3}
pSU1443 + pHP113	<i>TrwB P18S</i>	5.1×10^{-3}
pSU1443 + pHP114	<i>TrwB P18S S95N</i>	3.8×10^{-3}
pSU4134	R388 TrwE⁻	$< 10^{-8}$
pSU4134 + pMTX631	<i>TrwE R388</i>	1.9×10^{-3}
pSU4134 + pMTX697	<i>TrwE Bt</i>	1.3×10^{-6}
pSU4134 + pHP119	<i>TrwE Bt T107S</i>	1.5×10^{-6}
pSU4134 + pHP120	<i>TrwE Bt P57A</i>	2.0×10^{-6}
pSU4134 + pHP121	<i>TrwE Bt P57L T107A</i>	2.4×10^{-7}
pSU4134 + pHP122	<i>TrwE Bt P57S</i>	1.6×10^{-6}
pSU4134 + pHP123	<i>TrwE Bt V54L T126A</i>	1.0×10^{-6}
pSU4134 + pHP124	<i>TrwE Bt V52L</i>	1.8×10^{-6}
pSU4134 + pHP125	<i>TrwE Bt P57S</i>	2.9×10^{-6}

Tabla 6. Complementación de los plásmidos pSU1443 (R388 TrwB⁻) y pSU4134 (R388 TrwE⁻) por parte de los distintos mutantes obtenidos. Los plásmidos de la primera columna fueron transformados a *Ec* DH5 α y conjugados a *Ec* D1210.

Podría esperarse obtener una mayor eficiencia de conjugación al utilizar los mutantes de TrwE *Bt* que interaccionan más fuertemente con la T4CP TrwB. Sin embargo, hay que señalar que TrwE no sólo interacciona con la T4CP sino con otras proteínas del T4SS, que en este ensayo son las homólogas de R388. El hecho de que los mutantes de *trwE Bt* no presenten una mayor eficiencia de complementación de TrwE

R388 con respecto al salvaje, no cierra las puertas a que exista una interacción más productiva entre estos mutantes y la T4CP cuando TrwE *Bt* se encuentre en su propio sistema, el de *Bartonella*, por lo que abrimos la puerta a otra serie de ensayos en *Bartonella* recogidos en el capítulo siguiente.

Volvimos a transformar todos los mutantes en cepas DHM1 con distintos plásmidos complementarios para confirmar y comparar su efecto en la interacción TrwB-TrwE *Bt*. Como control positivo se utilizan dos plásmido (pT25zip y pUT18czip) que codifican las dos mitades de la Aci fusionadas a una cremallera de leucinas. Como control negativo se usan los vectores pT25 y pUT18c.

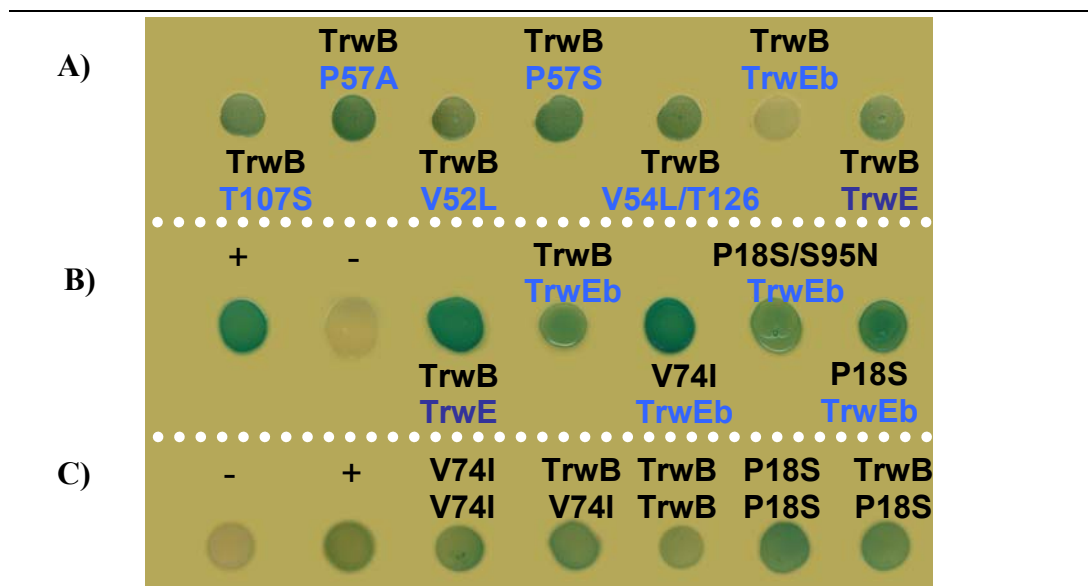


Figura 9. Ensayo de dos híbridos bacterianos en placa. Los distintos mutantes representados fueron transformados en *Ec* DHM1, crecidos en medio líquido y posteriormente una gota de medio se plaqueó en LB X-gal con los antibióticos correspondientes. **A.** Interacciones entre TrwB wt (negro) con distintos mutantes de TrwE *Bt* (azul claro) y TrwE R388 wt (azul oscuro). **B.** Interacciones entre distintos mutantes de TrwB (negro) con TrwE *Bt* wt (azul claro) y TrwE R388 wt (azul oscuro). **C.** Interacciones entre distintos mutantes de TrwB consigo mismo y con TrwB wt. También se muestran los controles positivo y negativo.

En la Figura 9A se aprecia la distinta fuerza de interacción entre TrwB y TrwE salvaje de R388 y TrwE *Bt*, que presenta un azul mucho más claro. Los distintos mutantes de TrwE *Bt* presentan distintos grados de interacción con TrwB, pero siempre mayor a la interacción de TrwE *Bt* wt. Tres de ellos (T107S, V52L y V54L T126A), tienen una interacción muy parecida a la que hay entre TrwB y TrwE de R388, mientras que los mutantes P57S y P57A parecen tener una fuerza de interacción incluso mayor. Estos datos apuntan a que esta región de TrwE es importante en la interacción con

TrwB, y más concretamente el residuo P57. También se hicieron estos ensayos con las proteínas quiméricas TrwE *Bt*::R388 y TrwE R388::*Bt*, pero no presentaron una mayor fuerza de interacción con respecto a TrwE *Bt*, siendo incluso menor en el caso de la proteína que contiene la región TM de *Bt* y la periplásmica de R388 (Datos no mostrados).

En la Figura 9B representamos la interacción entre TrwB wt y sus mutantes con TrwE *Bt*, así como los controles positivos y negativos internos del ensayo. Como puede verse de nuevo, la interacción entre TrwB y TrwE R388 (azul oscuro) es mayor que la existente entre TrwB y TrwE *Bt* (azul claro). Lo más significativo es un aumento de interacción de los mutantes P18S y más aún V74I. Estos mutantes igualan e incluso superan (V74I) la interacción normal existente entre TrwB y TrwE de R388. En cuanto al doble mutante P18S S95N, se observa una pérdida de la fuerza de la interacción con respecto al mutante sencillo P18S. De nuevo, estos datos corroboran que la región transmembrana de TrwB es importante en la interacción con TrwE. Sin embargo, aunque la mutación del residuo P18 es la que se obtiene de manera más repetida, en este caso, la mutación V74I parece tener un mayor efecto en dicha interacción.

Por último, analizamos cómo podían afectar los mutantes de TrwB a su oligomerización, es decir, interacciones TrwB-TrwB. Tal como muestra la Figura 9C, los mutantes de TrwB que presentaban una mayor interacción con TrwE *Bt* también muestran un aumento en la interacción con los propios monómeros de TrwB, tanto TrwB wt como mutante con mutante. Esta diferencia se detecta más claramente en el mutante P18S. Por lo tanto, parece que la región transmembrana es la región clave en la interacción entre TrwB y TrwE, y también está implicada en la interacción entre los distintos monómeros de TrwB, ratificando estudios previos (Gilmour *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 2003).

Para obtener valores cuantitativos de la fuerza de interacción, hicimos ensayos β -galactosidasa. Los resultados se muestran a continuación de manera resumida, puesto que nuestra conclusión general fue que estos ensayos no añadían precisión al resultado obtenido por visualización del color en placas suplementadas con X-gal. Para facilitar la interpretación de los valores obtenidos los hemos compilado, siendo el resultado de la media de al menos 3 experimentos independientes.

En la Figura 10 se representa los datos de la interacción de los distintos mutantes de TrwB con TrwE *Bt* (azul) y TrwE R388 (granate). Del mismo modo que se observaba en placa, la mutación V74I tiene unos valores muchos más altos de interacción con TrwE *Bt* que la proteína salvaje y que el resto de las mutaciones (Figura 10). Sin embargo, mediante este método las diferencias entre los otros mutantes y TrwB wt no es significativa. Esto puede deberse a que se trate de una interacción transitoria, que se puede detectar al transformar en las placas pero no al crecer luego las bacterias para el ensayo β -galactosidasa. Por eso, lo comprobamos repetidamente, transformando de nuevo la cepa con los plásmidos, y de nuevo en placa se obtenían colonias azul oscuro, pero al crecerlas para los ensayos β -galactosidasa de nuevo no hubo diferencias significativas con TrwE *Bt* wt.

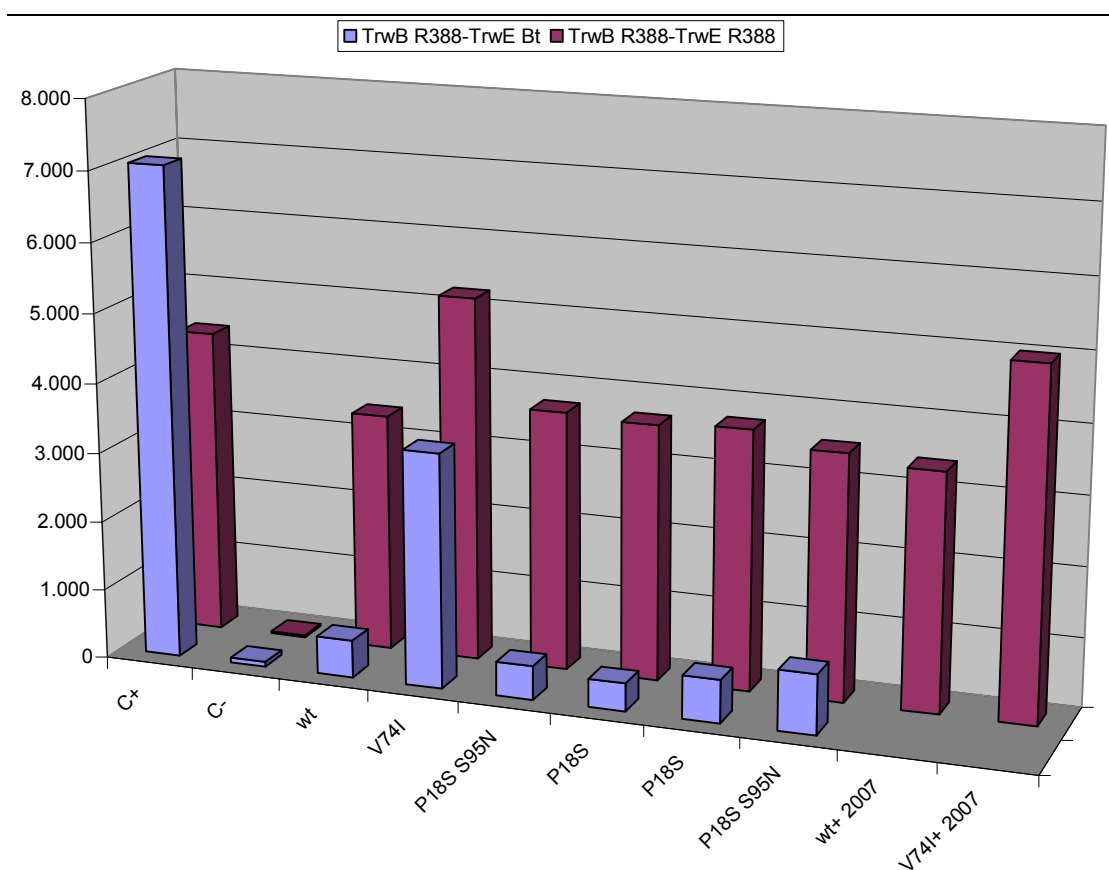


Figura 10. Representación gráfica del resultado de los ensayos β -galactosidasa de las interacciones entre distintos mutantes de TrwB fusionados a T18, representados en el eje de abscisas, con TrwE *Bt* (azul) y TrwE R388 (granate) fusionadas a T25. Las unidades representadas en el eje de coordenadas son unidades Miller.

Con respecto a la interacción entre TrwB y TrwE R388, la mayoría de los mutantes presentan unos valores similares a los de TrwB wt, con la excepción de TrwB V74I que interacciona más fuertemente.

Para comprobar si la presencia de todos los componentes del T4SS de R388 podía afectar de alguna manera al comportamiento de estos ensayos, comparamos los resultados de la interacción entre los mutantes de TrwB y TrwE R388 también en presencia del plásmido pSU2007 que codifica todo el sistema conjugativo de R388, y no se observó ninguna diferencia (Figura 10).

La Figura 11 representa los resultados de analizar la interacción entre los mutantes de TrwE *Bt* con TrwB.

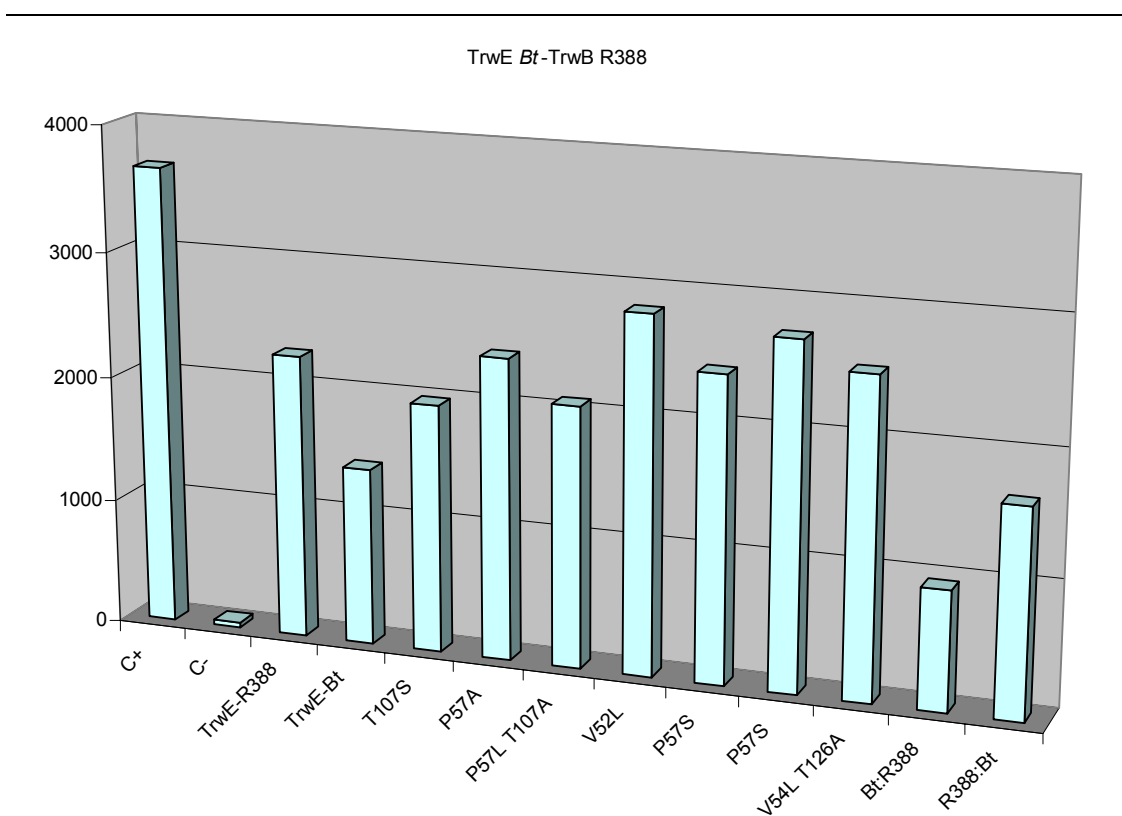


Figura 11. Representación gráfica del resultado de los ensayos β -galactosidasa de las interacciones entre distintos mutantes de T18:TrwE *Bt*, representados en el eje de abscisas, con T25:TrwB. Las unidades representadas en el eje de coordenadas son unidades Miller.

A pesar de la variabilidad encontrada en este ensayo, se confirma que la mayoría de los mutantes de TrwE *Bt* se acercan más al nivel de interacción con TrwB de TrwE R388 que de TrwE *Bt*, tal y como se observa en placa. Las diferencias observadas con la

figura anterior pueden deberse a que los genes que codifican estas proteínas se encuentran en los plásmidos opuestos y complementarios del sistema de dos híbridos. Los dos plásmidos utilizados en este ensayo tienen diferente número de copias, lo que afecta a la proporción de proteína.

También ensayamos los mutantes de TrwB con los mutantes de TrwE *Bt*, para ver si la combinación de varias mutaciones que parecen tener una interacción fuerte podía provocar una interacción mayor. Ni en placa ni en ensayos β -galactosidasa se observaron diferencias significativas (datos no mostrados). Por lo tanto, no parece que la utilización conjunta de mutantes de TrwB y mutantes de TrwE pueda favorecer más la interacción entre ambas proteínas.

Un reciente estudio en el sistema VirB de *At* (Jakubowski *et al.*, 2009) siembra la duda sobre la importancia de la región TM en el contacto entre la T4CP y VirB10, ya que no encuentran mutantes en esta región de VirB10 que afecten a la interacción con VirD4. Es posible que la interacción entre las T4CP y los T4SS no tenga reglas universales; considerando la variedad de sustratos de los distintos T4SS y el papel de la T4CP en su reclutamiento, puede que la conexión entre el sustrato, la T4CP y el propio T4SS difiera en cada sistema más que otras interacciones entre los elementos que constituye el núcleo central del T4SS.

Se ha propuesto que VirB10 (homólogo de TrwE en *At*) es un sensor energético que pone en contacto estructuras de la membrana externa con estructuras de la membrana interna; como respuesta a la hidrólisis de ATP por parte de las ATPasas del sistema, sufriría cambios conformacionales que regularían el paso del sustrato a través de las dos membranas de la bacteria (Chandran *et al.*, 2009; Jakubowski *et al.*, 2009; Llosa *et al.*, 2009). Con los datos que se tienen hasta el momento, se podría especular con la posibilidad de que las regiones transmembrana de TrwB y TrwE estuvieran entrelazadas, formando un canal a través de la membrana interna que prolongaría el canal interno de TrwB con el del T4SS formado por los elementos del “core-complex”. De este modo, TrwE podría transmitir a través del T4SS la señal de activación producida por la actividad ATPasa de TrwB; ésta, a su vez, puede ser inducida por el contacto con el relaxosoma, ya que tanto la presencia de DNA como de TrwA son fuertes inductores de la actividad ATPasa de TrwB *in vitro* (Tato *et al.*, 2005, 2007)..

2.1.3. Movilización de los mutantes de TrwB a través del T4SS Trw de *Bartonella*

Anteriormente se trató de movilizar un plásmido que contiene la región *Dtr* de R388 a través del T4SS de *Bt* en ensayos de conjugación (Resultados sección 1.3, Tabla 2). Para probar si una interacción más fuerte entre la T4CP y TrwE *Bt* puede favorecer la conjugación de dicho plásmido a través del T4SS de *Bartonella*, realizamos una serie de ensayos similares donde el plásmido movilizable contiene los mutantes V74I y P18S de TrwB que presentan una mayor interacción con TrwE *Bt*.

Para realizar los ensayos, necesitábamos introducir los mutantes de *trwB* en un plásmido con *Dtr* de R388. Primero se generó un plásmido con los sitios de restricción adecuados (pHP128) y posteriormente se clonaron en él tanto las mutaciones (pHP130 y pHP131) como la región wt (pHP129) tal y como se especifica en Metodología (Tabla 3 y sección 3.1). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Comprobamos que el plásmido pHP129 por sí solo no puede transferirse, pero si lo acompañamos con otro que codifica el T4SS de R388 (pSU4058), es movilizado eficientemente a través de este sistema, con la misma eficiencia que los dos plásmidos similares que codifican los mutantes de TrwB. De igual modo, aunque con menor frecuencia, podemos movilizar los tres plásmidos a través del T4SS de pKM101 (expresado en el plásmido pKM101 Δ *mob*), obteniendo la misma frecuencia para TrwB wt y mutantes. Esto indica que las mutaciones de TrwB no sólo no afectan a la funcionalidad de la proteína en el sistema conjugativo de R388, sino que tampoco afectan su funcionalidad utilizando el T4SS de pKM101.

Al ensayar los tres plásmidos con el cósmido pAB2, que porta el T4SS de *Bt*, como puede observarse, ninguno es transferido; ni siquiera aportando el operón 1 de R388, operón que contiene los genes *trw* que no pueden ser complementados por los de *Bt*.

Aunque no mostramos los datos, hemos de señalar que a pesar de que en la mayoría de los experimentos en los que tratábamos de movilizar los plásmidos a través

del T4SS *Bt* no obteníamos ningún transconjugante, en contadas ocasiones sí que obtuvimos algunas colonias. Comprobamos que eran transconjugantes reales (analizados por antibiograma y extracción de DNA). Esto podría indicar que haya un nivel muy bajo de movilización que roza el límite de detección de nuestros ensayos. Sin embargo, no pudimos obtener este resultado de manera repetitiva.

Plásmidos en el donador	Mutación en <i>TrwB</i>	<i>Bt</i> T4SS	pKM101 T4SS	R388 T4SS	Frecuencia de conjugación
pHP129	wt	-	-	-	$< 1 \times 10^{-9}$
pHP129 + pSU4058	wt	-	-	+	5×10^0
pHP130 + pSU4058	V74I	-	-	+	5×10^0
pHP131 + pSU4058	P18S	-	-	+	4×10^0
pHP129 + pKM101 Δ <i>mob</i>	wt	-	+	-	2×10^{-4}
pHP130 + pKM101 Δ <i>mob</i>	V74I	-	+	-	1×10^{-4}
pHP131 + pKM101 Δ <i>mob</i>	P18S	-	+	-	4×10^{-4}
pHP129 + pAB2	wt	+	-	-	$< 1 \times 10^{-9}$
pHP130 + pAB2	V74I	+	-	-	$< 1 \times 10^{-9}$
pHP131 + pAB2	P18S	+	-	-	$< 1 \times 10^{-9}$
pHP129 + pAB2 + pHP111	wt	+	-	+ *	$< 1 \times 10^{-9}$
pHP130 + pAB2 + pHP111	V74I	+	-	+ *	$< 1 \times 10^{-9}$
pHP131 + pAB2 + pHP111	P18S	+	-	+ *	$< 1 \times 10^{-9}$

Tabla 7. Transferencia de plásmidos movilizables a través de los T4SS de *Bt*, R388 y pKM101. En la primera columna se representan los plásmidos que están presentes en la cepa donadora *Ec* DH5 α y que son conjugados a la cepa receptora *Ec* D1210. La segunda columna representa la proteína *TrwB* (salvaje o mutante) presente en el plásmido movilizable. La tercera, cuarta y quinta columna indican el tipo de T4SS presente en la bacteria donadora. La frecuencia de conjugación se expresa en transconjugantes/donadoras.

* En este caso sólo está presente el operón 1 de R388

Como estrategia alternativa, pensamos que podríamos obtener mutantes de *TrwB* que permitiesen la movilización de DNA a través del T4SS de *Bt* mediante PCR mutagénica y screening in vivo por conjugación. Se mutagenizó la región Nt de *TrwB* de igual manera que en la sección anterior. La diferencia fue la forma de realizar el *screening*. Una vez obtenidos plásmidos derivados de pHP129, pero codificantes de distintos mutantes de *trwB*, los transformamos a bacterias *Ec* que contenían el cósmido pAB2. Así, obtendríamos infinidad de colonias portadoras de pAB2 y de un plásmido movilizable con distintos mutantes de *TrwB*. Llegado a este punto, recogimos de la placa las colonias con ambos plásmidos con un hisopo, y tras lavarlas, las usamos como

células donadoras en conjugación. Nuestro objetivo era obtener transconjugantes, analizarlos, y poder encontrar algún mutante movilizable por este sistema, con la posibilidad de hacer mutagénesis sucesivas sobre ese mismo mutante tratando de mejorar la eficiencia. Sin embargo, tras varios intentos, no se obtuvo ningún transconjugante.

De todos modos, el hecho de no poder movilizar el DNA a través del T4SS de *Bt* expresado en *Ec*, no quiere decir que la movilización a través del T4SS de *Bt* no sea posible en la propia *Bt*, estrategia abordada en el Capítulo 3.

2.2. INTERACCIÓN DE TrwB CON EL SUSTRATO

Hasta ahora hemos centrado nuestra atención en la interacción entre TrwB y TrwE, es decir, la interacción entre la proteína acopladora y el T4SS. Pero otro papel crucial de las T4CP lo forma la selección del sustrato, y en el caso de la conjugación, presumiblemente también el bombeo de la molécula de DNA hacia el exterior de la bacteria donadora. Por ello, hemos realizado un análisis y caracterización *in vivo* de una serie de mutantes de TrwB tratando de vislumbrar regiones importantes para la interacción con el sustrato proteico o el DNA.

Como hemos señalado anteriormente, TrwB es una proteína que se encuentra en el citoplasma anclada a la membrana interna por dos regiones transmembrana. Puesto que la interacción con el sustrato ocurrirá presumiblemente en el citosol, se ha utilizado el derivado de TrwB sin sus primeros 70 aa (sin su región transmembrana). Esta proteína, TrwB Δ N70, no es funcional en conjugación, pero mantiene su actividad *in vitro* de unión a DNA (Moncalian *et al.*, 1999) e hidrólisis de ATP (Tato *et al.*, 2005).

2.2.1. Colección de mutantes

La Figura 12 (A,B) representa la estructura hexamérica de TrwB Δ N70 vista lateralmente y basalmente desde el citoplasma, respectivamente. La determinación de la

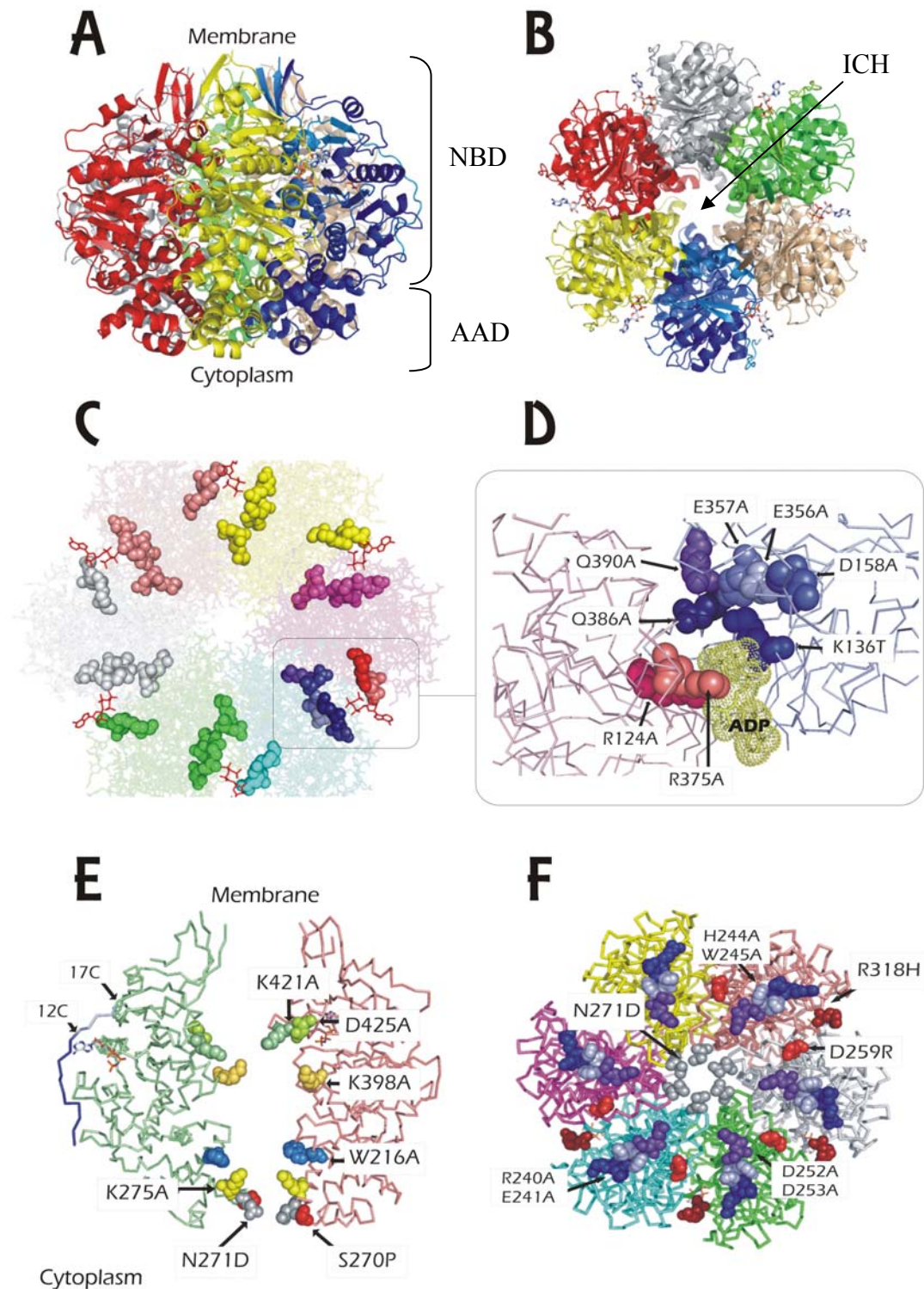


Figura 12. Representación 3D de la estructura de TrwB Δ N70 unida a ADP (número de acceso pdb 1GKI), donde los residuos mutados son resaltados con esferas. **A.** Vista lateral del hexámero TrwB Δ N70. La región nombrada como NBD es la de unión al nucleótido; la región denominada AAD es el dominio todo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

estructura tridimensional de TrwB Δ N70 (Gomis-Ruth *et al.*, 2001) permitió diseñar una serie de mutantes puntuales en distintas regiones de la proteína construidos por mutagénesis dirigida, mutagénesis al azar, o por delección de varios residuos. La construcción de estos mutantes se detalla en el manuscrito adjunto (de Paz *et al.*, 2010). La localización de las mutaciones se representa en la Figura 12 (C-F).

- **Mutantes de la región de unión a nucleótidos (NBD)**

Se seleccionaron los residuos en contacto directo con el nucleótido (Figura 12C, D), presumiblemente esenciales para la unión a nucleótidos y su hidrólisis, es decir, para la actividad ATPasa de TrwB. En la figura 12C se muestra la posición del ATP/ADP entre dos monómeros de TrwB. Los residuos K136, D158, D356, E357, Q386 y Q390 de un monómero se combinan con los residuos R124 y R375 del otro monómero para interactuar con el nucleótido (Figura 12D).

El mutante K136T fue previamente caracterizado (Moncalian *et al.*, 1999; Tato *et al.*, 2005), comprobándose que es un mutante tra-, con dominancia negativa y sin actividad ATPasa.

- **Mutantes del canal interno (ICH)**

De acuerdo con el modelo “shoot and pump” de conjugación (Llosa *et al.*, 2002), la cara expuesta del canal interno es la región candidata que interactuaría con el DNA. Los residuos Lys expuestos, por su carga positiva, podrían tener un papel fundamental en la interacción con el esqueleto del DNA, cargado negativamente. Por lo tanto, se mutaron a Ala los residuos K275, K398 y K421. El residuo N271 puede cerrar la entrada al ICH, por lo que también se mutó a Asp. Además, el mutante W216A ya había sido previamente caracterizado (Figura 12E) (Tato *et al.*, 2005).

- **Mutantes en el dominio AAD**

Por su disposición en la superficie citoplasmática, este podría ser el dominio que interactúa directamente con el sustrato. Se buscaron y mutaron residuos polares, expuestos y conservados en distintas T4CPs (Figura 12F).

- **Deleciones del extremo C-terminal**

Ambas deleciones $\Delta 17C$ y $\Delta 12C$ fueron construidas por formar una estructura que protege la región a la cual se une las moléculas de NTPs, como puede observarse en la figura 12E.

- **Mutantes al azar**

Por mutagénesis al azar y selección de mutantes Tra^- , también se obtuvieron los mutantes S270P y R318H. S270 está cercana a la entrada del ICH (Figura 12E), y R318 se encuentra en la superficie entre monómeros (Figura 12F).

Todos estos mutantes fueron construidos en el plásmido pSU4633 (Metodología, Tabla 2), que contiene el fragmento de R388 $P_{trwA-trwAB}$. Todos los mutantes fueron comprobados por Western Blot, y todos expresaban cantidades similares de proteína, salvo los mutantes $\Delta 17C$ y $\Delta 12C$, que mostraban 1/5 y 1/2 de cantidad de proteína respecto al wt, respectivamente (de Paz *et al.*, 2010)

2.2.2. Efecto de los mutantes en la conjugación

Para comprobar el efecto *in vivo* que podían tener los mutantes construidos, se hicieron una serie de ensayos de complementación. El plásmido pSU1443 (R388 con un transposón en *trwB*) pierde toda su capacidad conjugativa. Sin embargo, al expresarse TrwB en otro plásmido, la recupera. Así, complementando dicho plásmido con todos los mutantes de TrwB , se estudia el efecto de las mutaciones en la conjugación.

Como se observa en la Tabla 8, la mayoría de los mutantes, sobre todo los que se encuentran en la región NBD, anulan completamente a la funcionalidad de TrwB (K136T, D158A, D356A, E357A, R375A y Q386A). Esta región parece la más sensible a las mutaciones, pues no sólo la mayoría de los residuos que están en contacto directo con el NTP son fundamentales para la actividad de TrwB , sino también el entorno donde se encuentra; así, las deleciones del Ct disminuyen mucho la capacidad conjugativa de TrwB ($\Delta 17C$ y $\Delta 12C$). Esta región Ct de la proteína se encuentra protegiendo “el bolsillo” donde se encuentra el nucleótido y por lo tanto, aunque no intervenga directamente en la hidrólisis del mismo, podría ser importante para su estabilidad.

También son Tra⁻ los mutantes obtenidos al azar S270P, que se encuentra a la entrada del ICH y por tanto podría afectar a la entrada del DNA en el ICH o a la interacción con el sustrato, y el mutante R318H, que se encuentra entre los monómeros de TrwB, pudiendo estar afectando a su oligomerización.

Mutantes de TrwB	Plásmido	Compl. pSU1443	
		Frec.	%
Wild-type	pSU4622	2x10 ⁻³	100
<i>NBD</i>			
R124A	pMTX558	4x10 ⁻⁵	2
K136T	pSU4632	<10 ⁻⁷	<0,01
D158A	pMTX520	<10 ⁻⁷	<0,01
D356A	pMTX521	<10 ⁻⁷	<0,01
E357A	pMTX559	<10 ⁻⁷	<0,01
R375A	pMTX530	<10 ⁻⁷	<0,01
Q386A	pMTX524	<10 ⁻⁷	<0,01
Q390A	pMTX525	1x10 ⁻³	61
<i>AAD</i>			
R240A E241A	pMTX527	4x10 ⁻³	200
H244A W245A	pMTX528	3x10 ⁻³	150
D252A D253A	pMTX533	3x10 ⁻³	150
D252R D253R D259R	pMTX546	<10 ⁻⁷	<0,01
<i>ICH</i>			
W216A	pMTX611	<10 ⁻⁷	<0,01
N271D	pMTX549	8x10 ⁻⁴	40
K275A	pMTX550	1x10 ⁻⁴	45
K398A	pMTX553	3x10 ⁻³	150
K275A K398A	pMTX582	9x10 ⁻³	450
K421A D425A*	pMTX552	4x10 ⁻⁴	20
<i>Delección Ct</i>			
Δ17C	pMTX554	2x10 ⁻⁷	0,01
Δ12C	pMTX560	5x10 ⁻⁶	0,25
<i>Mutantes al azar</i>			
S270P	pMTX590	<10 ⁻⁷	<0,01
R318H	pMTX593	<10 ⁻⁷	<0,01

Tabla 8. Frecuencias conjugativas de los mutantes de TrwB. La primera columna representa los residuos de TrwB contenidos en los plásmidos de la segunda columna, utilizados para complementar el plásmido pSU1443. Los plásmidos de la segunda columna fueron cotransformados con pSU1443 en *Ec* DH5α, utilizando como cepa receptora *Ec* D1210. Se indica la frecuencia conjugativa (transconjugantes/donadores) y el porcentaje de esta frecuencia con respecto a la salvaje. Los datos de mutantes Tra⁻ resaltan en gris.

*oligonucleótido erróneo que provocó la mutación adicional D425A

En cuanto a las mutaciones en el AAD, sólo la triple mutación anula la funcionalidad de TrwB, sugiriendo que la carga podría ser un factor importante en la interacción con el sustrato.

En el canal interno, la mutación previamente descrita W216A es la única que afecta fuertemente a la actividad de TrwB.

2.2.3. Diseño de condiciones limitantes para ensayar TrwB

La cantidad de TrwB producida por R388 puede detectarse por Western blot (Figura 13, calle 2). La comparación con cantidades conocidas de TrwB Δ N70 purificada permite estimar que hay miles de hexámeros de TrwB por célula. Un estudio similar en el sistema de RP4 ha determinado que tan sólo hay unas 5 moléculas por célula de la T4CP TraG (Grahm *et al.*, 2000). Esto sugiere que en R388 se esté produciendo T4CP en exceso. Por este motivo, mutaciones con efectos leves podrían no ser detectadas. Por ello, nos planteamos crear un sistema donde la cantidad de TrwB fuera limitante, de tal manera que esas diferencias leves fueran detectables.

Para el diseño de las condiciones limitantes utilizamos dos variables:

- a) El control de la expresión de *trwB*. Para regular su expresión y conseguir unas condiciones limitantes realizamos una serie de construcciones. *trwB* y sus mutantes fueron clonados bajo el control del promotor lactosa, de tal manera que la expresión de *trwB* sea regulable por IPTG. Así, como puede verse en la Figura 13, en el plásmido pHP139 la expresión de *trwB* se regula en función del IPTG. Por el contrario, cuando el promotor que regula *trwB* es el P_{*trwA*}, la cantidad de la proteína no se ve apenas afectada por la presencia o ausencia de IPTG. Por lo tanto, tenemos un sistema donde podemos controlar la expresión de *trwB* y ver así el efecto que tiene la cantidad de TrwB en la conjugación.

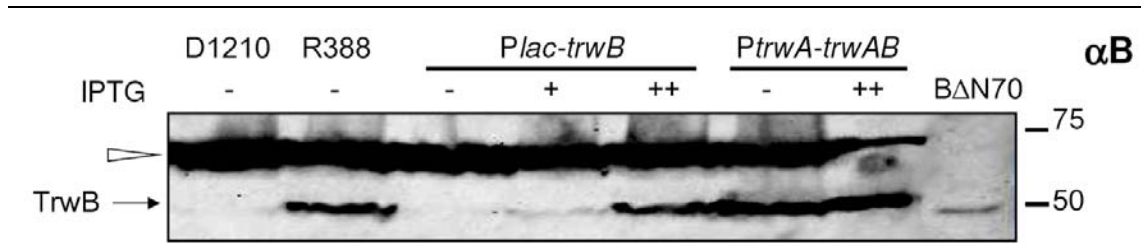


Figura 13. Western blot con anti-TrwB, para ver la expresión de *trwB* en distintas condiciones. TrwB está indicada por la flecha negra, mientras que el triángulo blanco señala una banda inespecífica. Arriba se muestra las condiciones de IPTG: - (sin IPTG), + (1 h de IPTG) y ++ (3 horas de IPTG). A la derecha, marcador de pesos moleculares en kDa.

- b) La maquinaria conjugativa del plásmido pKM101. El T4SS de este plásmido está altamente relacionado con el plásmido R388, hasta el punto de ser funcionalmente intercambiables, aunque la interacción entre TrwB y la proteína homóloga de TrwE en este sistema sea más débil (Llosa et al., 2003).

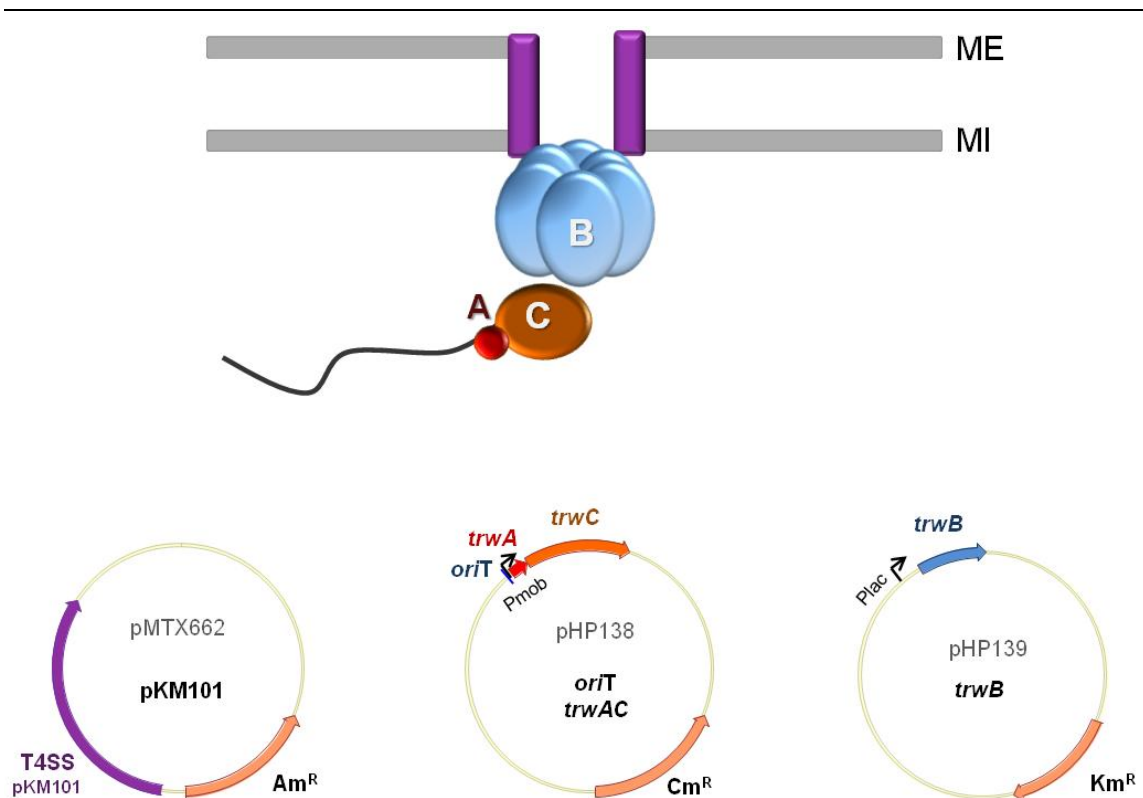


Figura 14. Esquema representativo del sistema limitante. Uno de los plásmidos codifica el T4SS de pKM101 (morado). Otro de ellos es el plásmido movilizable, que además codifica las proteínas TrwA (roja) y TrwC (naranja). Y por último, el tercer plásmido codifica TrwB (azul) bajo el control de un promotor Lac.

El plásmido pKM101 Δ mob codifica todo el T4SS de pKM101, y pHP139 codifica *trwB*. Se construyó el plásmido pHP138, que contiene el *oriT* de R388 y codifica los componentes del relaxosoma TrwA y TrwC. Los tres plásmidos son compatibles y pueden estar presentes en la misma bacteria, constituyendo una maquinaria conjugativa mixta entre los sistemas de pKM101 y de R388, donde la expresión de *trwB* puede ser controlada (Figura 14).

Para comprobar la funcionalidad de este sistema y el efecto tanto del control de la expresión de *trwB* como del T4SS que moviliza el plásmido, realizamos varias conjugaciones con los distintos elementos.

Plásmidos en el donador	T4SS	Promotor <i>trwB</i>	Frecuencia de Transferencia		
			Inducción por IPTG		
			0h	1h	3h
pKM101 Δ mob + pHP138 + pSU4622	pKM101	P _{trwA}	3 x 10 ⁻²	7 x 10 ⁻²	2 x 10 ⁻¹
pKM101 Δ mob + pHP138 + pHP139	pKM101	Plac	5 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻¹
pSU1443 + pSU4622	R388	P _{trwA}	3 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	3 x 10 ⁻³
pSU1443 + pHP139	R388	Plac	7 x 10 ⁻³	6 x 10 ⁻³	4 x 10 ⁻⁴

Tabla 9. Frecuencias de conjugación (transconjugantes/donador) a distintos tiempos de inducción por IPTG en distintos sistemas. Los plásmidos de la primera columna fueron transformados en *Ec* D1210 y conjugados a *Ec* DH5 α .

Los resultados (Tabla 9) muestran cómo la frecuencia de movilización del plásmido que contiene el *oriT* a través del T4SS de pKM101 depende de los niveles de inducción del promotor *lac*, y por lo tanto, de la cantidad de TrwB. Como controles utilizamos el plásmido pSU4622, que contiene *trwB* bajo el control de su propio promotor, *P_{trwA}*. Éste codifica la cantidad suficiente de proteína para movilizar completamente el plásmido que contiene el *oriT* (Figura 13). Otro control muestra que cuando se usa el T4SS de R388, hay niveles altos de transferencia incluso en la ausencia de inducción del promotor *lac*. Además, en este caso, tras varias horas de sobreexpresión de *trwB*, la cantidad de TrwB llega a ser deletérea, observándose cómo la frecuencia cae unas 10 veces. En suma, la conjunción de una expresión controlada de *trwB* y el uso de un T4SS heterólogo permiten tener un sistema de ensayo donde la cantidad de TrwB es limitante, adecuado para analizar los mutantes de TrwB.

Por último, puntualizar que el hecho de que las frecuencias conjugativas obtenidas cuando utilizamos el T4SS de pKM101 sean mayores que al utilizar el T4SS de R388, puede ser debido al alto número de copia en el caso del plásmido movilizable pHP138 (derivado del replicón pMB1) en comparación con el plásmido derivado de R388 pSU1443.

Los mutantes analizados que en el ensayo estándar de conjugación mostraban un fenotipo similar al salvaje, fueron clonados en pHP139 para ser ensayados en el sistema estándar (pSU1443) y en el limitante (pKM101 Δ mob + pHP138).

Además, decidimos clonar una representación de los mutantes transmembrana que fueron creados para mejorar la interacción entre TrwB y TrwE en este sistema porque de igual modo podíamos tener unos resultados, en estas condiciones, distintos a los obtenidos hasta entonces.

Los resultados se muestran en la Tabla 10. Al complementar el plásmido pSU1443 con pHP139 y sus derivados, los resultados no difieren de los obtenidos en las complementaciones en las que se coexpresaba TrwA y TrwB (Tabla 6). En algunos casos, la sobreexpresión de TrwB en este sistema parece alcanzar un cierto grado de toxicidad, disminuyendo levemente las frecuencias conjugativas.

Al ensayarlos en el sistema limitante, parte de los mutantes resultaron tener frecuencias conjugativas menores que el salvaje. En el caso del mutante analizado de la región de unión a nucleótidos (Q390A), su capacidad conjugativa está total o prácticamente abolida. En cuanto a los mutantes de la región AAD R240A E241A, H244A W245A y D252A D253A la diferencia con respecto al salvaje oscila de 10 a 100 veces, así como los del canal interno N271D, K275, K421A D425A y el mutante P18S S95N de la región transmembrana. Los mutantes K275A K398A y V74I no se ven afectados; una diferencia menor a 10 veces no la consideramos significativa, ya que puede deberse a la variación propia del ensayo. Llamativamente, el mutante K398A presenta una frecuencia 10 veces superior al salvaje. Las mutaciones K275A y K398A parecen tener efectos contrapuestos, que quedan compensados en el mutante doble.

Mutantes de TrwB	Plásmido	pSU1443		pKM101 Δ mob + pHP138		
		-	++	-	+	++
Wild-type	pHP139	2x10 ⁻³	2x10 ⁻³	5x10 ⁻⁶	3x10 ⁻³	1x10 ⁻¹
NBD						
Q390A	pHP140	1x10 ⁻³	6x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁷	4x10 ⁻⁷
AAD						
R240A E241A	pHP141	4x10 ⁻³	6x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻²
H244A W245A	pHP142	3x10 ⁻³	7x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁸	7x10 ⁻⁵	2x10 ⁻²
D252A D253A	pHP143	3x10 ⁻³	1x10 ⁻³	6x10 ⁻⁷	4x10 ⁻⁴	5x10 ⁻²
Canal interno						
N271D	pHP145	8x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻¹
K275A	pHP146	5x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁷	8x10 ⁻⁵	1x10 ⁻³
K398A	pHP171	3x10 ⁻³	2x10 ⁻³	1x10⁻⁵	2x10⁻²	2x10⁻¹
K275A K398A	pHP148	3x10 ⁻³	7x10 ⁻⁴	7x10 ⁻⁷	1x10 ⁻³	2x10 ⁻¹
K421A D425A	pHP169	4x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³	<10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁵	3x10 ⁻³
Región transmembrana						
V74I	pHP149	4 x10 ⁻³	4 x10 ⁻³	2x10 ⁻⁷	1x10 ⁻³	6x10 ⁻²
P18S S95N	pHP150	5 x10 ⁻³	4 x10 ⁻³	<10 ⁻⁷	5x10 ⁻⁴	4x10 ⁻²

Tabla 10. Frecuencias de conjugación (transconjugantes/donador) en los sistema estándar y limitante, a distintos tiempos de inducción por IPTG. En ambos sistemas la ausencia de TrwB es complementada por los distintos mutantes de TrwB representados en la primera columna y contenidos en el plásmido indicado en la segunda columna. La conjugación se realiza desde *Ec* D1210 a *Ec* DH5 α . Las condiciones de IPTG son: - (sin inducción), + (1h de inducción) y ++ (3h de inducción). Para mejor visualización se utiliza el código de colores: **azul** (valores similares al salvaje), **negro** (frecuencia entre 10 y 100 veces menor que el wt) y **rojo** (más de 100 veces menor). En **negrita** mostramos resultados con una mayor frecuencia que el wt.

Remarcar que la cantidad de moléculas de TrwB presentes es proporcional a la frecuencia de la conjugación, excepto en el mutante Q390A que apenas es funcional, ni siquiera al ser sobreexpresado, a pesar de haber mostrado fenotipo normal en el ensayo anterior. Por lo tanto, la utilización del sistema limitante nos ha permitido determinar que muchos de los mutantes construidos en la región AAD y el ICH sí afectan a la funcionalidad de TrwB en la conjugación, resaltando la importancia de estas regiones.

2.2.4. Efecto de los mutantes en interacciones proteína-proteína

Hemos ensayado el efecto de dominancia negativa de los mutantes de TrwB sobre R388. La dominancia negativa, típica en proteínas que forman multímeros, sugiere que la proteína mutante es capaz de ensamblarse en el multímero, pero éste no es funcional, afectando así a la funcionalidad de los monómeros de la proteína salvaje. Estudios

previos (Tato *et al.*, 2005) ya habían reportado una moderada y severa dominancia negativa mostrada respectivamente por los mutantes K136T y W216A (2- y 5-log de caída en la eficiencia de transferencia al co-expresarse con el plásmido salvaje). Todos los mutantes de TrwB se ensayaron expresándose desde su promotor con TrwA y en presencia de pSU2007 (R388 Km^R). Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Mutantes de TrwB	Plásmido	Dominancia negativa	
		Frec.	%
Wild-type	pSU4622	7×10^{-2}	100
<i>NBD</i>			
R124A	pMTX558	2×10^{-2}	30
K136T	pSU4632	3×10^{-4}	0,44
D158A	pMTX520	1×10^{-4}	0,18
D356A	pMTX521	6×10^{-5}	0,09
E357A	pMTX559	1×10^{-4}	0,20
R375A	pMTX530	8×10^{-5}	0,10
Q386A	pMTX524	1×10^{-6}	0,002
Q390A	pMTX525	7×10^{-3}	11
<i>AAD</i>			
R240A E241A	pMTX527	2×10^{-2}	32
H244A W245A	pMTX528	9×10^{-3}	13
D252A D253A	pMTX533	1×10^{-2}	19
D252R D253R D259R	pMTX546	6×10^{-3}	9
<i>Canal interno</i>			
W216A	pMTX611	2×10^{-7}	0,0003
N271D	pMTX549	2×10^{-2}	28
K275A	pMTX550	9×10^{-4}	1,3
K398A	pMTX553	1×10^{-2}	19
K421A D425A	pMTX552	9×10^{-3}	13
<i>Delección Ct</i>			
Δ 17C	pMTX554	1×10^{-2}	18
Δ 12C	pMTX560	1×10^{-2}	20
<i>Mutantes al azar</i>			
S270P	pMTX590	2×10^{-4}	0,30
R318H	pMTX593	1×10^{-4}	0,10

Tabla 11. Dominancia negativa ejercida por los mutantes de TrwB en la frecuencia conjugativa de pSU2007. Las cepas donadoras portan el plásmido pSU2007 (derivado de R388 Km^R) y el pSU4622 o derivados que portan las mutaciones apuntadas en *trwB*.

Todos los mutantes de la región NBD Tra⁻ muestran un fenotipo dominante negativo. El mayor efecto observado (5 log) se aprecia en el mutante Q386A. Mutantes con una marcada dominancia negativa (2-3 log) son K136T (demostrado en trabajos anteriores), D158A, D356, E357 y R375A. Esto sugiere que los mutantes en estos residuos forman multímeros no funcionales, probablemente por la necesidad de la acción concertada de distintos monómeros para la actividad ATPasa. Las mutaciones R124A y Q390A, que afectan en menor medida a la conjugación, apenas muestran dominancia negativa.

Además, otros mutantes muestran un moderado efecto negativo de alrededor de 2 logs, como los mutantes Tra⁻ obtenidos al azar, R318H (en la región de interacción entre monómeros), S270P (en la superficie citoplasmática, cercano a la entrada del ICH), y una de las lisinas que protruden hacia el canal interno, K275A. Efectos menores a 1 log no han sido considerados significativos debido a la variabilidad intrínseca del ensayo.

Otro método para estudiar las interacciones proteína-proteína en multímeros es el de dos híbridos. Estudios previos usando este sistema mostraron la fuerte interacción existente entre los monómeros de TrwB, mientras que una delección en los primeros 75 residuos de TrwB (región transmembrana) afecta severamente esta interacción (Llosa et al., 2003). Transferimos pues, varias mutaciones de *trwB* a plásmidos que producen fusiones de TrwB y ambos dominios de la Aci y los usamos para, mediante ensayos de dos híbridos, ensayar el efecto de las mutaciones en la interacción TrwB-TrwB. Los resultados se muestran en la Figura 15A.

Los mutantes K136T y D158A de la región NBD y la delección C terminal Δ 12C afectan fuertemente esta interacción, así como la probada TrwB Δ N75 (Llosa et al., 2003). El resto de mutantes probados por este sistema no se muestran afectados significativamente.

Los mutante K136T, D158 y Δ 12C que afectan la interacción entre monómeros de TrwB, también se ensayaron para ver la interacción con TrwE. Como puede observarse en la Figura 15B, estas mutaciones no afectan a la interacción TrwB-TrwE, luego definen una zona de interacción exclusivamente entre monómeros de TrwB, a diferencia

de la región TM, donde los mutantes analizados también afectaban la interacción con TrwE (Sección 2.1.2 y Figura 9).

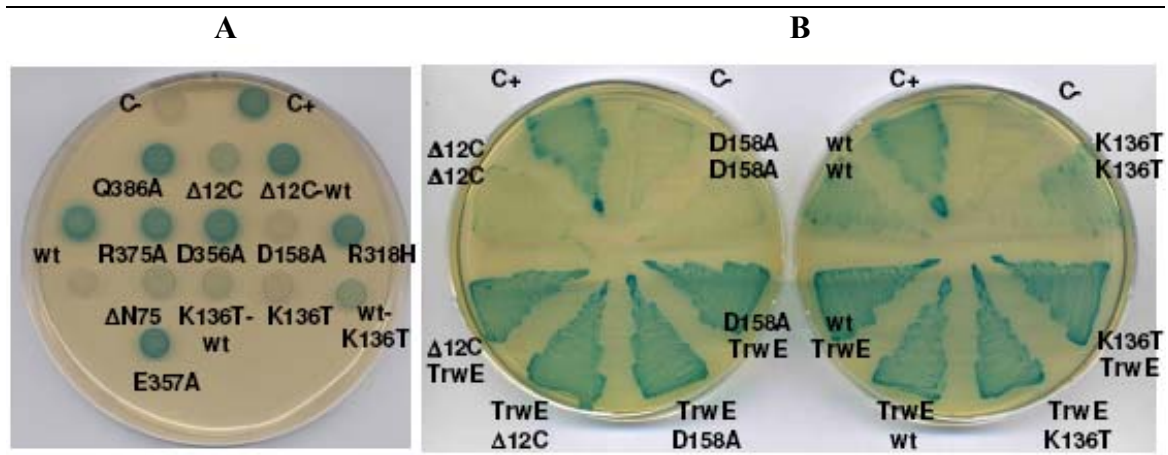


Figura 15. A Efecto de los mutantes de TrwB en la interacción TrwB-TrwB como se ve en el ensayo de dos híbridos bacterianos. La cepa DHM1 contiene los pares de plásmidos que codifican las fusiones T18 y T25 con los mutantes de TrwB indicados, en placas suplementados con X-gal. . Wt, TrwB salvaje. – y +, control negativo (pUT18 + pT25zip) y positivo (pUT18zip + pT25zip). B. Los mutantes que presentaron un efecto negativo en la oligomerización de TrwB fueron analizados en su interacción con TrwE.

Como resumen, y para facilitar la comparación en la discusión de todos los resultados expuestos hasta el momento acerca de los mutantes de TrwB, hemos elaborado la Figura 16.

- Efecto de los mutantes del NBD

Las regiones Walker de las proteínas que hidrolizan ATP son fundamentales para la actividad ATPasa de estas proteínas, y deleciones o mutaciones de estas regiones abolen esta actividad (Walker *et al.*, 1982; Yuan *et al.*, 2005). El residuo K136 se encuentra en el motivo Walker A de TrwB y los residuos D356 y E357 forman parte del Walker B, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado, resaltando la esencialidad de la actividad ATPasa de TrwB en conjugación.

Seis de las ocho mutaciones en contacto con el NTP (K136T, D158A, D356A, E357A, R375A, y Q386A) pierden completamente su funcionalidad en conjugación, mientras que el mutante R124A se ve significativamente afectado (Tabla 12). El mutante Q390A, un poco más alejado del nucleótido (Figura 12D), en el sistema limitante muestra una drástica caída de su eficiencia conjugativa. El residuo D158 es un

hipotético Asp box que estaría involucrado también en el proceso de hidrólisis. Por otro lado, los residuos R124 y R375 se encuentran cercanos a los residuos implicados en la hidrólisis directa del ATP, pero en monómero enfrentado (Figura 12C). Por ello, los datos sugieren que los residuos que fueron seleccionados para ser mutados juegan un papel importante en el acoplamiento e hidrólisis del ATP.

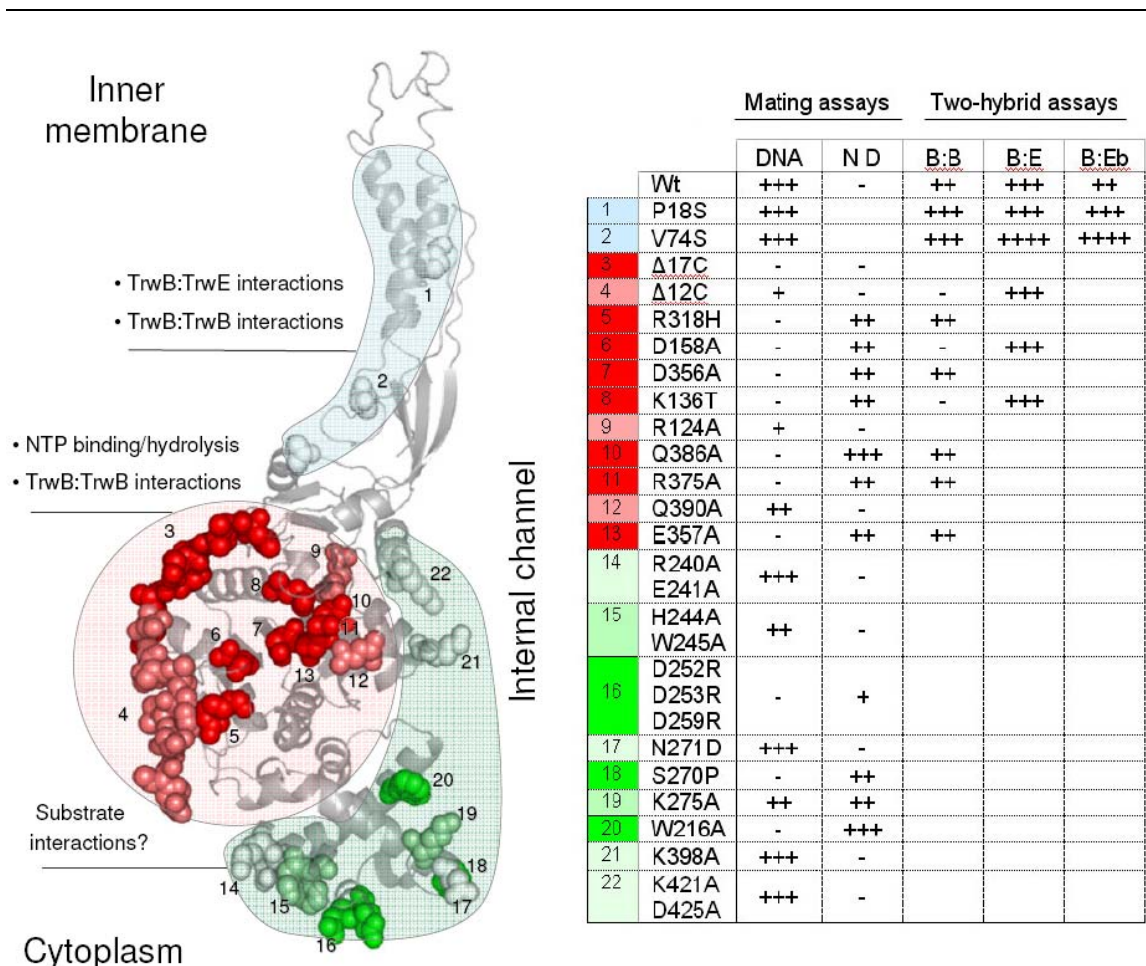


Figura 16. Figura resumen de los datos obtenidos en el estudio de los distintos mutantes de TrwB, en cuanto a su funcionalidad en conjugación (DNA), dominancia negativa (ND) y los distintos análisis mediante el ensayo de dos híbridos bacteriano, indicándose las proteínas analizadas sin su prefijo Trw. La imagen de la izquierda señala la localización de los residuos en un monómero de TrwB. Se indica la posible función de cada dominio, y el efecto de los mutantes mediante código de colores. Los colores oscuros significan mutaciones que afectan más a la funcionalidad de la proteína.

Todos los mutantes de la región NBD que presentan deficiencias conjugativas muestran dominancia negativa (Tabla 12), típica de mutaciones que afectan a proteínas que forman parte de complejos, lo que sugiere que todos los mutantes pueden oligomerizar con TrwB salvaje formando heterohexámeros. Sin embargo, los mutantes

K136T y D158A, que presentan dominancia negativa, se ven afectados en su interacción TrwB-TrwB según el ensayo de dos híbridos bacteriano (Figura 15), cuando lo esperable en estos casos sería que mantuvieran su capacidad de oligomerizar. Una posibilidad sería que estas mutaciones formaran heterohexámeros más inestables, y por tanto menos funcionales. También es posible que la dominancia negativa sea debida a que estas mutaciones impidan la interacción de TrwB con otros componentes del T4SS, inutilizando el conjunto de la maquinaria conjugativa.

Tanto el segmento Ct como el dominio NBD de TrwB parecen estar involucrados específicamente en la interacción TrwB-TrwB y no en la interacción TrwB-TrwE (Figura 15), mientras que los residuos de la región transmembrana están implicados en la interacción con TrwE, y en cierto grado también con TrwB. De manera similar, en las T4CP TraD del plásmido F y TcpA del plásmido pCW3, la región transmembrana es importante en la oligomerización junto con otro segmento citoplasmático (Haft *et al.*, 2007; Steen *et al.*, 2009). Esto sugiere que la región transmembrana es requerida para la interacción con el T4SS y con la propia proteína mientras que el dominio de la región citoplasmática sería sólo necesario para la oligomerización de la propia molécula.

- Efecto de los mutantes AAD e ICH

Como mencionamos en la introducción, TrwB interacciona con las proteínas del relaxosoma TrwA y TrwC, y se une de forma inespecífica al DNA tanto de cadena doble como de cadena sencilla (Llosa *et al.*, 2003; Moncalian *et al.*, 1999). El canal interno del hexámero de TrwB (ICH) podría interactuar con el DNA con residuos cargados positivamente que protruden hacia el canal. La región AAD, que se encuentra en el citoplasma y rodea la entrada del ICH, sería candidata a interactuar con TrwA y con TrwC, y tal vez con el DNA. La región AAD de TrwB está relacionada con la de la proteína TraM del plásmido F, que está implicada en la interacción específica con el relaxosoma (Gomis-Ruth *et al.*, 2002).

Según los resultados obtenidos, tanto la región AAD como el ICH de TrwB son importantes para la función de TrwB, pero en condiciones estándar de conjugación se necesitan mutaciones muy agresivas para afectar a su funcionalidad. Sin embargo, cuando estas mutaciones son ensayadas en el sistema limitante afectan a la eficiencia de conjugación. Especial mención merecen las mutaciones en las lisinas del ICH, K275A y

Resultados y discusión

K398A, que muestran efectos contrarios en la frecuencia de conjugación, mientras el mutante doble es igual al wt. Quizás, estos residuos estén implicados en distintos pasos del bombeo del DNA, de tal manera que al mutar uno de los residuos pueda bloquear el sistema, y si se mutan ambos se equilibra de nuevo. Serán necesarios ensayos in vitro con las proteínas purificadas para poder ver el efecto de estas mutaciones en las distintas actividades bioquímicas de TrwB. En este trabajo se comenzaron a purificar algunas de estas proteínas, trabajo que está siendo continuado por otros miembros del grupo de investigación.

CAPITULO 3

3. TRANSFERENCIA DE DNA DESDE *BARTONELLA*

Hasta el momento, hemos estudiado interacciones entre los T4SS de *Bt* y de R388, viendo que parte de sus genes son intercambiables estructural y funcionalmente. Además, hemos conseguido mutantes que mejoraban la interacción entre TrwB con la proteína TrwE del T4SS Trw de *Bt*. Sin embargo, desde *Ec*, no hemos visto movilización del relaxosoma de R388 a través del T4SS Trw de *Bt*. Por lo tanto, nuestro siguiente paso fue probar la posible movilización del relaxosoma de R388 a través del T4SS Trw de *Bt*, pero esta vez en su entorno, es decir, desde la propia *Bt*.

3.1 TRANSFERENCIA CONJUGATIVA MEDIADA POR EL T4SS TRW DE *BARTONELLA*

El primer acercamiento para estudiar la posible movilización del DNA desde *Bartonella*, metodológicamente más sencillo, era realizar una serie de conjugaciones desde *Bt* a una cepa de *Ec*. Aunque está descrito en la bibliografía que la expresión del T4SS Trw en *Bt* se induce durante la infección de células eucariotas (Seubert et al., 2003), la expresión basal de sus genes podría ser en principio suficiente para el ensamblaje de las proteínas que constituyan el T4SS, puesto que lo es para complementar a sus homólogos *trw* de R388 (Tabla 2).

Como paso previo, ensayamos si el plásmido R388, de amplio rango de huésped, era capaz de moverse desde *Bartonella*, a través de su propio T4SS, tras 6 horas de conjugación, utilizando como cepas receptoras *Ec* o *Bt*. Como puede verse en la Tabla 12, el plásmido derivado de R388 (pSU2007) es capaz de moverse desde *B. tribocorum*. La eficiencia de movilización es 1000 veces mayor si las bacterias receptoras son *E. coli* y no otra especie de *Bartonella*. Por lo tanto, R388 es capaz de

conjugar desde una cepa de *Bartonella* a otra de *Ec* con alta eficiencia, y de una cepa de *Bt* a otra de *Bt* pero con una eficiencia mucho menor.

Donador	Receptor	Frecuencia de transferencia
<i>B. tribocorum</i> (pSU2007)	<i>B. henselae</i>	8×10^{-5}
<i>B. tribocorum</i> (pSU2007)	<i>Ec</i> (DH5 α)	1×10^{-1}

Tabla 12. Frecuencia de transferencia (transconjugantes/donadores) del derivado de R388 Km^R (pSU2007) desde *B. tribocorum* hacia las cepas receptoras indicadas en la segunda columna.

Para probar transferencia de DNA a través del T4SS de *Bt*, necesitábamos un plásmido movilizable, que portara la región *Dtr* de R388 (*oriT* + *trwABC*) y que fuera estable en *Bartonella*. Para ello, como se muestra en la Tabla 3 de Metodología, clonamos en el esqueleto de pBBR6 (vector con un replicón de amplio rango de huésped) la región *oriT trwABC* de R388 (pHP132). Además de esta construcción, realizamos otras dos donde están presentes los mutantes V74I y P18S de TrwB (pHP133 y pHP134 respectivamente).

Además de las cepas de *Bt* y *Bh*, contábamos con un mutante de *Bt* carente de *trwE*, y por lo tanto sin su T4SS Trw formado correctamente, que utilizamos como control negativo. Por lo tanto, estudiamos la posible movilización desde *Bt* y *Bt* Δ *trwE* hacia *Ec* y *Bh* de las construcciones con *trwB wt* y dos de los mutantes que presentaron mayor interacción con TrwE *Bt*. Contábamos también con el plásmido pMTX701 (Tabla 2 de Metodología; pBBR6:*Dtr* R388 + *trwE* R388), donde el gen *trwE* de R388 queda bajo el control del promotor lactosa del vector, y complementa al mutante pSU4134 en conjugación (datos no mostrados). Con este plásmido queríamos estudiar la posibilidad de que un heteromultímero de TrwE *Bt*:R388 pudiera ser funcional, al estar expresándose ambas TrwE en *Bt*. Asimismo, pudimos analizar si TrwE de R388 podría ser funcional en el sistema de *Bt*, al ensayar este plásmido en la cepa de *Bt* Δ *trwE*.

Donador	R388	Receptor	Frecuencia de transferencia
<i>B. tribocorum</i>		<i>E. coli</i>	
+ pSU2007	<i>trw</i>		1×10^{-1}
+ pHP132	<i>oriT trwABC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pHP133	<i>oriT trwAB^VC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pHP134	<i>oriT trwAB^PC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pMTX701	<i>oriT trwABC+trwE</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
<i>B. tribocorum</i> Δ<i>trwE</i>		<i>E. coli</i>	
+ pHP132	<i>oriT trwABC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pMTX701	<i>oriT trwABC+trwE</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
<i>B. tribocorum</i>		<i>B. henselae</i>	
+ pSU2007	<i>trw</i>		8×10^{-5}
+ pHP132	<i>oriT trwABC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pHP133	<i>oriT trwAB^VC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pHP134	<i>oriT trwAB^PC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pMTX701	<i>oriT trwABC+trwE</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
<i>B. tribocorum</i> Δ<i>TrwE</i>		<i>B. henselae</i>	
+ pHP132	<i>oriT trwABC</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
+ pMTX701	<i>oriT trwABC+trwE</i>		$< 1 \times 10^{-8}$
<i>B. tribocorum</i>		<i>E. coli</i>	
+ pHP132	<i>oriT trwABC</i>	+ pSU1443	$< 1 \times 10^{-8}$
+ pHP133	<i>oriT trwAB^VC</i>	+ pSU1443	$< 1 \times 10^{-8}$
+ pHP134	<i>oriT trwAB^PC</i>	+ pSU1443	$< 1 \times 10^{-8}$
+ pMTX701	<i>oriT trwABC+trwE</i>	+ pSU1443	$< 1 \times 10^{-8}$
<i>B. tribocorum</i> Δ<i>TrwE</i>		<i>E. coli</i>	
+ pHP132	<i>oriT trwABC</i>	+ pSU1443	$< 1 \times 10^{-8}$
+ pMTX701	<i>oriT trwABC+trwE</i>	+ pSU1443	$< 1 \times 10^{-8}$

Tabla 13. Frecuencias de conjugación de los plásmidos descritos en la primera columna desde las cepas descritas en la primera columna (en negrita) a las cepas receptoras descritas en la tercera columna. La descripción de los elementos de R388 que codifican los plásmidos se refleja en la segunda columna. B^V y B^P representan a las proteínas TrwB con las mutaciones V74I y P18S, respectivamente.

Por último, está descrito que en algunos casos la presencia de parte del T4SS en la célula receptora puede mejorar la eficiencia de conjugación (Liu and Binns, 2003). Por ello, también hicimos ensayos donde la cepa receptora expresaba el T4SS de R388, desde un plásmido deficiente en conjugación (pSU1443).

Los resultados de todas estas conjugaciones se muestran en la Tabla 13. En ninguno de los casos ensayados se detecta conjugación de ninguna de las construcciones a ninguna de las cepas receptoras. Esto indica que no es posible transferir a niveles detectables un plásmido derivado de R388 sustituyendo su T4SS por el de *Bartonella*, ni siquiera con la presencia de un T4SS en la célula receptora, o en presencia de TrwE de R388, ya sea formando homomultímeros o heteromultímeros con TrwE de *Bt*. No hay que olvidar que, aunque fuera TrwE de R388 la única proteína que enlaza el T4SS con TrwB, la región periplásmica de TrwE establece interacciones con otros componentes del T4SS, que podrían no ser funcionales con los componentes del T4SS de *Bt*.

Como hemos señalado anteriormente, la inducción del T4SS Trw de *Bartonella* se produce durante la infección de células endoteliales (Seubert et al., 2003). Por eso, hicimos un nuevo abordaje que consistió en infectar células humanas endoteliales inmortalizadas Ea.hy 926 (Metodología, sección 5.3) con *B. henselae*, portando el plásmido pHP132. Tras 3-5 días de infección recuperamos las bacterias en suspensión y las adheridas a la superficie de la célula, lavándolas y utilizándolas como donadoras en nuevos ensayos de conjugación.

Tal y como se muestra en la Tabla 14, en la gran mayoría de las ocasiones la frecuencia de transferencia fue nula. Sin embargo, en dos ensayos sí obtuvimos transconjugantes. Estos transconjugantes fueron comprobados mediante PCR, antibiograma y extracción plasmídica, para descartar que fueran contaminaciones o que hubieran adquirido resistencias espontáneas. Debido a la bajísima eficiencia de este proceso, no podemos descartar que la adquisición del plásmido ocurra por otras vías y no por la conjugación, y tampoco es fácil desarrollar los controles adecuados para corroborar o descartar esta hipótesis. Tras estos resultados tratamos de mejorar las condiciones cambiando el número de células, la cantidad de bacterias, ampliar los días de infección e incluso tratando de recuperar solamente las bacterias intracelulares, pero

en todos los casos los resultados fueron negativos (datos no mostrados). Por ello, no podemos confirmar ni descartar la movilización por conjugación de *Bartonella* a *Ec*.

Ensayo n°	Donadores	Transconjts. comprobados	Frecuencia de transferencia
1	8×10^8	0	$< 10^{-8}$
2	$4,5 \times 10^8$	18	4×10^{-8}
3	7×10^8	0	$< 10^{-8}$
4	2×10^8	0	$< 10^{-8}$
5	5×10^8	10	2×10^{-8}
6	5×10^8	0	$< 10^{-8}$
7	4×10^8	0	$< 10^{-8}$
8	6×10^8	0	$< 10^{-8}$

Tabla 14. Frecuencia conjugativa del plásmido pHP132 desde *B. henselae* en contacto con células eucariotas a *Ec* DH5 α . En la segunda columna se indica el número de transconjugantes reales tras ser comprobados por varios métodos.

3.2 TRANSFERENCIA DE DNA A CÉLULAS HUMANAS MEDIADA POR EL T4SS DE *BARTONELLA*

Hasta el momento, no hemos visto transferencia por conjugación entre bacterias a través del T4SS de *Bt*. El abordaje por conjugación se hizo en primer lugar por ser el más sencillo, pero no es sorprendente que no observemos transferencia. Al fin y al cabo, el T4SS Trw de *Bt* se activa en las células endoteliales y su célula receptora no es una bacteria. Por lo tanto, decidimos abordar la transferencia al interior de las células humanas infectadas por *Bt*.

3.2.1. Herramientas y puesta a punto del ensayo

Para poder medir la transferencia de DNA a la célula eucariota es imprescindible decidir un gen reportero que pueda transcribirse en la célula eucariota y que implique un cambio que sea detectable para nosotros. En nuestro caso, utilizamos el bien conocido gen de la eGFP. Si la célula expresa esta proteína, puede ser observable por distintas

técnicas buscando la producción de fluorescencia. Pero para ensayar la transferencia de DNA, dicha molécula tiene que estar contenida previamente en la bacteria, y en ella no se puede transcribir GFP para no interferir con las mediciones. Por ello, utilizamos un cassette de expresión de eGFP en eucariotas.

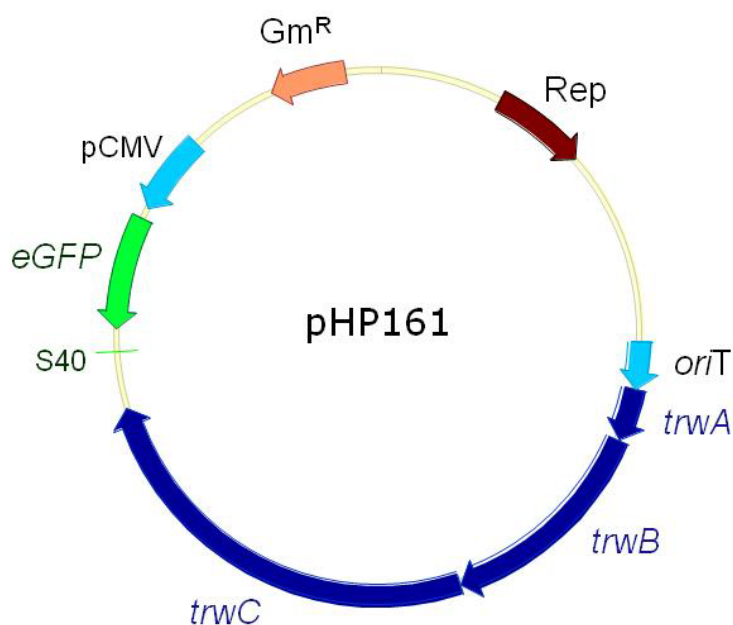


Figura 17. Esquema del plásmido pHP161. En azul claro se representa el origen de transferencia (*oriT*) y el promotor de eucariotas (pCMV). Los genes *trw* de la región *Dtr* de R388 se representan en azul oscuro. En verde, el gen eGFP. En naranja, el gen de resistencia a Gm, y en marrón el origen de replicación del plásmido pBBR6.

El plásmido central a partir del cual nos basaremos para realizar las distintas construcciones para esta técnica es el que se representa en la Figura 17. Este plásmido procede de pHP132, utilizado en las conjugaciones de *Bartonella* a *Ec* (Sección 3 Metodología). Es decir, procede de un pBBR6 al que le hemos clonado la región *Dtr* de R388 (*oriT*+*trwABC*), y posteriormente se ha clonado un casete de expresión eGFP. Este casete consta del gen que codifica la proteína eGFP (una variedad de GFP más potente), un promotor constitutivo de células animales (pCMV) y una región de poliadenilación (de SV40). Así, la proteína no puede ser producida en células procariontas sino en células eucariotas. Sobre este plásmido (pHP161), también hemos clonado los mutantes V74I (pHP157) y P18S (pHP160) de TrwB, que al presentar una mayor interacción con parte del T4SS Trw de *Bartonella*, podrían incrementar la transferencia. Al construir pHP161, se obtuvieron las dos posibles orientaciones del

casete eGFP; sin embargo, para simplificar, y tras comprobar que la orientación no influye significativamente en los resultados, sólo hemos hecho referencia a una de ellas.

Como control negativo, construimos un plásmido similar (pHP181) carente de TrwC, ya que toda transferencia de DNA por conjugación que tenga lugar entre la bacteria y la célula ha de estar mediado por TrwC. La construcción de este plásmido se detalla en la sección 3.1 de Metodología.

Antes de utilizar estos plásmidos para los ensayos, comprobamos que efectivamente la proteína eGFP era funcional en células eucariotas y no se expresaba en procariontes. Tras comprobar en un microscopio de fluorescencia que las bacterias que contenían estas construcciones no expresaban eGFP (no mostrado), transfectamos células humanas HEK293T (Tabla 5 Metodología) con estos plásmidos, y vimos que efectivamente las células expresaban eGFP (Figura 18), y que además no había diferencias sustanciales entre las distintas construcciones (datos no mostrados).

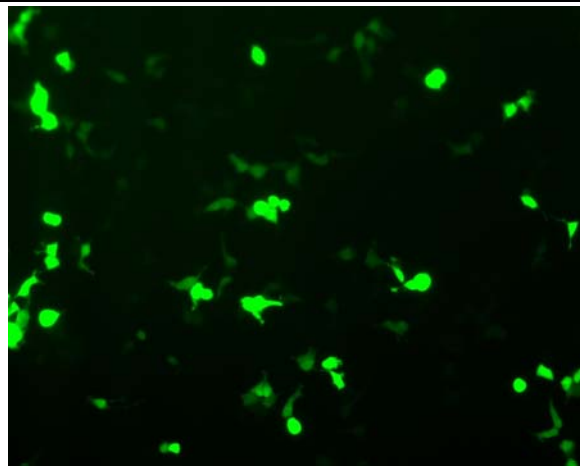


Figura 18. Expresión de eGFP en células HEK293T transfectadas por el plásmido pHP161 tras 36 horas. La imagen fue obtenida por microscopía de fluorescencia.

También era requisito previo mostrar que los plásmidos eran movilizables, al menos en bacterias, por el T4SS de R388. Tal y como se muestra en la Tabla 15, los plásmidos son transferidos eficientemente, tanto por su propio sistema (R388) como por otro T4SS conjugativo como es el de pKM101, éste con menor eficiencia. Como era de esperar, el plásmido carente de TrwC (pHP181) no es movilizable. Los tres plásmidos

movilizables (conteniendo TrwB salvaje o sus mutantes) presentan la misma frecuencia de transferencia.

T4SS	Plásmido	Fenotipo relevante	Frecuencia de transferencia
pKM101	pHP157	TrwB V74I	2×10^{-4}
pKM101	pHP160	TrwB P18S	2×10^{-4}
pKM101	pHP161	TrwB wt	1×10^{-4}
pKM101	pHP181	TrwB wt; Δ TrwC	$<10^{-7}$
R388	pHP157	TrwB V74I	1×10^0
R388	pHP160	TrwB P18S	4×10^0
R388	pHP161	TrwB wt	5×10^0
R388	pHP181	TrwB wt; Δ TrwC	$<10^{-7}$

Tabla 15. Frecuencia de transferencia (transconjugantes/donadores) de los plásmidos indicados en la segunda columna que expresan las mutaciones representadas en la tercera columna a través de los T4SS de pKM101 y R388. Los plásmidos de la segunda columna fueron introducidos junto con pKM101 Δ mob (T4SS pKM101) ó el plásmido pSU4058 (T4SS R388) en la cepa *Ec* DH5 α . Las células receptoras usadas en la conjugación fueron *Ec* D1210.

3.2.2. Infecciones de células humanas por *Bartonella*

El estudio comparativo realizado entre los T4SS Trw (Capítulo 1) fue realizado entre los sistemas de R388 y de *Bartonella tribocorum*, ya que contábamos con la existencia del cósmido pAB2, que codificaba la región *trw* de *Bartonella tribocorum*. Sin embargo, esta cepa resulta ser muy agresiva con los cultivos celulares, y tradicionalmente se obtienen mejores resultados de infección con cepas de *Bartonella henselae*. Los experimentos de infección se iniciaron en el laboratorio del profesor C. Dehio (Biozentrum, U. Basel), donde tienen optimizados estos ensayos y obtienen repetitivamente una tasa de infección por *Bh* de la práctica totalidad de las células (Dehio *et al.*, 1997).

Se realizaron infecciones de células humanas con *B. henselae* portando los distintos plásmidos descritos, tal y como se explica en Metodología, sección 6.3. La detección de los eventos de transferencia de DNA y expresión de eGFP se realizó por

citometría de flujo. La ventaja del citómetro de flujo es que es muy sensible y preciso, y se puede contar un gran número de células por unidad de tiempo. Una vez lavadas las células y recogidas, son cargadas en un citómetro de flujo que es capaz de contar las células que van pasando por su capilar (una a una), y gracias a varios láseres y detectores, detectar qué células emiten fluorescencia verde y a qué intensidad. En la Figura 19 se muestra un experimento representativo.

Seleccionada la población celular, excluyendo así agregados celulares, células rotas y posibles restos de bacterias, representamos en la gráfica tamaño frente a intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. En cada experimento siempre ha de existir un control de células sin infectar, y que por lo tanto nos va a dar el valor de la fluorescencia basal (Figura 19). Por lo tanto, en las muestras analizadas, todas las células que sobrepasen esa línea basal se consideran células positivas, y cuanto más arriba en la escala mayor será su intensidad.

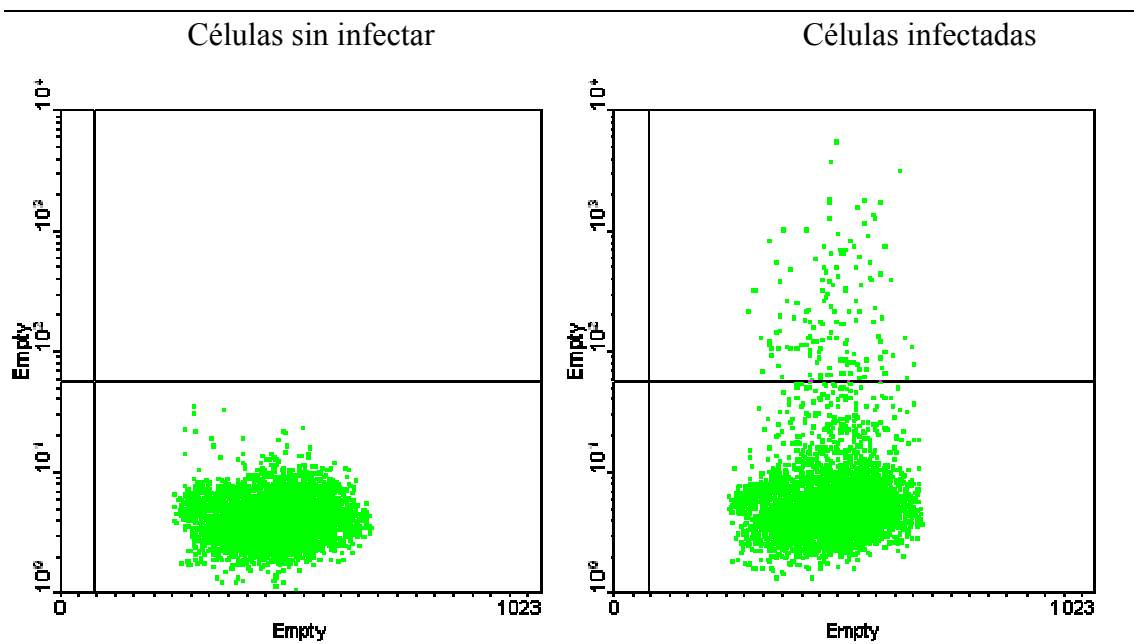


Figura 19. Gráficas obtenidas por el citómetro de flujo. Células sin infectar (izq) e infectadas por *Bh* con el plásmido pHP161 (dcha). Cada punto verde representa una célula, cuya intensidad en la expresión de eGFP viene determinada por la posición que ocupe en la gráfica, siendo mayor cuanto más arriba se encuentre de la línea horizontal que determina la línea base a partir de la cual se consideran resultados positivos.

Como muestra la Figura 19, se observa un desplazamiento de la población hacia valores más altos en la intensidad de eGFP, habiendo muchas células con una intensidad

moderada, y algunas menos con gran intensidad. Esto significa que efectivamente existe transferencia de DNA desde las bacterias, que han sido internalizadas por las células eucariotas humanas al citoplasma; dicho DNA, además, llega al núcleo y se expresa, dando lugar a la producción de eGFP. Es decir, cuando observamos una célula que expresa eGFP no sólo significa transferencia de DNA, sino que además, ese DNA ha de llegar al núcleo y transcribirse. Además, la expresión de eGFP es transitoria, ya que el plásmido termina perdiéndose al no integrarse en el DNA cromosómico de la célula. Por ello, podríamos decir que la movilización de DNA de la bacteria a la célula podría estar subestimada

Este resultado es muy importante, porque indica que hay transferencia de DNA a células humanas a través del T4SS de una bacteria patógena intracelular, cosa que jamás se había descrito, y a pesar de la gran variabilidad de roles de los T4SS, nunca se ha observado en la naturaleza. Sí se conoce transferencia de DNA a células vegetales a través del T4SS Vir de *A. tumefaciens*, y se ha conseguido en condiciones de laboratorio transferencia conjugativa a diversos tipos de células eucariotas. Pero no se ha descrito previamente la transferencia de DNA a células de mamífero mediada por un T4SS implicado en virulencia bacteriana.

Para optimizar este resultado, probamos infecciones en dos líneas celulares distintas: HeLa y Ea.hy 926 (hibridoma entre células HUVEC y carcinoma), siendo estas últimas las que presentaban mejores resultados. Por ello, todas las infecciones mostradas seguidamente son de *Bartonella henselae* en cultivos celulares de Ea.hy926. Tras probar distintos tiempos de infección, los resultados óptimos se obtuvieron a las 36 horas de infección (datos no mostrados). Al aumentar el número de bacterias por célula aumenta también el número de células eGFP positivas tras la infección. En el rango de una multiplicidad de infección (MOI) de 200-400, el efecto es menos marcado, y un número superior de bacterias empieza a afectar a la integridad de las células. Por ello, establecimos 400 MOIs como el número óptimo para realizar los ensayos. Con todas estas variables optimizadas, los datos obtenidos fueron bastante variables, consiguiéndose normalmente un 1,5-2% de células eGFP+.

Por otro lado, aunque la ausencia de expresión de eGFP en la bacteria ya había sido comprobada, y en teoría tampoco sería posible por la presencia de un promotor de

eucariotas, analizamos por microscopía de fluorescencia las células infectadas. De esta manera discernimos si la expresión es homogénea en toda la célula o podría estarse dando en las bacterias que se encuentran contenidas en los endosomas, viéndose así su expresión en puntos concretos del citoplasma.



Figura 20. Imagen de microscopía de fluorescencia de una célula Ea.hy 926 expresando GFP tras haber sido infectada por *Bh* portando el plásmido pHP161.

En la Figura 20 podemos ver una muestra de uno de los campos tomados por un microscopio de fluorescencia de una serie de células infectadas por *B. henselae* portando el plásmido pHP161. Como se observa, la expresión de eGFP es homogénea en todo el citoplasma, pudiendo ser más intensa en regiones adyacentes al núcleo. Esto evidencia que la expresión de eGFP no está teniendo lugar en las endosomas, lo que indica que el DNA está siendo transportado desde las bacterias al citoplasma y de ahí, viaja al núcleo donde se expresa.

No podíamos descartar que la presencia del plásmido en las células eucariotas se debiese a la entrada de DNA tras lisis bacteriana, bien desde dentro o desde fuera de la célula eucariota. Nuestros siguientes pasos fueron encaminados a determinar que la presencia del plásmido en la célula eucariota se debía a una transferencia mediada por el sistema conjugativo de R388 y el T4SS de *Bh*.

3.2.3. Papel de TrwB y TrwC en la transferencia de DNA desde *Bh*

Para comprobar el papel de los elementos de la maquinaria conjugativa de R388 en la transferencia de DNA observada, realizamos infecciones con los plásmidos descritos en la sección anterior, conteniendo mutaciones de TrwB que aumentan su interacción con TrwE de *Bt*, así como el plásmido carente de TrwC. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 21. Para simplificarlos, se representan las medias del porcentaje de células que expresan eGFP de más de 10 experimentos, así como la desviación estándar.

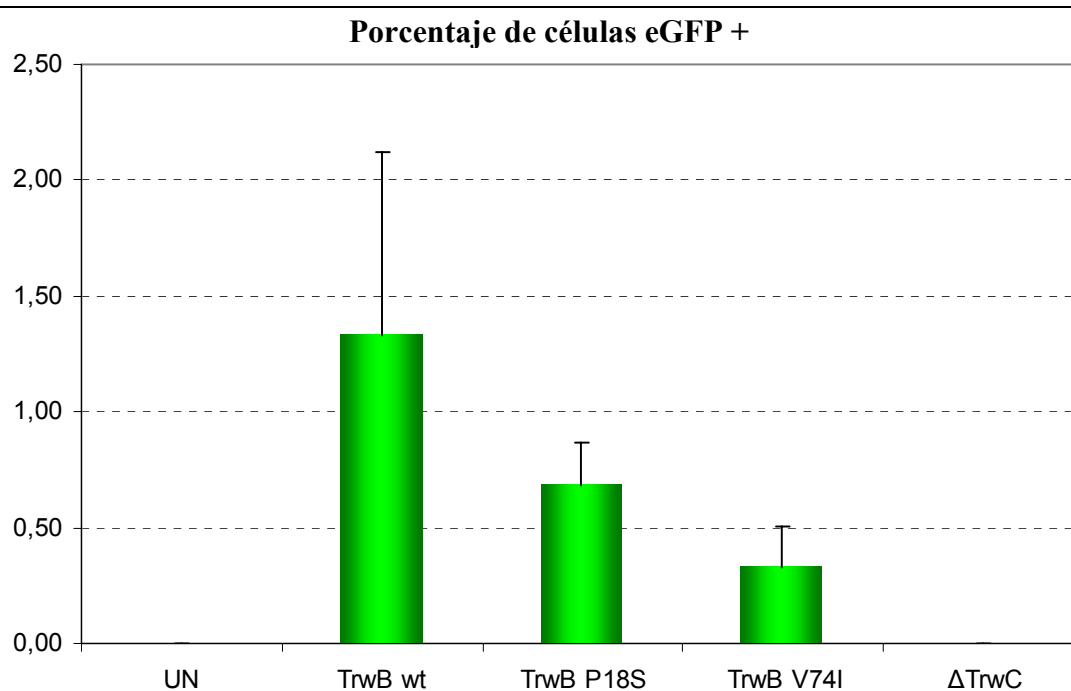


Figura 21. Representación gráfica de las medias del porcentaje de células que expresan GFP cuando la infección ha sido realizada con los plásmidos que portan las mutaciones indicadas en el eje de coordenadas. UN (células sin infectar), TrwB wt (pHP161), TrwB P18S (pHP160), TrwB V54I (pHP157) y ΔTrwC (pHP181). También se representa la desviación estándar.

Estos resultados tienen varios datos a analizar. En primer lugar, se confirma que es una movilización dependiente de TrwC, ya que la construcción que carece de ella no es transferida en absoluto. Este es un resultado muy significativo, pues determina que la transferencia de DNA ocurre mediante un proceso conjugativo, y presumiblemente será el complejo TrwC-ssDNA el que entre en la célula humana. En segundo lugar, los

distintos mutantes de TrwB presentan eficiencias de transferencia menores, a pesar de haberse seleccionado por su mayor interacción con TrwE *Bt*.

Dados los resultados, y a pesar de que los mutantes de TrwB funcionaban como la proteína salvaje en ensayos de complementación (Tabla 15), analizamos la expresión de TrwB por Western blot para ver si las mutaciones pudieran estar afectando la estabilidad de la proteína. Para el estudio de expresión de estos mutantes utilizamos los plásmidos pMTX601 (TrwB wt), pHP106 (TrwB V74I) y pHP108 (TrwB P18S) ya que la expresión de TrwB se encuentra bajo el control del promotor Lac, pudiendo ser inducible por IPTG.

Como se observa en la Figura 22, en condiciones de no inducción existen niveles ligeramente más bajos del mutante P18S, y no se detecta el mutante V74I. En condiciones de inducción, TrwB P18S muestra niveles similares al salvaje pero TrwB V74I no se detecta. Esto sugiere que esta mutación afecta fuertemente a la estabilidad de TrwB, aún produciendo suficiente proteína para funcionar correctamente en conjugación. Por lo tanto, la variación en el porcentaje de transferencia de DNA al utilizar el mutante V74I de TrwB en las infecciones puede ser debido a que hay menor cantidad de proteína, pero no en el caso del mutante P18S.

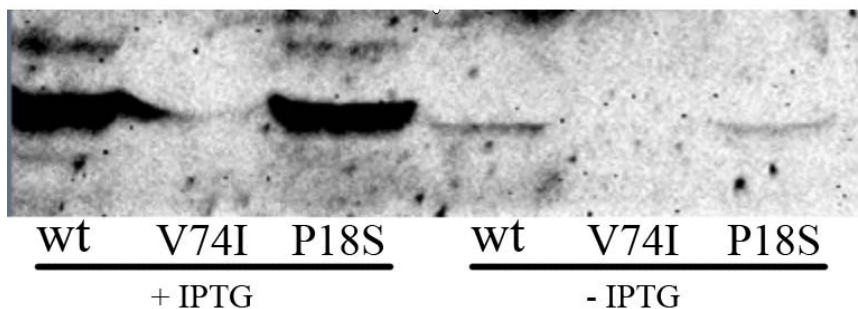


Figura 22. Western blot con anti TrwB de extractos proteicos de *Ec* que contiene plásmidos que expresan las distintas mutaciones de TrwB indicadas debajo de cada calle. Las calles de la izquierda proceden de extractos inducidos por IPTG 0,5 mM durante 3h.

Nosotros habríamos esperado obtener una mayor eficiencia al utilizar los mutantes que interaccionan más fuertemente con la proteína TrwE del T4SS de *Bt*. En un caso esto podía ser debido a una mayor inestabilidad del mutante, pero en otros casos la proteína mutante estaba presente en cantidades similares a la salvaje. Se cree que

VirB10 es un sensor del sistema que permite abrir el canal al paso de sus sustratos, con gasto energético de otras ATPasas y a través de la interacción con la T4CP (Llosa et al., 2009). Por lo tanto, una interacción más fuerte podría ser demasiado rígida para la transmisión de la señal o los cambios conformacionales que tienen lugar en la proteína. De cualquier manera, estos resultados indican que TrwB tiene un papel directo en la transferencia del DNA desde la bacteria a la célula, ya que cuando hay una menor cantidad de la misma, disminuye significativamente la eficiencia de movilización del DNA, y por tanto el número de células eGFP positivas (3-4 veces menos). Y lo que es más interesante, una mutación puntual en la región TM que afecta a la interacción con el T4SS también provoca una caída significativa (aproximadamente el 50%) de los niveles de transferencia.

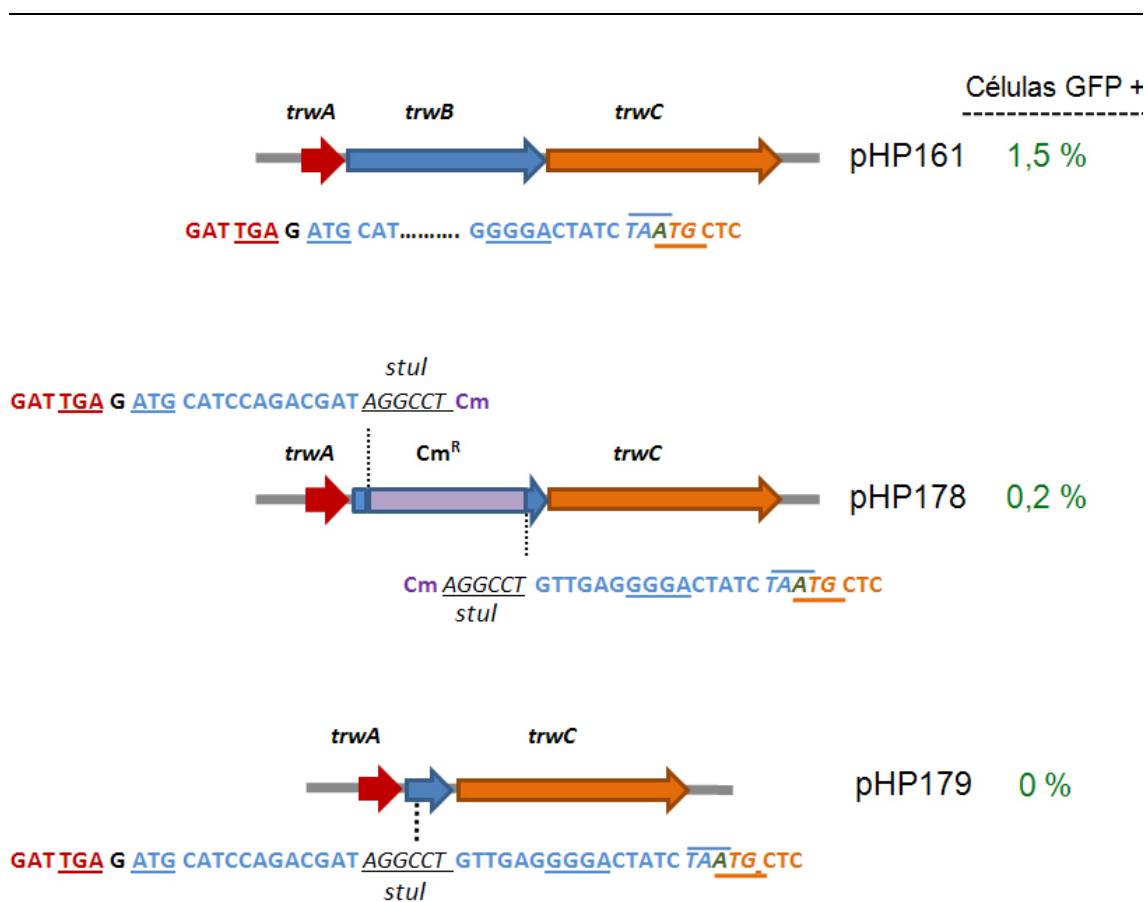


Figura 23. Construcción de de los plásmidos pHP178 y pHP179 a partir de pHP161. En el dibujo se especifica la secuencia existente a ambos lados del corte introducido por recombinación. El plásmido pHP178 presenta el gen de resistencia a Cm introducido por recombinación, mientras que en el plásmido pHP179 fue quitado por digestión. En verde se muestra los porcentajes de transferencia de estas construcciones de *Bh* a células humanas en los ensayos de infección. Subrayados se especifican los codones de comienzo (ATG) y stop (TGA;TAA), así como la secuencia SD y de corte por *StuI*.

Para aclarar el nivel de dependencia de TrwB en la transferencia de DNA, construimos los plásmido pHP178 y pHP179 por delección de *trwB* del plásmido pHP161. Como puede verse en la Figura 23, el plásmido pHP178 fue realizado por recombinación homóloga y en lugar de *trwB* expresa el gen de resistencia a Cm. Por otro lado, en el plásmido pHP179 se eliminó el gen de resistencia a Cm, quedando el codón de inicio de *trwC* tal y como quedaría respecto al final de *trwB* en R388.

Realizamos ensayos de complementación para comprobar, por una parte, que los plásmidos sin TrwB o TrwC no podían complementar una mutación del mismo gen, y por otra, para asegurar la funcionalidad de TrwC y descartar que pudiera estar afectada por la delección de TrwB corriente arriba.

Plásmidos en donador	Región Trw	Frecuencia de transferencia
pSU1443	R388 TrwB⁻	$<10^{-7}$
pSU1443 + pHP161	R388 TrwB⁻ + TrwABC	1×10^{-2}
pSU1443 + pHP178	R388 TrwB⁻ + TrwAC, Cm^R	$<10^{-7}$
pSU1443 + pHP179	R388 TrwB⁻ + TrwAC	2×10^{-7}
pSU1443 + pHP181	R388 TrwB⁻ + TrwAB	8×10^{-3}
pSU1445	R388 TrwC⁻	$<10^{-7}$
pSU1445 + pHP161	R388 TrwC⁻ + TrwABC	4×10^{-2}
pSU1445 + pHP178	R388 TrwC⁻ + TrwAC, Cm^R	3×10^{-2}
pSU1445 + pHP179	R388 TrwC⁻ + TrwAC	3×10^{-2}
pSU1445 + pHP181	R388 TrwC⁻ + TrwAB	$<10^{-7}$

Tabla 16. Frecuencia de transferencia (transconjugantes/donadores) de los plásmidos pSU1443 (R388 TrwB⁻) o pSU1445 (R388 TrwC⁻) tras ser complementados por los plásmidos que figuran con ellos en la primera columna. Como bacterias donadoras se utilizaron *Ec* DH5 α y como receptoras *Ec* D1210.

Los resultados (Tabla 16) demuestran que el plásmido pHP161 puede complementar mutaciones en *trwB* y *trwC*, lo que quiere decir que dichas proteínas de estos plásmidos son funcionales in vivo. Los derivados de pHP161 sin *trwB* (pHP178 y pHP179) pueden complementar a un plásmido sin TrwC pero no el carente de TrwB; y

el derivado de pHP161 sin TrwC (pHP181) complementa la falta de TrwB pero no la de TrwC. Esto indicaría que ambos plásmidos no expresan el gen que le falta, y no está afectada la expresión de los genes adyacentes.

Cuando realizamos infecciones con estas nuevas construcciones, obtuvimos los resultados mostrados en la Figura 23: el plásmido pHP179 no se transfiere en absoluto, mientras que con pHP178 observábamos un nivel residual del 0,2% de células eGFP. Para aclarar la causa de la diferencia entre estas dos construcciones, analizamos los niveles de TrwB (datos no mostrados) y TrwC por Western blot (Figura 24). Ni pHP178 ni pHP179 producen TrwB, como era de esperar. Sin embargo, observamos que pHP179 apenas produce TrwC, por lo que la falta de movilización de DNA se podría deber más a la ausencia de TrwC que a la ausencia de TrwB. Por su parte, el plásmido pHP178 no expresa *trwB* pero sí *trwC*, como hubiéramos esperado en el caso anterior; así que hemos utilizado los datos obtenidos con pHP178 para determinar el efecto de la ausencia de TrwB en la transferencia de DNA.

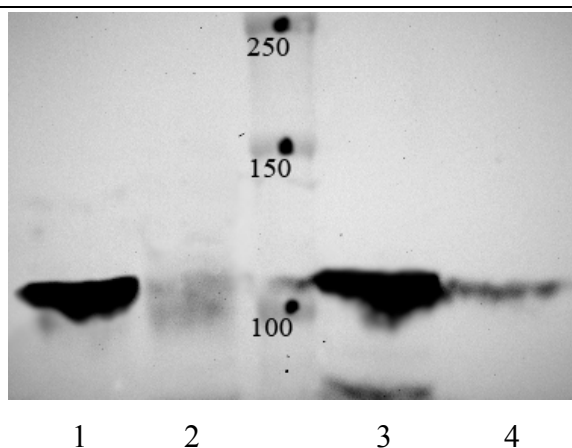


Figura 24. Western blot con Anti TrwC. En cada calle se corrieron extractos proteicos de *Ec* conteniendo los plásmidos indicados. Línea 1, *oriT trwABC*. Línea 2, *oriT trwAB*. Línea 3, *oriT trwAC* (pHP178). Línea 4, *oriT trwAC* (pHP179). Se indican los marcadores de peso molecular.

No hemos realizado ningún estudio adicional para indagar en las causas de la distinta expresión de *trwC* en ambos casos. Aunque parezca sorprendente que un plásmido con una producción tan deficiente de TrwC pueda complementar a otro plásmido que o bien no expresa TrwC o lo hace a niveles casi indetectables (ver Tabla

16), la cantidad de moléculas de TrwC requerida para la conjugación podría ser muy baja.

La Figura 25 resume los resultados de los ensayos de infección utilizando los plásmidos pHP161 como control positivo, pHP181 como control negativo sin TrwC, y pHP178 para ensayar el efecto de la ausencia de TrwB. Se observa que la ausencia de TrwB no abole del todo la movilización de DNA, aunque sí la disminuye drásticamente (unas 10 veces). El hecho de que en ausencia de TrwB exista cierto grado de transferencia podría deberse a que la proteína acopladora VirD4 del T4SS VirB de *Bartonella* pudiera estar ayudando a la movilización del DNA, bien a través del sistema Trw (que no tiene T4CP conocida) o a través del sistema VirB. Hay trabajos previos que demuestran que unas T4CP pueden suplir a otras en conjugación (Llosa *et al.*, 2003). Además, los efectores exportados por el sistema VirB son reconocidos por su T4SS, entre otras regiones, por una región Ct poco conservada y cargada positivamente (Schulein *et al.*, 2005), como es la de TrwC.

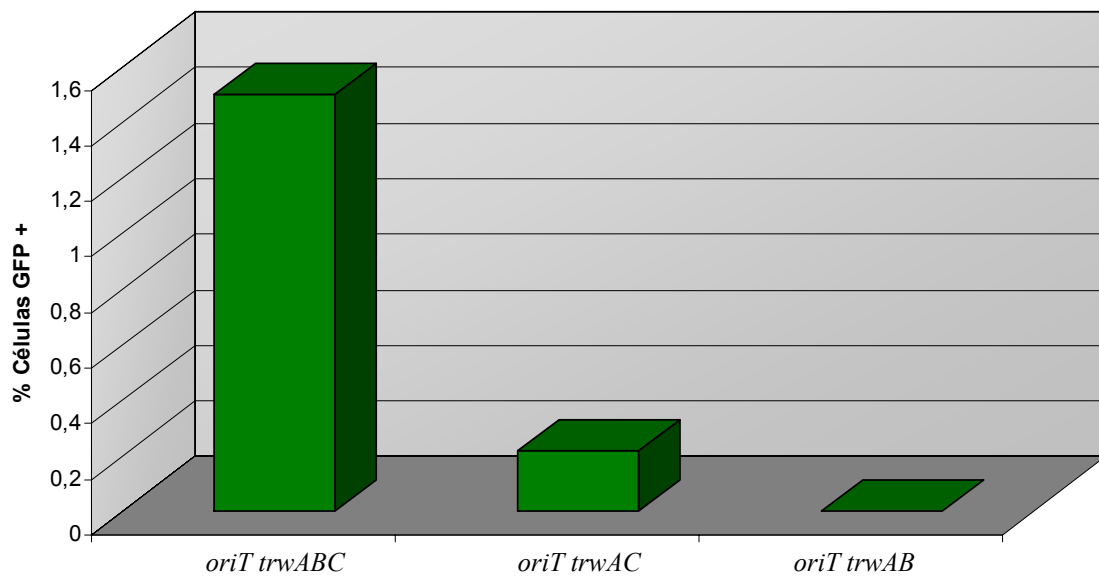


Figura 25. Representación gráfica del porcentaje de células eGFP + infectadas por *Bh* conteniendo los plásmidos pHP161, pHP178 y pHP181, que codifican los genes de R388 indicados en el eje de coordenadas.

En suma, nuestros datos muestran que transferencia de DNA a células humanas ocurre presumiblemente por conjugación, puesto que TrwC y TrwB juegan un papel

importante. TrwC es totalmente indispensable, mientras que sin TrwB hay cierto grado de transferencia, aunque la eficiencia cae 10 veces.

3.2.4. Implicación de los T4SS de *Bartonella* en la transferencia de DNA

Aunque hasta este momento siempre hemos especulado con la transferencia de DNA a través del sistema Trw de *Bartonella*, debido a su gran homología con el sistema Trw de plásmido R388, no hay que olvidar que estas bacterias tienen otro T4SS llamado VirB, que es el encargado de la translocación de numerosos efectores necesarios para la infección y supervivencia de la bacteria dentro de la célula (Schmid *et al.*, 2004). Por ello, realizamos una serie de ensayos utilizando distintas cepas de *B. henselae* cedidas por el Dr. C. Dehio (U. Basel, Suiza) que carecen de diversos componentes de los sistemas Trw o VirB y su proteína acopladora. Contamos con las siguientes cepas:

- *Bh* wt.
- *Bh* $\Delta trwE$; al faltarle TrwE, que es esencial (Seubert *et al.*, 2003), no forma un sistema Trw funcional.
- *Bh* $\Delta virB4$; al faltar VirB4, carece de un sistema VirB funcional (Schulein *et al.*, 2005).
- *Bh* $\Delta virB2-11$; carece de casi todas las proteínas que forman el T4SS VirB.
- *Bh* $\Delta trwE \Delta virB$; carece funcionalmente de los dos T4SS presentes en *Bt*.
- *Bh* $\Delta virD4$; presenta los dos T4SS pero sin la proteína acopladora del T4SS VirB.

Se realizaron ensayos de infección con todas las cepas descritas, en las que hemos introducido el plásmido pHP161 (*oriT+trwABC*). La Figura 26 muestra ejemplos representativos de las gráficas obtenidas en el citómetro de flujo, que representan tamaño frente a intensidad de eGFP. Cada una de las gráficas es obtenida una vez seleccionada la población de células infectadas (en base a tamaño y complejidad). La población P2, que marca las células positivas, se define a partir de la muestra de células sin infectar para establecer el background.

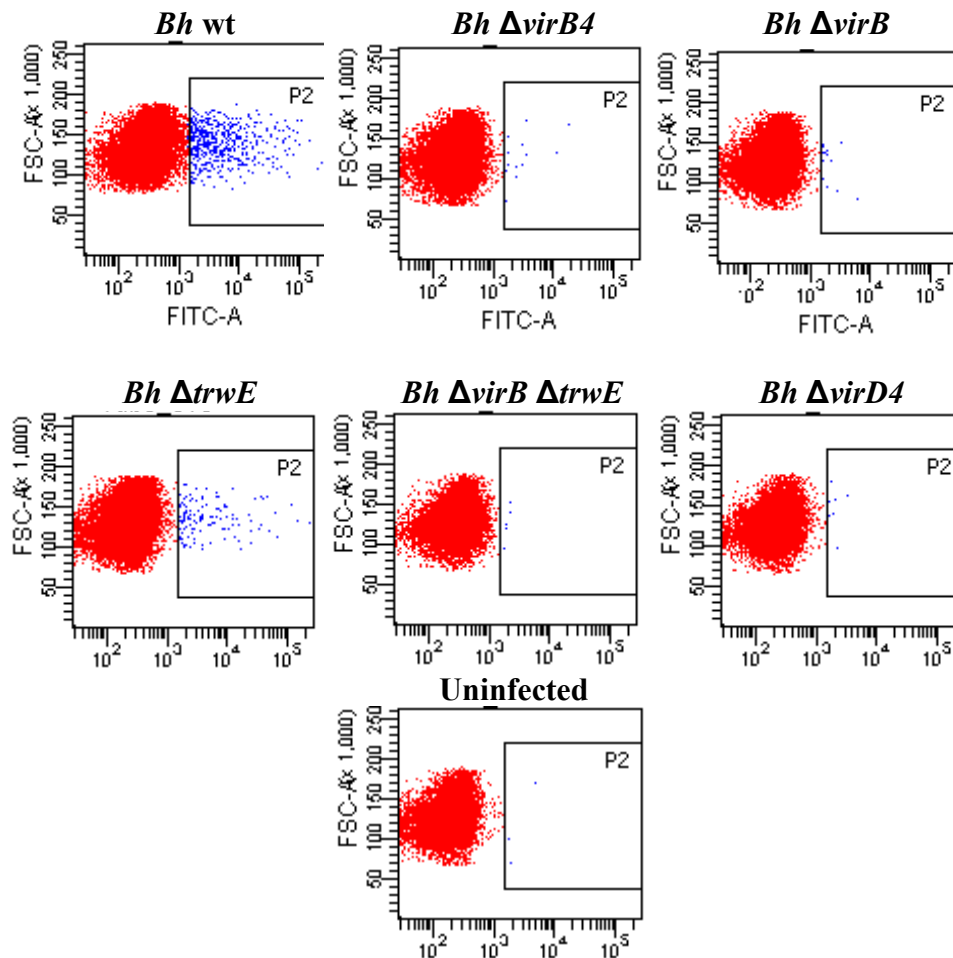


Figura 26. Imágenes de FACS representativas de las infecciones con las cepas de *Bh* que se indican, portando el plásmido pHP161.

Los resultados cuantitativos de estos ensayos están recopilados en la Figura 27. De estos datos podemos sacar varias conclusiones. La primera y más importante es que, en ausencia de los dos T4SS presentes en *Bartonella* (Trw y VirB), no existe transferencia de DNA de la bacteria a la célula, por lo que la transferencia de DNA se produce a través de alguno de los T4SS de *Bh*. Este dato es muy significativo, pues junto con el de la falta de transferencia en ausencia de TrwC, indica que el DNA es transferido mediante un proceso similar a la conjugación, pero en el que hemos sustituido el T4SS de la maquinaria conjugativa de R388 por el T4SS de un patógeno.

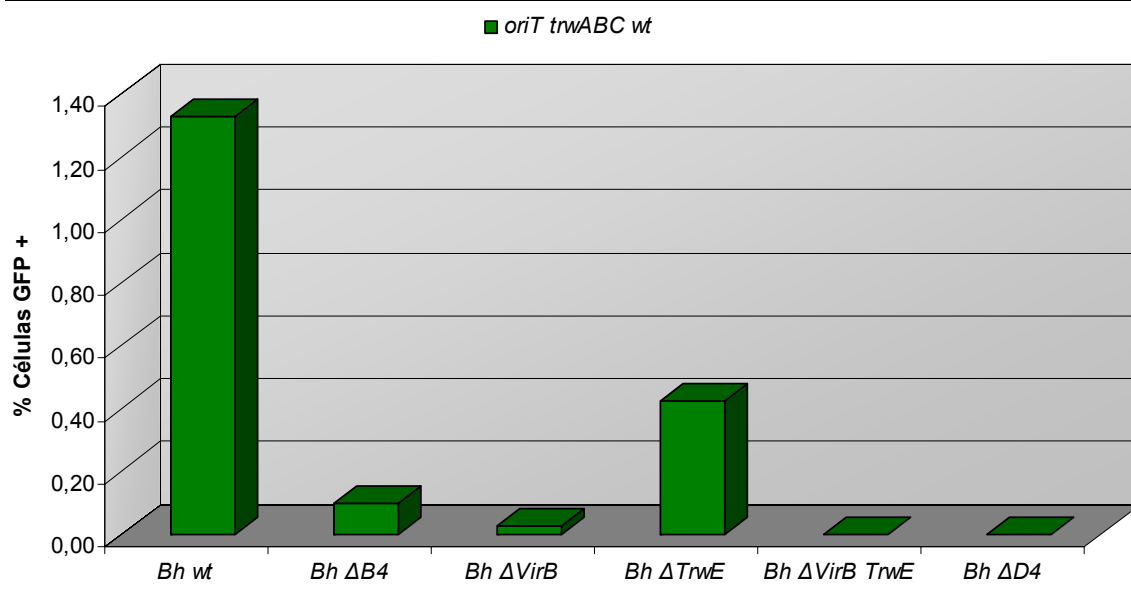


Figura 27. Representación gráfica del porcentaje de células, infectadas por las distintas cepas de *Bh* representadas en el eje de coordenadas, que son GFP +. Todas contienen el plásmido pHP161 (*oriT trwABC*)

Parece probable que la transferencia ocurra sólo a través del sistema VirB, ya que ante la falta de TrwE, y por tanto de un sistema Trw funcional, hay transferencia de DNA a niveles significativos, mientras que al faltar el sistema VirB no hay prácticamente transferencia. Sin embargo, la transferencia producida en ausencia de TrwE es bastante menor que la que se da en la cepa salvaje con los dos T4SS presentes (aproximadamente la tercera parte que en presencia de TrwE). Esto podría deberse a que exista de hecho transferencia de DNA por ambos T4SS, pero otra posible explicación es que, al no poder ensamblarse el resto de componentes Trw en un T4SS funcional, estas proteínas interfieren con las del sistema VirB, afectando su funcionalidad.

Si fuese VirB el único T4SS implicado en la transferencia del DNA, habría que explicar los niveles residuales de transferencia que aparecen en las cepas Δ Vir y Δ VirB4. En el primer caso, el nivel de transferencia es tan bajo que consideramos que podría deberse a la variabilidad propia del ensayo. Más llamativo es el segundo caso; en ausencia de VirB4, un elemento central del T4SS, hay niveles de transferencia del orden del 10% respecto al control positivo. En este caso, podría tratarse de una complementación funcional por parte de TrwK, el homólogo a VirB4 en el sistema Trw.

Mención aparte requiere la función de las proteínas acopladoras de ambos sistemas. Asumimos que será necesaria una proteína que reclute el sustrato y, al tratarse de DNA, que bombee la molécula hacia el exterior. Ambas funciones se atribuyen a TrwB en el sistema de R388. En *Bh*, el sistema Trw no tiene proteína acopladora conocida, mientras que el sistema VirB tiene la proteína VirD4, componente integral del T4SS. Sin embargo, este sistema está implicado en la secreción de proteínas, pero no hay indicio de que funcione como transportador de DNA. Como vemos en la Figura 27, existe un requerimiento absoluto de VirD4, que concordaría con la hipótesis de la transferencia a través del T4SS VirB. Sin embargo, como hemos visto anteriormente (Figuras 21 y 25), también hay una dependencia de TrwB en el transporte del DNA. Existiría la posibilidad de que ambas proteínas acopladoras formasen heterohexámeros funcionales. Pero nos parece más plausible que TrwB sea la proteína que está actuando como acopladora, reclutando el sustrato de R388 y bombeando el DNA. Resulta poco creíble que una proteína no implicada en el transporte de DNA, como es VirD4, realizase esta función. El requerimiento de VirD4 sería estructural, como integrante del T4SS Vir; y a diferencia de VirB4, su ausencia no podría ser suplida por ningún homólogo de otro T4SS.

En suma, nuestros resultados apoyan que la transferencia de DNA esté mediada exclusivamente, o al menos preferentemente, por el sistema VirB. Sin embargo, los datos no son concluyentes en este sentido. No podemos descartar que la transferencia ocurra mediante el sistema Trw, pero que la ausencia de VirB la afecte de otra manera. El sistema VirB/D4 es imprescindible para el transporte de efectores (Schulein et al., 2005), que provocan toda la cascada de respuestas en la célula, como reordenamientos en el citoesqueleto y la inhibición de la apoptosis celular; la ausencia de VirB y por tanto de secreción de estos efectores, comprometería el ciclo normal de *Bh* en la célula y podría afectar al funcionamiento del sistema Trw. En el caso de la cepa mutante *Bh* Δ TrwE, la transferencia podría observarse debido a una complementación funcional por su homólogo VirB10 de *Bh*.

En vista de que la transferencia podría estar mediada fundamentalmente por VirB, y que se ha descrito que los sustratos de VirB son reconocidos por una secuencia BID (Schulein *et al.*, 2005), decidimos ensayar un plásmido que codifica una proteína de fusión TrwC::BID (pLA25; Tabla 2 de Metodología) para ver si mejoraba la eficiencia

de transferencia al llevar TrwC una secuencia de transporte específica del sistema VirB. Se comprobó que la fusión TrwC-BID era funcional en conjugación a niveles similares a TrwC wt (datos no mostrados). Posteriormente, se realizaron ensayos de infección comparando la eficiencia de esta nueva construcción frente a la original que porta una TrwC wt (pHP161). Sin embargo, tal y como se representa en la Figura 28, al realizar las infecciones se observa de hecho una caída en la transferencia de DNA, a pesar de la presencia de esta secuencia de exportación.

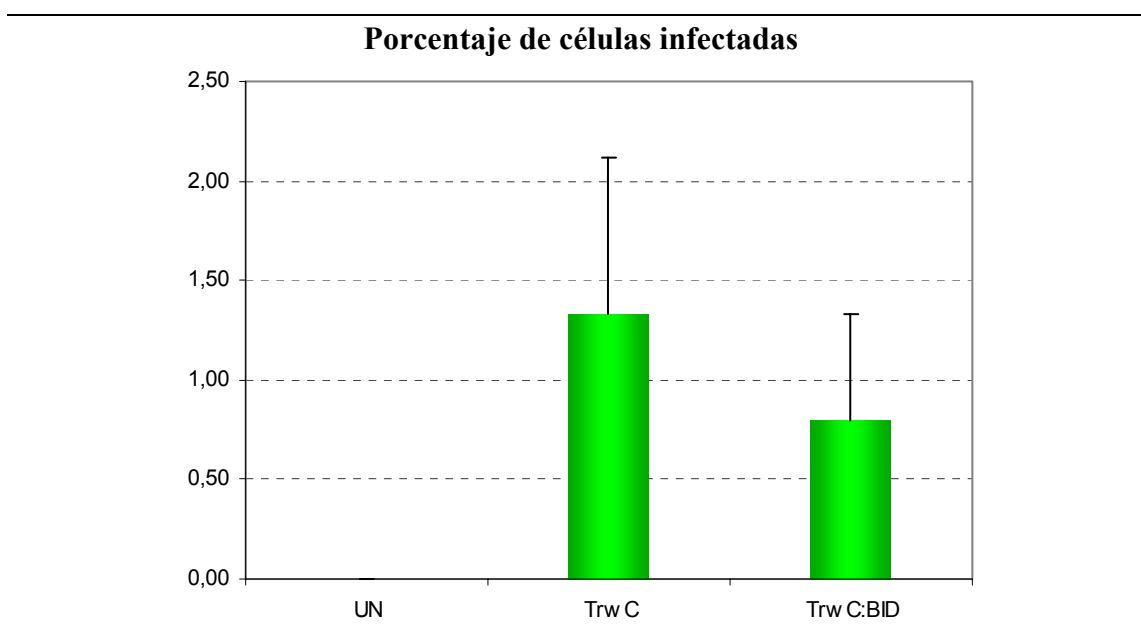


Figura 28. Representación gráfica de las medias del porcentaje de células que expresan GFP cuando la infección ha sido realizada con los plásmidos que expresan las construcciones indicadas en el eje de coordenadas. UN, células sin infectar. TrwC, células infectadas con *Bh* (pHP161)- TrwC: BID, células infectadas con *Bh* (pLA25).

Comprobamos la cantidad de TrwC y TrwC-BID por Western blot (Figura 29), y observamos que la construcción que codifica TrwC: BID (pLA25) produce niveles mucho más bajos de proteína que los plásmidos que codifican la proteína TrwC salvaje (pHP157: *oriT trwAB^VC* y pHP161: *oriT trwABC*). Esto podría deberse a que la proteína de fusión podría ser más inestable, y podría explicar la caída en el porcentaje de células eGFP + obtenidas.



Figura 29. Western blot con Anti TrwC. En cada calle se corrieron extractos proteicos de *Ec* conteniendo los plásmidos indicados. Línea 1, *oriT trwAB^{VC}*, línea 2, *oriT trwABC* y línea 3, *oriT trwABC::BID*. En esta última construcción, se observa que TrwC aumenta de tamaño debido a la secuencia BID.

Por lo tanto, mientras no contemos con una proteína de fusión estable, no podemos afirmar si la presencia de la secuencia BID mejoraría la transferencia de DNA a través del sistema VirB, aunque a la vista de nuestros datos, parece posible que se pueda mejorar la eficiencia de transferencia de DNA por esta vía.

5

RECAPITULACIÓN Y PERSPECTIVAS

RECAPITULACIÓN Y PERSPECTIVAS

Los sistemas de secreción tipo IV (T4SS) son una gran familia de sistemas de secreción que se encuentra ampliamente distribuidos entre las bacterias, y que presentan roles biológicos muy diferentes a pesar de la gran homología que comparten entre sí (Cascales & Christie, 2003).

Los T4SS tienen dos funciones principales en las bacterias: transportar DNA y transportar proteínas.

- a) Transporte de DNA. Aunque hay T4SS cuya función es importar o secretar DNA directamente a/del medio, el papel fundamental de los T4SS en cuanto al transporte de DNA lo realizan formando parte de la maquinaria de conjugación. La conjugación bacteriana tiene un gran impacto en la plasticidad genética de las bacterias, siendo responsable por ejemplo de la dispersión de resistencias a nuevos antibióticos entre las bacterias. Mención especial merece el caso del T4SS VirB de *Agrobacterium tumefaciens*, que transporta DNA de la bacteria a células vegetales por un mecanismo similar a la conjugación. Sin embargo, no se conoce ningún ejemplo similar de transferencia de DNA a células animales. Es intrigante pensar en el motivo por el cual, a lo largo de toda la evolución, no haya habido una adaptación como ésta, que sí ha ocurrido a otros niveles.

- b) Secreción de proteínas. Con la salvedad del paso de proteínas en bacterias por conjugación, estos sistemas envían proteínas – denominadas efectores - a células animales o vegetales, donde ejercen un papel en la interacción entre bacteria y célula eucariota; en la mayor parte de los casos, contribuyendo a la virulencia de la bacteria portadora del T4SS. La secreción de estos efectores puede ser al medio (o directamente al interior de la célula eucariota, por contacto directo entre la bacteria y la superficie de la célula o, en el caso de patógenos intracelulares, una vez dentro de la célula huésped).

Habría que mencionar, por último, que el caso del T4SS Trw de *Bartonella* spp. no se ajusta a ninguna de las categorías anteriores. Mientras no se encuentren sustratos translocados por este sistema, las evidencias apuntan a que, más que un sistema de secreción, este T4SS cumpliría un papel en la adhesión a la célula eucariota.

Es precisamente este último T4SS el que atrajo nuestro interés, debido a la gran homología (superior al 50% de media de identidad, a nivel de proteínas) que presenta con el T4SS Trw del plásmido conjugativo R388, a pesar de cumplir roles biológicos tan distintos. Esto nos llevó a abordar un estudio comparativo entre los T4SS Trw de *Bartonella tribocorum* (*Bt*) y de R388 (Capítulo 1 de Resultados), de tal manera que pudiéramos ahondar en las similitudes y diferencias entre estos dos T4SS, parientes cercanos evolutivos, que han adquirido funciones tan diferentes.

Dicha homología se da también en su organización genética. Nuestros resultados apoyan análisis previos que proponían que los genes que conforman el T4SS se encuentran organizados en dos operones diferentes (Seubert et al., 2003), sin contar TrwN, proteína que, al menos en condiciones de laboratorio, no es esencial para la funcionalidad del T4SS. El primer operón codifica los genes *trwL* a *trwI*, que incluyen los componentes periféricos del T4SS, tanto los que forman parte integral del pilus como los que están más directamente involucrados en su formación. Estos genes conservan una homología menor entre ambos sistemas (a excepción de TrwK). El hecho de que el pilus muy probablemente juegue un papel en el contacto de la bacteria con la célula huésped (Llosa et al., 2009) podría explicar que estos genes presenten una menor homología, ya que han ido adaptándose rápidamente a su célula diana. Por el contrario, el núcleo o “core complex” del T4SS lo componen los genes codificados en el segundo operón (desde *trwH* hasta *trwD*), que son los más conservados entre los distintos T4SS. En este trabajo se ha visto cómo son precisamente los elementos del “core-complex”, los más parecidos, los que pueden ser intercambiados entre el sistema Trw de R388 y *Bartonella*, tanto estructural como funcionalmente.

Estos resultados sugieren que la estructura central de un T4SS esté conservada y quizás pudiesen utilizarse combinaciones de T4SS para intercambiar sustratos. Sin embargo, al intentar movilizar entre bacterias el sustrato del T4SS Trw del sistema conjugativo del plásmido R388 a través del T4SS Trw del sistema patogénico de *Bt*,

utilizando tanto *E. coli* como la propia *Bartonella* como donadoras, no se obtuvieron resultados positivos. Esto podría deberse a varias causas:

- a) Una baja expresión del T4SS *trw* de *Bt*, ya que se ha descrito que la expresión de estos genes se induce en el interior de la célula eucariota (Seubert *et al.*, 2003). Sin embargo, los datos positivos obtenidos en las complementaciones sugieren que estos genes se expresan suficientemente en bacterias. Además, en las conjugaciones se utilizaron también como donadoras *Bt* intracelulares, que deberían tener por lo tanto sus genes *trw* expresados, obteniéndose los mismos resultados negativos.
- b) Un reclutamiento deficiente del sustrato de R388 por parte del T4SS de *Bt*. Por ello, desarrollamos un estudio más detallado de la proteína acopladora de R388 (Capítulo 2 de Resultados), que juega un papel central en la selección del sustrato, como resumimos a continuación.
- c) Que el T4SS de *Bt* sólo funcione en células humanas, por lo que abordamos la movilización de DNA de *Bartonella* a células humanas infectadas por la bacteria (Capítulo 3 de Resultados).

El papel de las proteínas acopladoras en la conjugación bacteriana es esencial tanto para establecer un puente entre el sustrato y el T4SS, como probablemente para el bombeo activo del DNA. Estudios previos habían demostrado cómo las proteínas acopladoras de los T4SS (T4CP) pueden utilizar distintos T4SS conjugativos, con una eficiencia que se correlaciona con la fuerza de la interacción de la T4CP con VirB10 (proteína que forma parte integral del T4SS) o sus homólogos (Llosa *et al.*, 2003). En este estudio hemos demostrado que TrwE (homóloga de VirB10) de *Bt* puede sustituir a TrwE de R388 en conjugación, lo que indica que además de una interacción proteica con TrwB, existe una complementación funcional.

Dada la importancia de la unión entre TrwB y TrwE para el reclutamiento de sustratos, realizamos una mutagénesis al azar seleccionando mutantes que presentasen una mayor interacción. De este modo, hemos determinado los residuos de TrwB y TrwE directamente implicados en la interacción entre ambos, situados en las regiones

transmembrana (TM) de ambas proteínas, como apuntaban estudios previos (Llosa *et al.*, 2003). Concretamente, tanto en TrwB como TrwE, ciertos residuos Prolina son los que parecen más relevantes, probablemente por su capacidad de modificar la conformación de las hélices α transmembranales (Sansom & Weinstein, 2000). Conocer los residuos directamente implicados en la interacción abriría la puerta para su manipulación y por lo tanto poder dirigir el reclutamiento de los sustratos por el T4SS.

Por otra parte, gracias a un extenso análisis mutacional del dominio citoplasmático de TrwB, hemos determinado que los residuos que con más probabilidad tienen un contacto directo con el sustrato son los de la región interna del canal de TrwB (a través del cual probablemente es bombeado el DNA) y la superficie citoplasmática cercana a la entrada de dicho canal. Se ha comenzado en nuestro grupo un análisis *in vitro* de mutantes seleccionados de TrwB para tratar de establecer qué funciones (ATPasa, unión a DNA, unión a TrwA y TrwC) se ven afectadas al alterar un residuo determinado.

Utilizando un modelo de infección con *Bartonella henselae* (*Bh*) de células humanas en cultivo, hemos demostrado que hay transferencia de DNA desde la bacteria hasta la célula huésped: aproximadamente un 1,5% de las células infectadas expresaban un marcador presente en un plásmido bacteriano que codifica también la región *Dtr* de R388. Mutantes de estos plásmidos donde no se expresa *trwB* (la proteína acopladora) o *trwC* (la relaxasa y proteína piloto) no son movilizados, lo que indica que la transferencia de DNA a células humanas a través de *Bh* ocurre por un proceso conjugativo; esto supone que el sustrato transferido sería un complejo covalente de la proteína TrwC con el DNA de cadena sencilla.

Se trata de la primera vez que se ve movilización conjugativa de DNA de bacterias a células humanas. Además, probablemente la eficacia de la transferencia de DNA esté subestimada, ya que lo que vemos en nuestros experimentos es la transferencia y la posterior expresión de eGFP. Si mirásemos la transferencia de la proteína piloto TrwC, la eficiencia podría ser mucho mayor. En este sentido, en nuestro laboratorio se están poniendo a punto ensayos de translocación de proteínas por fusión de TrwC a TEM, Cre, u otros dominios proteicos que permitan una selección directa en la célula eucariota.

Bh tiene dos T4SS: Trw, probablemente con función de anclaje a los eritrocitos, y VirB, que secreta efectores de la bacteria a la célula. Para determinar a través de qué T4SS de *Bartonella* tiene lugar la transferencia de derivados de R388, ensayamos una serie de mutantes de *Bh*, tanto del sistema VirB como del sistema Trw o de ambos. Los resultados obtenidos muestran cómo el mutante doble no es capaz de transferir DNA, confirmando que la transferencia efectivamente ocurre a través de un T4SS. En el caso del mutante sin TrwE existe una notable transferencia de DNA, si bien, la eficiencia se reduce aproximadamente a la mitad. Sin embargo, los mutantes del sistema VirB pierden prácticamente toda capacidad de movilizar DNA. En conjunto, los resultados parecen indicar que la movilización ocurre principalmente a través del sistema VirB. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que estos resultados se deban a la existencia de interacciones entre los restos de ambos sistemas.

Estos resultados son contrarios a lo que nosotros suponíamos que ocurriría, puesto que el sistema Trw de *Bartonella* y del plásmido conjugativo R388 están estrechamente relacionados, mientras que el sistema VirB de *Bartonella* no guarda una gran homología con el de R388. Sin embargo, sí es un resultado lógico, considerando que el sistema VirB tiene sustratos conocidos, mientras que el sistema Trw de *Bartonella*, sin sustratos ni T4CP conocida, se perfila más como una herramienta de contacto con la célula (Llosa et al., 2009).

La transferencia a través de VirB podría explicar los resultados obtenidos al utilizar mutantes de TrwB que presentaban una mayor interacción con TrwE *Bt*; esperábamos mejorar la eficacia de transferencia del DNA, como se había observado con T4SS conjugativos, y sin embargo, lo que observamos fue una disminución en la eficiencia de transferencia. En cualquier caso, esta disminución resalta el papel fundamental de TrwB y la importancia de los residuos mutados en el proceso de transferencia. Esto apoya nuestra propuesta de que sea TrwB la proteína que está funcionando como reclutadora del sustrato y transmisora del DNA, mientras que VirD4, la T4CP del sistema VirB, sea requerida por ser un componente estructural del T4SS Vir.

El entendimiento de las bases moleculares del reclutamiento de sustratos por T4SS involucrados en transferencia de DNA y en virulencia, abre las puertas en un futuro a

una nueva herramienta de modificación genética de células animales. En este trabajo hemos enviado DNA a células humanas específicas a través de un T4SS de *Bartonella*. Ampliar este estudio a los T4SS de otros patógenos y conseguir enviar DNA desde distintas bacterias patógenas presentaría grandes ventajas frente a otras técnicas de modificación genética de células animales:

- Por un lado, habría una especificidad de tejido según el patógeno utilizado. Así, hay patógenos que infectan principalmente células endoteliales como *Bartonella*, células del sistema inmune como *Brucella*, o células gástricas como *Helicobacter pylori*. Esto supondría una manera de tratar un tejido concreto sin afectar a otros.

- Además, dado el carácter procesivo del proceso conjugativo, el tamaño del DNA movilizado no supondría a priori ningún problema, a diferencia de lo que ocurre con las herramientas víricas, donde el tamaño de la cápsula vírica limita, y mucho, el tamaño del DNA que se puede introducir. Esto permitiría transferir genes humanos completos, incluso con sus propias secuencias reguladoras.

En resumen, los resultados de este trabajo dan información sobre el funcionamiento de T4SS involucrados en transferencia de DNA y virulencia, y han abierto la puerta a otros estudios que nos permitan una mayor comprensión de estos sistemas. Este trabajo propone que la similitud entre distintos T4SS puede traducirse en su manipulación para intercambiar sustratos, y como prueba de concepto, hemos conseguido movilizar DNA desde *Bartonella* a células humanas. Hemos demostrado que se trata de un proceso conjugativo que ocurre a través del T4SS de *B. henselae*. Quedan por resolver algunas cuestiones acerca del papel de ambos T4SS y de las T4CP en la movilización de DNA. En líneas futuras sería interesante establecer técnicas más sensibles que permitieran ver el paso de proteína TrwC, esté o no ligada al DNA. Estos métodos, presumiblemente más sensibles, nos permitirán determinar con mayor exactitud el papel de los distintos componentes de los T4SS involucrados en el proceso de secreción.

La utilización en concreto del sistema conjugativo de R388 tiene una ventaja adicional: la proteína piloto TrwC, que entra con el DNA covalentemente unido a la célula receptora, tiene actividad integrasa sitio-específica, siendo capaz de integrar el

DNA entrante en secuencias específicas. Varias son las secuencias encontradas en el genoma humano que presentan una gran homología a la secuencia diana donde TrwC realiza las reacciones de integración. A largo plazo, podría pensarse en desarrollar una herramienta de transferencia e integración sitio-específica en el genoma humano de DNA de cualquier origen y longitud. Esta sería una herramienta de gran valor en el campo de la terapia génica.

6

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Todos los genes *trw* de la región Mpf de R388, a excepción de *trwN* y *trwH*, son estrictamente necesarios para la conjugación del plásmido R388. Los genes *trwL-trwI* y *trwH-trwD* se agrupan en dos posibles unidades transcripcionales, denominadas operones 1 y 2 respectivamente, que reconstituyen la función conjugativa al ser expresados desde replicones diferentes.
2. Todos los genes del operón 2, y ninguno del operón 1, pueden ser sustituidos en conjugación por sus homólogos de *Bartonella tribocorum*.
3. Los niveles celulares de algunas proteínas Trw se ven afectados en ausencia de cualquier otra proteína del T4SS, sugiriendo la necesidad de un T4SS funcional para su estabilidad. TrwJ es indetectable en ausencia de cualquier otra proteína Trw. En el caso de TrwD, la ausencia de los componentes del “core-complex” del T4SS afecta mucho más a los niveles de proteína que la ausencia de los componentes del pilus. Por el contrario, tanto la cantidad de TrwK como de TrwC (la relaxasa conjugativa) no se ve afectada por la ausencia de ninguna de las otras proteínas del T4SS.
4. La cantidad de TrwJ se recupera hasta valores similares al wt, cuando la ausencia de alguna de las otras proteínas Trw es complementada por sus homólogas de *B. tribocorum*; concretamente, con las proteínas codificadas en el operón 2 y con TrwI.
5. Se han obtenido mutantes de TrwB y TrwE *Bt* que presentan una mayor interacción entre sí, sin afectar a su funcionalidad en conjugación. Los residuos mutados se encuentran casi todos en los segmentos transmembrana de ambas proteínas. Dentro de éstos, dos residuos Prolina aparecen mutados repetidamente, sugiriendo que podrían jugar un papel central en la interacción entre la proteína acopladora y el T4SS.
6. Los mutantes de TrwB que aumentan la interacción con TrwE *Bt*, también aumentan la fuerza de interacción entre monómeros de TrwB.

7. Se ha puesto a punto un ensayo de conjugación en el que la frecuencia de transferencia se correlaciona con la cantidad de TrwB.
8. Se ha caracterizado una colección de mutantes puntuales de TrwB. Los mutantes en residuos en contacto con el NTP o en su entorno anulan completamente la funcionalidad de TrwB en conjugación, y presentan un fuerte efecto dominante negativo. Mutaciones de cambio de carga en residuos situados en la superficie del dominio todo-alfa y en el interior del canal del hexámero de TrwB también afectan a la funcionalidad de la proteína.
9. Los mutantes de TrwB K136T y D158A, en contacto con el NTP, y la delección de los 12 residuos C-terminales, afectan a la oligomerización de la proteína, pero no a la interacción de ésta con el componente del T4SS TrwE.
10. Se ha puesto a punto un ensayo para detectar transferencia de DNA de bacterias a células humanas basado en la detección por citometría de flujo de la expresión de un casete eGFP que no es funcional en procariotas.
11. Existe transferencia de DNA desde *Bartonella henselae* a células EA.hy 926 humanas. Un 1-2% de las células infectadas con *B. henselae* portando un plásmido movilizable por conjugación con casete eGFP resultaron ser eGFP positivas.
12. Dicha transferencia de DNA está mediada tanto por la proteína acopladora TrwB como por la relaxasa TrwC de R388.
13. La transferencia de DNA es abolida en ausencia de los dos T4SS de *B. henselae*, confirmando que se trata de una transferencia de DNA mediada tanto por la maquinaria conjugativa de R388 como por el T4SS del patógeno.
14. Existe también una total dependencia de la proteína acopladora VirD4 del sistema VirB, aunque ignoramos si su papel en la transferencia del DNA será como proteína acopladora o como elemento estructural del T4SS.

15. Un mutante de *B. henselae* carente de los genes Vir muestra solo niveles residuales de expresión de eGFP, indicando que la transferencia está ocurriendo fundamentalmente a través del T4SS VirB, aunque no se puede descartar transferencia de DNA a través del T4SS Trw.

7

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, A.M., Gey van Pittius, N.C., Champion, P.A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., and Bitter, W. (2007) Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**: 883-891.
- Akeda, Y., and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.
- Alami, M., Trescher, D., Wu, L.F., and Muller, M. (2002) Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 20499-20503.
- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H.G., Brunner, J., and Muller, M. (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**: 937-946.
- Alegria, M.C., Souza, D.P., Andrade, M.O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C.H., da Silva, A.C., and Farah, C.S. (2005) Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* **187**: 2315-2325.
- Alvarez-Martinez, C.E., and Christie, P.J. (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808.
- Aly, K.A., and Baron, C. (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**: 3766-3775.
- Anderson, L.B., Hertzfel, A.V., and Das, A. (1996) *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8889-8894.
- Ansaldi, M., Bordi, C., Lepelletier, M., and Mejean, V. (1999) TorC apocytochrome negatively autoregulates the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 284-295.
- Arechaga, I., Pena, A., Zunzunegui, S., del Carmen Fernandez-Alonso, M., Rivas, G., and de la Cruz, F. (2008) ATPase activity and oligomeric state of TrwK, the VirB4 homologue of the plasmid R388 type IV secretion system. *J Bacteriol* **190**: 5472-5479.
- Arenas, G.N., Staskevich, A.S., Aballay, A., and Mayorga, L.S. (2000) Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* **68**: 4255-4263.
- Atmakuri, K., Ding, Z., and Christie, P.J. (2003) VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **49**: 1699-1713.
- Atmakuri, K., Cascales, E., and Christie, P.J. (2004) Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* **54**: 1199-1211.
- Backert, S., and Selbach, M. (2005) Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol* **13**: 476-484.

- Backert, S., and Meyer, T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**: 207-217.
- Backert, S., and Selbach, M. (2008) Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol*.
- Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., and Amieva, M.R. (2005) *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16339-16344.
- Ball, G., Chapon-Herve, V., Bleves, S., Michel, G., and Bally, M. (1999) Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 382-388.
- Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., and Zambryski, P.C. (1997a) VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, is processed to a C-terminal secreted product, VirB1. *J Bacteriol* **179**: 1203-1210.
- Baron, C., Thorstenson, Y.R., and Zambryski, P.C. (1997b) The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **179**: 1211-1218.
- Baron, C. (2006) VirB8: a conserved type IV secretion system assembly factor and drug target. *Biochem Cell Biol* **84**: 890-899.
- Bartolome, B., Jubete, Y., Martinez, E., and de la Cruz, F. (1991) Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**: 75-78.
- 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.
- Bath, J., Wu, L.J., Errington, J., and Wang, J.C. (2000) Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum. *Science* **290**: 995-997.
- Bayer, M., Iberer, R., Bischof, K., Rassi, E., Stabentheiner, E., Zellnig, G., and Koraimann, G. (2001) Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *J Bacteriol* **183**: 3176-3183.
- Beijersbergen, A., Smith, S.J., and Hooykaas, P.J. (1994) Localization and topology of VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **32**: 212-218.
- Beranek, A., Zettl, M., Lorenzoni, K., Schauer, A., Manhart, M., and Koraimann, G. (2004) Thirty-eight C-terminal amino acids of the coupling protein TraD of the F-like conjugative resistance plasmid R1 are required and sufficient to confer binding to the substrate selector protein TraM. *J Bacteriol* **186**: 6999-7006.
- Berger, B.R., 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.
- Berger, B.R., and Christie, P.J. (1994) Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *J Bacteriol* **176**: 3646-3660.
- Berks, B.C., Palmer, T., and Sargent, F. (2003) The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv Microb Physiol* **47**: 187-254.
- Bernstein, H.D. (2007) Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends Microbiol* **15**: 441-447.
- Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lindenstrauss, U., Lunsdorf, H., Hause, G., and Bruser, T. (2008) Recombinant expression of tatABC and tatAC results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **283**: 25281-25289.

- Bitter, W. (2003) Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**: 307-314.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., and Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* **39**: 652-663.
- Bolland, S., Llosa, M., Avila, P., and de la Cruz, F. (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.
- Boyer, P.D. (1993) The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* **1140**: 215-250.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bradley, D.E. (1980) Morphological and serological relationships of conjugative pili. *Plasmid* **4**: 155-169.
- Broothaerts, W., Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L.M., Yang, W., Mayer, J.E., Roa-Rodriguez, C., and Jefferson, R.A. (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* **433**: 629-633.
- Burns, D.L. (1999) Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* **2**: 25-29.
- Cabezon, E., Sastre, J.I., and de la Cruz, F. (1997) Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet* **254**: 400-406.
- Cabezon, E., and de la Cruz, F. (2006) TrwB: an F(1)-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Res Microbiol* **157**: 299-305.
- Cambronne, E.D., and Roy, C.R. (2006) Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems. *Traffic* **7**: 929-939.
- Cambronne, E.D., and Roy, C.R. (2007) The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog* **3**: e188.
- Cao, T.B., and Saier, M.H., 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 Christie, P.J. (2004a) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**: 1170-1173.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2004b) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17228-17233.
- César, C.E. (2006) Caracterización de la reacción de recombinación sitio-específica catalizada por la relaxasa conjugativa TrwC. In *Departamento de Biología Molecular Santander*: Universidad de Cantabria, pp. 180.
- Covacci, A., and Rappuoli, R. (1993) Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol Microbiol* **8**: 429-434.
- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**: 1328-1333.
- Crabtree, J.E., Kersulyte, D., Li, S.D., Lindley, I.J., and Berg, D.E. (1999) Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. *J Clin Pathol* **52**: 653-657.
- Cristobal, S., de Gier, J.W., Nielsen, H., and von Heijne, G. (1999) Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *Embo J* **18**: 2982-2990.

- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., and Waksman, G. (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* **462**: 1011-1015.
- Chen, J., de Felipe, K.S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G., and Shuman, H.A. (2004) Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**: 1358-1361.
- Chen, L., Li, C.M., and Nester, E.W. (2000) Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of virB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7545-7550.
- Chen, L., Chen, Y., Wood, D.W., and Nester, E.W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **184**: 4838-4845.
- Chen, Y., Zhang, X., Manias, D., Yeo, H.J., Dunny, G.M., and Christie, P.J. (2008) *Enterococcus faecalis* PcfC, a spatially localized substrate receptor for type IV secretion of the pCF10 transfer intermediate. *J Bacteriol* **190**: 3632-3645.
- Cho, N.H., Kim, H.R., Lee, J.H., Kim, S.Y., Kim, J., Cha, S., Kim, S.Y., Darby, A.C., Fuxelius, H.H., Yin, J., Kim, J.H., Kim, J., Lee, S.J., Koh, Y.S., Jang, W.J., Park, K.H., Andersson, S.G., Choi, M.S., and Kim, I.S. (2007) The *Orientia tsutsugamushi* genome reveals massive proliferation of conjugative type IV secretion system and host-cell interaction genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7981-7986.
- Choi, K.H., and Kim, K.J. (2009) Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J Microbiol Biotechnol* **19**: 217-228.
- Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Breitschwerdt, E.B., Kasten, R.W., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R.J., Koehler, J.E., and Dehio, C. (2009) Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res* **40**: 29.
- Christie, P.J., and Vogel, J.P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**: 354-360.
- 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.
- Chung, C.T., and Miller, R.H. (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 3580.
- 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.
- Das, A., Anderson, L.B., and Xie, Y.H. (1997) Delineation of the interaction domains of *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 by use of the yeast two-hybrid assay. *J Bacteriol* **179**: 3404-3409.
- Das, A., and Xie, Y.H. (2000) The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol* **182**: 758-763.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- de Jong, M.F., Sun, Y.H., den Hartigh, A.B., van Dijl, J.M., and Tsolis, R.M. (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **70**: 1378-1396.

- de Keyzer, J., van der Does, C., and Driessen, A.J. (2003) The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2034-2052.
- de Paz, H.D., Sangari, F.J., Bolland, S., Garcia-Lobo, J.M., Dehio, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005) Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151**: 3505-3516.
- de Paz, H.D., Larrea, D., Zunzunegui, S., Dehio, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2010) Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. *Submitted for publication to J Bacteriology*.
- Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H., and Lanz, C. (1997) Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* **110** (Pt 18): 2141-2154.
- Dehio, C. (2003) Recent progress in understanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. *Curr Opin Microbiol* **6**: 61-65.
- Dehio, C. (2004) Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **58**: 365-390.
- Dehio, C. (2005) *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol* **3**: 621-631.
- Dehio, C. (2008) Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* **10**: 1591-1598.
- den Hartigh, A.B., Sun, Y.H., Sondervan, D., Heuvelmans, N., Reinders, M.O., Ficht, T.A., and Tsolis, R.M. (2004) Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* **72**: 5143-5149.
- Desvaux, M., Cooper, L.M., Filenko, N.A., Scott-Tucker, A., Turner, S.M., Cole, J.A., and Henderson, I.R. (2006) The unusual extended signal peptide region of the type V secretion system is phylogenetically restricted. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 22-30.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Draper, O., Cesar, C.E., Machon, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16385-16390.
- Draskovic, I., and Dubnau, D. (2005) Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Mol Microbiol* **55**: 881-896.
- Duckely, M., Oomen, C., Axthelm, F., Van Gelder, P., Waksman, G., and Engel, A. (2005) The VirE1VirE2 complex of *Agrobacterium tumefaciens* interacts with single-stranded DNA and forms channels. *Mol Microbiol* **58**: 1130-1142.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J.N., and Filloux, A. (2003) Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* **185**: 2749-2758.
- Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kurner, J., Bernadac, A., and Filloux, A. (2005) XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus. *J Biol Chem* **280**: 31378-31389.
- Edqvist, P.J., Aili, M., Liu, J., and Francis, M.S. (2007) Minimal YopB and YopD translocator secretion by *Yersinia* is sufficient for Yop-effector delivery into target cells. *Microbes Infect* **9**: 224-233.

- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lai, E.M., Lurz, R., Kado, C.I., and Lanka, E. (1999) Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem* **274**: 22548-22555.
- Errington, J., Bath, J., and Wu, L.J. (2001) DNA transport in bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 538-545.
- Farizo, K.M., Cafarella, T.G., and Burns, D.L. (1996) Evidence for a ninth gene, pttII, in the locus encoding the pertussis toxin secretion system of *Bordetella pertussis* and formation of a PttII-PttIF complex. *J Biol Chem* **271**: 31643-31649.
- Farizo, K.M., Huang, T., and Burns, D.L. (2000) Importance of holotoxin assembly in PttI-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **68**: 4049-4054.
- Feldman, M.F., Muller, S., Wuest, E., and Cornelis, G.R. (2002) SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* **46**: 1183-1197.
- Fernandez-Lopez, R., Garcillan-Barcia, M.P., Revilla, C., Lazaro, M., Vielva, L., and de la Cruz, F. (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942-966.
- Fields, K.A., Plano, G.V., and Straley, S.C. (1994) A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **176**: 569-579.
- Filloux, A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 163-179.
- Filloux, A., Hachani, A., and Bleves, S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**: 1570-1583.
- Fisher, A.C., and DeLisa, M.P. (2004) A little help from my friends: quality control of presecretory proteins in bacteria. *J Bacteriol* **186**: 7467-7473.
- Frank, A.C., Alsmark, C.M., Thollesson, M., and Andersson, S.G. (2005) Functional divergence and horizontal transfer of type IV secretion systems. *Mol Biol Evol* **22**: 1325-1336.
- Fronzes, R., Schafer, 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.
- Fuhrmann, O., Arvand, M., Gohler, A., Schmid, M., Krull, M., Hippenstiel, S., Seybold, J., Dehio, C., and Suttorp, N. (2001) *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect Immun* **69**: 5088-5097.
- Garcillan-Barcia, M.P., Jurado, P., Gonzalez-Perez, B., Moncalian, G., Fernandez, L.A., and de la Cruz, F. (2007) Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. *Mol Microbiol* **63**: 404-416.
- Gilmour, M.W., Lawley, T.D., Rooker, M.M., Newnham, P.J., and Taylor, D.E. (2001) Cellular location and temperature-dependent assembly of IncHI1 plasmid R27-encoded TrhC-associated conjugative transfer protein complexes. *Mol Microbiol* **42**: 705-715.
- Gilmour, M.W., Gunton, J.E., Lawley, T.D., and Taylor, D.E. (2003) Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol Microbiol* **49**: 105-116.

- Gomis-Ruth, F.X., and Coll, M. (2001) Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation. *Int J Biochem Cell Biol* **33**: 839-843.
- Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., and Coll, M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**: 637-641.
- Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., de la Cruz, F., and Coll, M. (2002) Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol Chem* **277**: 7556-7566.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B.S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., and Slater, S. (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2323-2328.
- Gophna, U., Ron, E.Z., and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- Grahn, A.M., Haase, J., Bamford, D.H., and Lanka, E. (2000) Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. *J Bacteriol* **182**: 1564-1574.
- Grandoso, G., Llosa, M., Zabala, J.C., and de la Cruz, F. (1994) Purification and biochemical characterization of TrwC, the helicase involved in plasmid R388 conjugal DNA transfer. *Eur J Biochem* **226**: 403-412.
- Grandoso, G., Avila, P., Cayon, A., Hernando, M.A., Llosa, M., and de la Cruz, F. (2000) Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **295**: 1163-1172.
- Graubner, W., Schierhorn, A., and Bruser, T. (2007) DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J Biol Chem* **282**: 7116-7124.
- Gray, L., Mackman, N., Nicaud, J.M., and Holland, I.B. (1986) The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **205**: 127-133.
- Guasch, A., Lucas, M., Moncalian, G., Cabezas, M., Perez-Luque, R., Gomis-Ruth, F.X., de la Cruz, F., and Coll, M. (2003) Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nat Struct Biol* **10**: 1002-1010.
- Gunton, J.E., Gilmour, M.W., Alonso, G., and Taylor, D.E. (2005) Subcellular localization and functional domains of the coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology* **151**: 3549-3561.
- Haase, J., Lurz, R., Grahn, A.M., Bamford, D.H., and Lanka, E. (1995) Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex. *J Bacteriol* **177**: 4779-4791.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., and Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.

- Haft, R.J., Gachelet, E.G., Nguyen, T., Toussaint, L., Chivian, D., and Traxler, B. (2007) In vivo oligomerization of the F conjugative coupling protein TraD. *J Bacteriol* **189**: 6626-6634.
- Halter, R., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1984) IgA protease of *Neisseria gonorrhoeae*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *Embo J* **3**: 1595-1601.
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P.C., and Baron, C. (2000) VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **182**: 4505-4511.
- Hegde, R.S., and Bernstein, H.D. (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* **31**: 563-571.
- Heidtman, M., Chen, E.J., Moy, M.Y., and Isberg, R.R. (2009) Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol* **11**: 230-248.
- Heinemann, J.A., and Sprague, G.F., Jr. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**: 205-209.
- Henderson, I.R., Cappello, R., and Nataro, J.P. (2000a) Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol* **8**: 529-532.
- Henderson, I.R., Nataro, J.P., Kaper, J.B., Meyer, T.F., Farrand, S.K., Burns, D.L., Finlay, B.B., and St Geme, J.W., 3rd (2000b) Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* **8**: 352.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Puls, J., Plano, G.V., Haas, R., and Fischer, W. (2006) A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol* **59**: 1624-1637.
- Hoppner, C., Liu, Z., Domke, N., Binns, A.N., and Baron, C. (2004) VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **186**: 1415-1422.
- Hormaeche, I., Segura, R.L., Vecino, A.J., Goni, F.M., de la Cruz, F., and Alkorta, I. (2006) The transmembrane domain provides nucleotide binding specificity to the bacterial conjugation protein TrwB. *FEBS Lett* **580**: 3075-3082.
- Hwang, H.H., and Gelvin, S.B. (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell* **16**: 3148-3167.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**: 306-313.
- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V., and Christie, P.J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J Bacteriol* **185**: 2867-2878.
- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E., and Christie, P.J. (2004) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System. *J Mol Biol* **341**: 961-977.
- Jakubowski, S.J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V., and Christie, P.J. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol* **187**: 3486-3495.

- Jakubowski, S.J., Kerr, J.E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G., and Christie, P.J. (2009) Agrobacterium VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol Microbiol* **71**: 779-794.
- Jones, A.L., Shirasu, K., and Kado, C.I. (1994) The product of the virB4 gene of Agrobacterium tumefaciens promotes accumulation of VirB3 protein. *J Bacteriol* **176**: 5255-5261.
- Jose, J., Jahnig, F., and Meyer, T.F. (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* **18**: 378-380.
- Judd, P.K., Kumar, R.B., and Das, A. (2005a) Spatial location and requirements for the assembly of the Agrobacterium tumefaciens type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11498-11503.
- Judd, P.K., Kumar, R.B., and Das, A. (2005b) The type IV secretion apparatus protein VirB6 of Agrobacterium tumefaciens localizes to a cell pole. *Mol Microbiol* **55**: 115-124.
- Judd, P.K., Mahli, D., and Das, A. (2005c) Molecular characterization of the Agrobacterium tumefaciens DNA transfer protein VirB6. *Microbiology* **151**: 3483-3492.
- Kalkum, M., Eisenbrandt, R., and Lanka, E. (2004) Protein circlets as sex pilus subunits. *Curr Protein Pept Sci* **5**: 417-424.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.
- Karnholz, A., Hoefler, C., Odenbreit, S., Fischer, W., Hofreuter, D., and Haas, R. (2006) Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in Helicobacter pylori. *J Bacteriol* **188**: 882-893.
- Kirby, J.E., and Nekorchuk, D.M. (2002) Bartonella-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4656-4661.
- Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1990) Extracellular transport of cholera toxin B subunit using Neisseria IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *Embo J* **9**: 1991-1999.
- Koesling, J., Aebischer, T., Falch, C., Schulein, R., and Dehio, C. (2001) Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by the intraerythrocytic mouse pathogen Bartonella grahamii. *J Immunol* **167**: 11-14.
- Komano, T., Yoshida, T., Narahara, K., and Furuya, N. (2000) The transfer region of IncII plasmid R64: similarities between R64 tra and legionella icm/dot genes. *Mol Microbiol* **35**: 1348-1359.
- Koraimann, G. (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2371-2388.
- Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N., and Baron, C. (2002) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of Agrobacterium tumefaciens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11405-11410.
- Krause, S., Barcena, M., Pansegrau, W., Lurz, R., Carazo, J.M., and Lanka, E. (2000a) Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori share similar hexameric ring structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3067-3072.
- Krause, S., Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F., and Lanka, E. (2000b) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of

- plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol* **182**: 2761-2770.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., and Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kumar, R.B., Xie, Y.H., and Das, A. (2000) Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol Microbiol* **36**: 608-617.
- Kumar, R.B., and Das, A. (2002) Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol Microbiol* **43**: 1523-1532.
- Lai, E.M., and Kado, C.I. (1998) Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**: 2711-2717.
- Lai, E.M., and Kado, C.I. (2000) The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol* **8**: 361-369.
- Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J., and Frost, L.S. (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 1-15.
- Le Rhun, D., Malou, N., Labed, S., Le Naour, E., and Vayssier-Taussat, M. (2009) In vitro effect of *Bartonella birtlesii* on mouse red cell viability. *Clin Microbiol Infect*.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001) A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**: 56-65.
- Lee, P.A., Orriss, G.L., Buchanan, G., Greene, N.P., Bond, P.J., Punginelli, C., Jack, R.L., Sansom, M.S., Berks, B.C., and Palmer, T. (2006) Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component. *J Biol Chem* **281**: 34072-34085.
- Liu, Z., and Binns, A.N. (2003) Functional subsets of the virB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in virB-mediated conjugal transfer of plasmid RSF1010. *J Bacteriol* **185**: 3259-3269.
- Luirink, J., and Sinning, I. (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 17-35.
- Llosa, M., Bolland, S., and de la Cruz, F. (1991) Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Mol Gen Genet* **226**: 473-483.
- Llosa, M., Bolland, S., and de la Cruz, F. (1994a) Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* **235**: 448-464.
- Llosa, M., Bolland, S., Grandoso, G., and de la Cruz, F. (1994b) Conjugation-independent, site-specific recombination at the *oriT* of the IncW plasmid R388 mediated by TrwC. *J Bacteriol* **176**: 3210-3217.
- Llosa, M., Grandoso, G., and de la Cruz, F. (1995) Nicking activity of TrwC directed against the origin of transfer of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* **246**: 54-62.
- Llosa, M., Grandoso, G., Hernando, M.A., and de la Cruz, F. (1996) Functional domains in protein TrwC of plasmid R388: dissected DNA strand transferase and DNA helicase activities reconstitute protein function. *J Mol Biol* **264**: 56-67.
- Llosa, M., Gomis-Ruth, F.X., Coll, M., and de la Cruz Fd, F. (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**: 1-8.

- Llosa, M., Zunzunegui, S., and de la Cruz, F. (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10465-10470.
- Llosa, M., and de la Cruz, F. (2005) Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res Microbiol* **156**: 1-6.
- Llosa, M., Roy, C., and Dehio, C. (2009) Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol*.
- Machon, C., Rivas, S., Albert, A., Goni, F.M., and de la Cruz, F. (2002) TrwD, the hexameric traffic ATPase encoded by plasmid R388, induces membrane destabilization and hemifusion of lipid vesicles. *J Bacteriol* **184**: 1661-1668.
- Maher, D., Sherburne, R., and Taylor, D.E. (1993) H-pilus assembly kinetics determined by electron microscopy. *J Bacteriol* **175**: 2175-2183.
- Mavris, M., Saenz, H., Monteil, M., Boulouis, H.J., Dehio, C., and Vayssier-Taussat, M. (2005) Characterization of genes involved in long-term bacteremia in mice by *Bartonella birtlesii*. *Ann N Y Acad Sci* **1063**: 312-314.
- Michiels, J., Dirix, G., Vanderleyden, J., and Xi, C. (2001) Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* **9**: 164-168.
- Middleton, R., Sjolander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J., and Zambryski, P. (2005) Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1685-1690.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298.
- Moncalian, G., Grandoso, G., Llosa, M., and de la Cruz, F. (1997) oriT-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **270**: 188-200.
- Moncalian, G., Cabezon, E., Alkorta, I., Valle, M., Moro, F., Valpuesta, J.M., Goni, F.M., and de La Cruz, F. (1999a) Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J Biol Chem* **274**: 36117-36124.
- Moncalian, G., Valle, M., Valpuesta, J.M., and de la Cruz, F. (1999b) IHF protein inhibits cleavage but not assembly of plasmid R388 relaxosomes. *Mol Microbiol* **31**: 1643-1652.
- More, M.I., Pohlman, R.F., and Winans, S.C. (1996) Genes encoding the pKM101 conjugal mating pore are negatively regulated by the plasmid-encoded KorA and KorB proteins. *J Bacteriol* **178**: 4392-4399.
- Mushegian, A.R., Fullner, K.J., Koonin, E.V., and Nester, E.W. (1996) A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7321-7326.
- Nagai, H., and Roy, C.R. (2003) Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell Microbiol* **5**: 373-383.
- Nystedt, B., Frank, A.C., Thollesson, M., and Andersson, S.G. (2008) Diversifying selection and concerted evolution of a type IV secretion system in *Bartonella*. *Mol Biol Evol* **25**: 287-300.
- O'Callaghan, D., Cazevielle, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and Ramuz, M. (1999) A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV

- secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* **33**: 1210-1220.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**: 1497-1500.
- Padmalayam, I., Karem, K., Baumstark, B., and Massung, R. (2000) The gene encoding the 17-kDa antigen of *Bartonella henselae* is located within a cluster of genes homologous to the *virB* virulence operon. *DNA Cell Biol* **19**: 377-382.
- Paschos, A., Patey, G., Sivanesan, D., Gao, C., Bayliss, R., Waksman, G., O'Callaghan, D., and Baron, C. (2006) Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7252-7257.
- Patey, G., Qi, Z., Bourg, G., Baron, C., and O'Callaghan, D. (2006) Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* VirB8 and a pSB102 VirB8 homologue allows heterologous complementation. *Infect Immun* **74**: 4945-4949.
- Perez-Martinez, I., Zhao, Y., Murillo, J., Sundin, G.W., and Ramos, C. (2008) Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *J Bacteriol* **190**: 625-635.
- 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.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15508-15513.
- Rabel, C., Grahn, A.M., Lurz, R., and Lanka, E. (2003) The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *J Bacteriol* **185**: 1045-1058.
- Randall, L.L., and Hardy, S.J. (2002) SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1617-1623.
- Recchia, G.D., Aroyo, M., Wolf, D., Blakely, G., and Sherratt, D.J. (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *Embo J* **18**: 5724-5734.
- Resto-Ruiz, S.I., Schmiederer, M., Sweger, D., Newton, C., Klein, T.W., Friedman, H., and Anderson, B.E. (2002) Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* **70**: 4564-4570.
- Rhomberg, T.A., Truttmann, M.C., Guye, P., Ellner, Y., and Dehio, C. (2009) A translocated protein of *Bartonella henselae* interferes with endocytic uptake of individual bacteria and triggers uptake of large bacterial aggregates via the invasome. *Cell Microbiol* **11**: 927-945.
- Rivas, S., Bolland, S., Cabezon, E., Goni, F.M., and de la Cruz, F. (1997) TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. *J Biol Chem* **272**: 25583-25590.
- Saenz, H.L., Engel, P., Stoeckli, M.C., Lanz, C., Raddatz, G., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R., Schuster, S.C., and Dehio, C. (2007) Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. *Nat Genet* **39**: 1469-1476.

- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., and Christie, P.J. (2001) Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J Bacteriol* **183**: 5813-5825.
- Sandler, S.J., and Clark, A.J. (1990) Factors affecting expression of the *recF* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene* **86**: 35-43.
- Sansom, M.S., and Weinstein, H. (2000) Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol Sci* **21**: 445-451.
- Sastre, J.I. (1996) El extremo carboxilo de la proteína TraD del plásmido F confiere especificidad y eficiencia en el proceso de la conjugación.
- . In
Universidad de Cantabria.
- Sastre, J.I., Cabezon, E., and de la Cruz, F. (1998) The carboxyl terminus of protein TraD adds specificity and efficiency to F-plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol* **180**: 6039-6042.
- Schandel, K.A., Muller, M.M., and Webster, R.E. (1992) Localization of TraC, a protein involved in assembly of the F conjugative pilus. *J Bacteriol* **174**: 3800-3806.
- Scheiffele, P., Pansegrau, W., and Lanka, E. (1995) Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA in vitro. *J Biol Chem* **270**: 1269-1276.
- Schmid, M.C., Schulein, R., Dehio, M., Denecker, G., Carena, I., and Dehio, C. (2004) The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol Microbiol* **52**: 81-92.
- Schmid, M.C., Scheidegger, F., Dehio, M., Balmelle-Devaux, N., Schulein, R., Guye, P., Chennakesava, C.S., Biedermann, B., and Dehio, C. (2006) A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS Pathog* **2**: e115.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P.C., and Baron, C. (1999a) Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **181**: 7485-7492.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., and Baron, C. (1999b) TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5563-5571.
- Schmiederer, M., and Anderson, B. (2000) Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. *DNA Cell Biol* **19**: 141-147.
- Schroder, G., and Lanka, E. (2003) TraG-like proteins of type IV secretion systems: functional dissection of the multiple activities of TraG (RP4) and TrwB (R388). *J Bacteriol* **185**: 4371-4381.
- Schroder, G., and Dehio, C. (2005) Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends Microbiol* **13**: 336-342.
- Schulein, R., Seubert, A., Gille, C., Lanz, C., Hansmann, Y., Piemont, Y., and Dehio, C. (2001) Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med* **193**: 1077-1086.

- Schulein, R., and Dehio, C. (2002) The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol Microbiol* **46**: 1053-1067.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C., Carena, I., and Dehio, C. (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 856-861.
- Segal, G., and Shuman, H.A. (1999) *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* **67**: 2117-2124.
- Seubert, A., Falch, C., Birtles, R.J., Schulein, R., and Dehio, C. (2003a) Characterization of the cryptic plasmid pBGR1 from *Bartonella grahamii* and construction of a versatile *Escherichia coli*-*Bartonella* spp. shuttle cloning vector. *Plasmid* **49**: 44-52.
- Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F., and Dehio, C. (2003b) A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**: 1253-1266.
- Shamaei-Tousi, A., Cahill, R., and Frankel, G. (2004) Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* **186**: 4796-4801.
- Shan, S.O., and Walter, P. (2005) Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Lett* **579**: 921-926.
- Sharp, M.D., and Pogliano, K. (2002) MinCD-dependent regulation of the polarity of SpoIIIE assembly and DNA transfer. *Embo J* **21**: 6267-6274.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O., and Ugalde, R.A. (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* **182**: 4849-4855.
- Spudich, G.M., Fernandez, D., Zhou, X.R., and Christie, P.J. (1996) Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7512-7517.
- Stahl, L.E., Jacobs, A., and Binns, A.N. (1998) The conjugal intermediate of plasmid RSF1010 inhibits *Agrobacterium tumefaciens* virulence and VirB-dependent export of VirE2. *J Bacteriol* **180**: 3933-3939.
- Steen, J.A., Bannam, T.L., Teng, W.L., Devenish, R.J., and Rood, J.I. (2009) The putative coupling protein TcpA interacts with other pCW3-encoded proteins to form an essential part of the conjugation complex. *J Bacteriol* **191**: 2926-2933.
- Stewart, G.S., Lubinsky-Mink, S., Jackson, C.G., Cassel, A., and Kuhn, J. (1986) pHG165: a pBR322 copy number derivative of pUC8 for cloning and expression. *Plasmid* **15**: 172-181.
- Strathdee, C.A., and Lo, R.Y. (1989) Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J Bacteriol* **171**: 916-928.
- Surana, N.K., Cutter, D., Barenkamp, S.J., and St Geme, J.W., 3rd (2004) The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **279**: 14679-14685.
- Tardy, F., Homble, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G.R., Ruyschaert, J.M., and Cabaix, V. (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *Embo J* **18**: 6793-6799.

- 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.
- Terradot, L., Bayliss, R., Oomen, C., Leonard, G.A., Baron, C., and Waksman, G. (2005) Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4596-4601.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A.M., and Hohn, B. (1995) The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *Embo J* **14**: 3585-3595.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Veiga, E., Sugawara, E., Nikaido, H., de Lorenzo, V., and Fernandez, L.A. (2002) Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *Embo J* **21**: 2122-2131.
- Veiga, E., de Lorenzo, V., and Fernandez, L.A. (2003) Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of *Escherichia coli* cells displaying Jun/Fos dimerization domains. *J Bacteriol* **185**: 5585-5590.
- Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J., and Hooykaas, P.J. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**: 979-982.
- Vergunst, A.C., van Lier, M.C., den Dulk-Ras, A., and Hooykaas, P.J. (2003) Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. *Plant Physiol* **133**: 978-988.
- Voth, D.E., Howe, D., Beare, P.A., Vogel, J.P., Unsworth, N., Samuel, J.E., and Heinzen, R.A. (2009) The *Coxiella burnetii* ankyrin repeat domain-containing protein family is heterogeneous, with C-terminal truncations that influence Dot/Icm-mediated secretion. *J Bacteriol* **191**: 4232-4242.
- Voulhoux, R., Taupiac, M.P., Czjzek, M., Beaumelle, B., and Filloux, A. (2000) Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 4051-4058.
- Vrontou, E., and Economou, A. (2004) Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 67-80.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.
- Ward, D.V., Draper, O., Zupan, J.R., and Zambryski, P.C. (2002) Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11493-11500.
- Ward, J.E., Akiyoshi, D.E., Regier, D., Datta, A., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1988) Characterization of the virB operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J Biol Chem* **263**: 5804-5814.
- Ward, J.M., and Grinstead, J. (1982) Physical and genetic analysis of the Inc-W group plasmids R388, Sa, and R7K. *Plasmid* **7**: 239-250.
- Waterman, S.R., and Holden, D.W. (2003) Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**: 501-511.

Bibliografia

- Weiss, A.A., Johnson, F.D., and Burns, D.L. (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2970-2974.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J., and Trulzsch, K. (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun* **72**: 4004-4009.
- Wooldridge, K., (ed) (2009) *Bacterial secreted proteins. Secretory mechanisms and role in pathogenesis*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Yahr, T.L. (2006) A critical new pathway for toxin secretion? *N Engl J Med* **355**: 1171-1172.
- Yamniuk, A.P., Nguyen, L.T., Hoang, T.T., and Vogel, H.J. (2004) Metal ion binding properties and conformational states of calcium- and integrin-binding protein. *Biochemistry* **43**: 2558-2568.
- Yeo, H.J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E., and Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell* **6**: 1461-1472.
- Yeo, H.J., Yuan, Q., Beck, M.R., Baron, C., and Waksman, G. (2003) Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15947-15952.
- Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K.A., Hoppner, C., Krall, L., Domke, N., and Baron, C. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* **280**: 26349-26359.
- Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckenstein, C., Zarfel, G.E., and Koraimann, G. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* **151**: 3455-3467.

8

ENGLISH VERSION

“Comparative study of bacterial type IV secretion systems
involved in conjugative DNA transfer and virulence”

SUMMARY

CONCLUSIONS

PUBLICATIONS

Summary

Type IV secretion systems (T4SS) are widely spread among bacteria. In spite of the high homology shared by them, they are involved in very different biological functions. This is due to their versatility with respect to the secreted substrate (protein and/or DNA) and its target, which can be the extracellular medium or another cell, either prokaryotic or eukaryotic. As a result, T4SS play a role in such different functions as conjugative DNA transfer and virulence (Christie *et al.*, 2005).

T4SS involved in DNA transport play an important role in the genomic plasticity of bacteria. Conjugative T4SS (cT4SS) are part of the bacterial machinery involved in horizontal DNA transfer among bacteria. Other T4SS are involved in DNA uptake or release from/to the environment. Most T4SS are known to secrete proteins either to the milieu or directly into other cells. They are key elements in host adaptability. For example, in the case of *Mesorhizobium loti*, its T4SS plays a role in symbiosis with the plant (Hubber *et al.*, 2004). Pathogenic T4SS (pT4SS) are required by many pathogens to infect their animal hosts. In *Bartonella* spp, different T4SS have been acquired throughout evolution of this genus, increasing its fitness by conferring a better adaptation to each host and lowering virulence (Chomel *et al.*, 2009).

Chapter 1. Comparison of T4SS involved in DNA transfer and virulence.

Two T4SS in particular, named both Trw due to their high level of similarity, belong to the human pathogen *Bartonella* and the conjugative plasmid R388, respectively. In spite of sharing more than 50% identity, they accomplish very different roles: virulence and conjugative DNA transfer, respectively. For this reason, we addressed a comparative study between these two T4SS, hoping to get some insight into the determinants of functional versatility in such evolutionary related systems. Most results of this first chapter have been published in the attached article by de Paz *et al.*, 2005, and are summarized below.

The similarity between these two T4SS extends into their genetic organization. Previous studies suggested that the *trw* genes are distributed in two operons (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006; Seubert *et al.*, 2003), except for *trwN*, which is dispensable for conjugation, at least under laboratory conditions. Our results support this notion. The first operon includes the genes *trwL* to *trwI*, which code mainly for the proteins that form the structural part of the pilus and the proteins directly involved in pilus biogenesis. These genes share a lower level of homology between both T4SS (with the exception of *trwK*). This could be explained because the pilus probably plays an important role in cellular attachment, and adaptation to their respective host requires divergent evolution.

In contrast, the genes that are codified in the second operon, from *trwH* to *trwD*, share the highest conservation degree. They code for the components of the “core complex”, the transmembranal channel through which substrates are translocated. In this work we have shown that these components can be structurally and functionally exchangeable between R388 and *B. tribocorum* (*Bt*) Trw systems. Functional complementation was shown by substitution of R388 elements by those of *Bt* in conjugation assays (de Paz *et al.*, 2005). Structural complementation was shown by reconstitution of other R388 Trw protein levels, which were affected in the absence of each R388 Trw component, when the *Bt* T4SS was present. A summary of the latter results is presented in Table 1.

These results suggest that the central core of the T4SS is conserved, and maybe we could use a combination of both T4SS to exchange substrates. However, we were not able to mobilize the R388 T4SS substrate through the *Bt* T4SS in conjugation assays using as donors either *Bt* itself or *E. coli* harbouring the *Bt trw* genes, and either *Bt* or *E. coli* as recipients.

In summary, in spite of our results highlighting the similarities between both T4SS, we did not accomplish substrate exchange in conjugation assays. Some reasons could be the following:

Plásmidos	Trw T4SS	Transferencia	Anti C	Anti K	Anti J	Anti D
R388	R388	10^{-1}	+++	+++	+++	+++
pSU4130	R388ΔL	$<10^{-7}$	+++	+	-	+
pSU4130+ pAB2	R388ΔL+Bt	$<10^{-7}$	+++	+	-	+
pSU4133	R388 ΔK	$<10^{-7}$	+++	-	-	- *
pSU4133+ pAB2	R388 ΔK+Bt	$<10^{-7}$	+++	-	-	- *
pSU4136	R388 ΔJ	$<10^{-7}$	+++	+++	-	++
pSU4136+ pAB2	R388 ΔJ+Bt	$<10^{-7}$	+++	+++	-	++++
pSU4137	R388ΔI	$<10^{-7}$	+++	+++	-	-
pSU4137+ pAB2	R388ΔI+Bt	$<10^{-7}$	+++	+++	+	-*
pSU4131	R388ΔH	10^{-5}	+++	+++	+	++
pSU4131+ pAB2	R388ΔH+Bt	10^{-4}	+++	+++	+++	+
pSU4135	R388ΔF	$<10^{-7}$	+++	+++	-	-
pSU4135+ pAB2	R388ΔF+Bt	10^{-5}	+++	+++	++	-*
pSU4134	R388ΔE	$<10^{-7}$	+++	+++	-	++++
pSU4134+ pAB2	R388ΔE+Bt	10^{-5}	+++	+++	++	++
pSU4132	R388ΔD	$<10^{-7}$	+++	+++	-	-
pSU4132+ pAB2	R388ΔD +Bt	10^{-2}	+++	+++	+++	-*

Tabla 3. Trw protein levels in different R388 Trw mutants, in the presence or absence of plasmid. Second column summarize the conjugative efficiency. The rest of the columns summarize Western blot results. +++ wt amount. ++ Light fall. + Hard fall. – No detectable. ++++ More amount than wt. * R388 TrwD antibody recognize *Bt* TrwD.

- d) Low expression of *Bt trw* genes. It has been reported that *trw* expression is induced upon intracellular infection of human cells (Schmiederer *et al.*, 2001; Seubert *et al.*, 2003). However, positive data in complementation assays suggest that *Bt trw* genes are being expressed under our mating conditions. Moreover, we also tried conjugations where donors were intracellular *Bt*, with no positive results either.
- e) No R388 substrate recruitment by the *Bt* T4SS. To explore this possibility, we addressed an in-depth study of TrwB, the coupling protein of R388, which has a pivotal role in substrate recruitment. The results from this second chapter are included in an attached manuscript (de Paz *et al.*, 2010), and are summarized in the following section.
- f) Another reason could be that *Bartonella* T4SS is only functional inside human cells. For this reason, we have addressed DNA mobilisation assays from intracellular *Bartonella* to human cells (Chapter three).

Chapter 2. Mutational analysis of TrwB, the coupling protein of plasmid R388.

Conjugative coupling proteins mediate contact between the nucleoprotein substrate in the cytoplasm and the T4SS during conjugative DNA transfer, playing a key role in substrate recruitment. Previously, it was shown that a single T4SS coupling protein (T4CP) can function with different cT4SS. Conjugation efficiency correlated with the strength of the interaction between the T4CP and the VirB10-like component of each T4SS (Llosa *et al.*, 2003). In this work, we have shown not only that there is a physical interaction between TrwB and *Bt*-TrwE (the VirB10 homologue), but also that *Bt* TrwE could substitute for R388 TrwE in conjugation (de Paz *et al.*, 2005).

We have addressed a mutagenesis analysis of TrwB in order to delimit the domains of the protein involved in contact with the cytosolic substrate and with the T4SS. This work is presented in detail in the attached manuscript (de Paz *et al.*, 2010).

Because the T4CP-T4SS interaction is important for substrate recruitment, we constructed random TrwB and *Bt* TrwE mutants in their N-terminal regions selecting for mutants with stronger interactions. The transmembrane regions of both proteins have shown to be important for this interaction, as pointed by other studies (Llosa *et al.*, 2003). In particular, one TrwB and one TrwE Proline residue seem to directly affect the interaction, probably by their capacity to modify the transmembranal α -helix structure.

We have also performed an extensive mutagenesis analysis of the cytosolic part of TrwB, which allowed us to determine the domains and residues which more likely interact directly with the substrate: lysine residues protruding into the internal channel of the TrwB hexamer, and polar residues at the cytoplasmatic surface next to the channel entrance.

Chapter 3. Mobilization of DNA into human cells through the T4SS of *Bartonella henselae*.

Based on the similarities found between the Trw T4SS, we decided to test DNA mobilization from *B. henselae* into human cells by using a combination of the R388 conjugative machinery and *Bartonella* T4SS. We constructed a plasmid including the R388 Dtr region (all the conjugation machinery except for the T4SS) and a human eGFP expression cassette (Figure 1) and introduced it into *Bh*. We confirmed the expression of eGFP in transfected human cells, and the lack of eGFP expression in bacteria (not shown).

After infection of immortalized vascular endothelial human cells (Ea.hy 926) with *Bh* containing pHP161, we detected eGFP positive cells by flow cytometry, and thus, DNA transfer from *Bh* to human cells (Figure 2). About 1-2 percent of the cells were eGFP positive. In fact, DNA mobilization was probably underestimated, because eGFP positive cells require DNA mobilization plus *eGFP* expression. If we could measure transport of the pilot protein TrwC alone, the efficiency would probably be significantly higher.

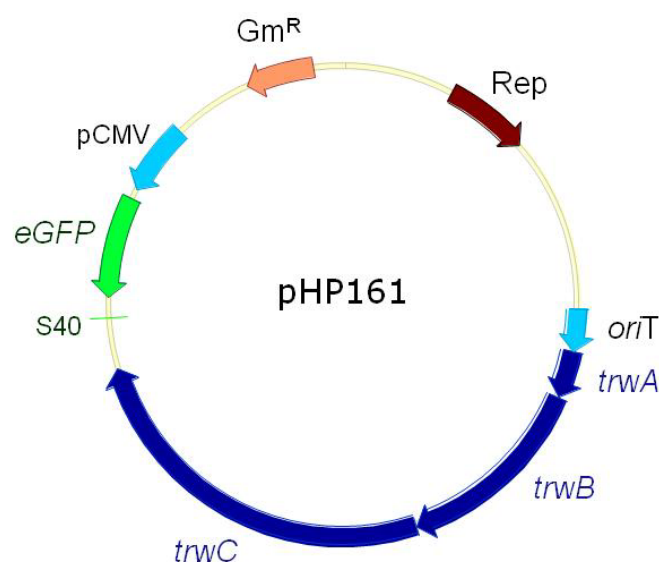


Figure 1. Plasmid pHP161. This plasmid contains the pBBR6 replication origin (Rep), a Gentamicin resistance gene (Gm^R), the R388 Dtr region (*oriT*, *trwA*, *trwB*, and *trwC*), and an eukaryotic eGFP expression cassette (pCMV-eGFP-SV40 polyadenylation signal).

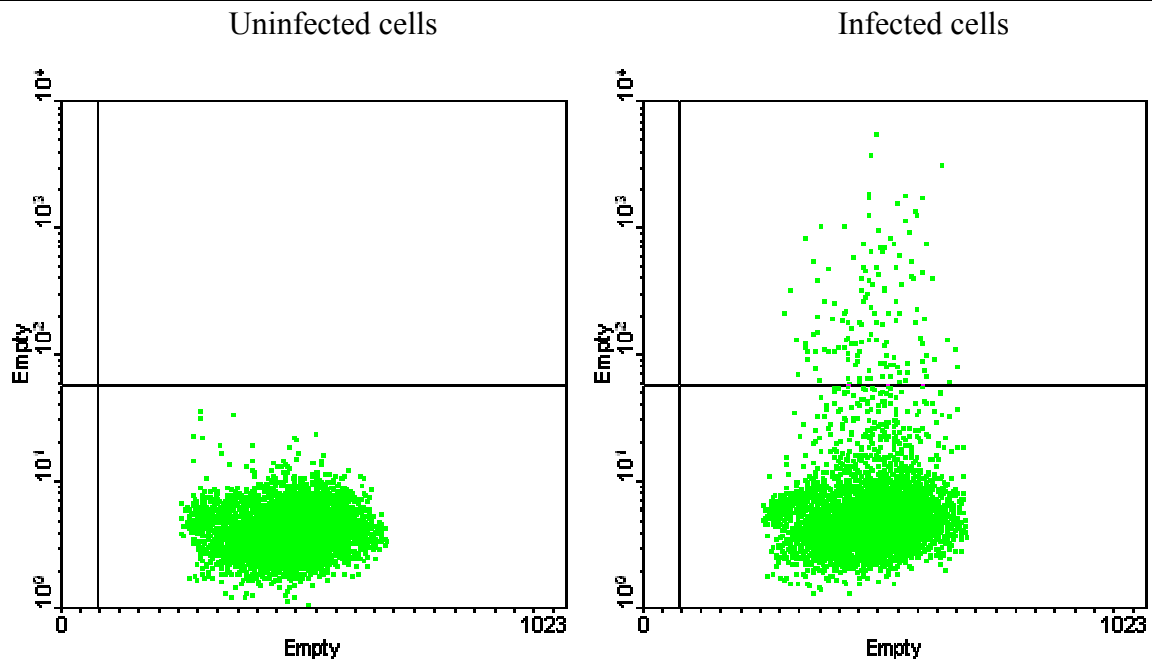


Figure 2. FACS graph. Uninfected cells (left) and cells infected by *Bh* containing the plasmid pHP161 (right). Green points represent cells, and eGFP intensity is measured in abscises. The horizontal line marks eGFP background.

The next step was to determine if DNA transfer was driven by the R388 conjugation machinery. We constructed mobilizable plasmids lacking either *TrwB* or *TrwC*, and similarly tested their mobilization into human cells (Figure 3).

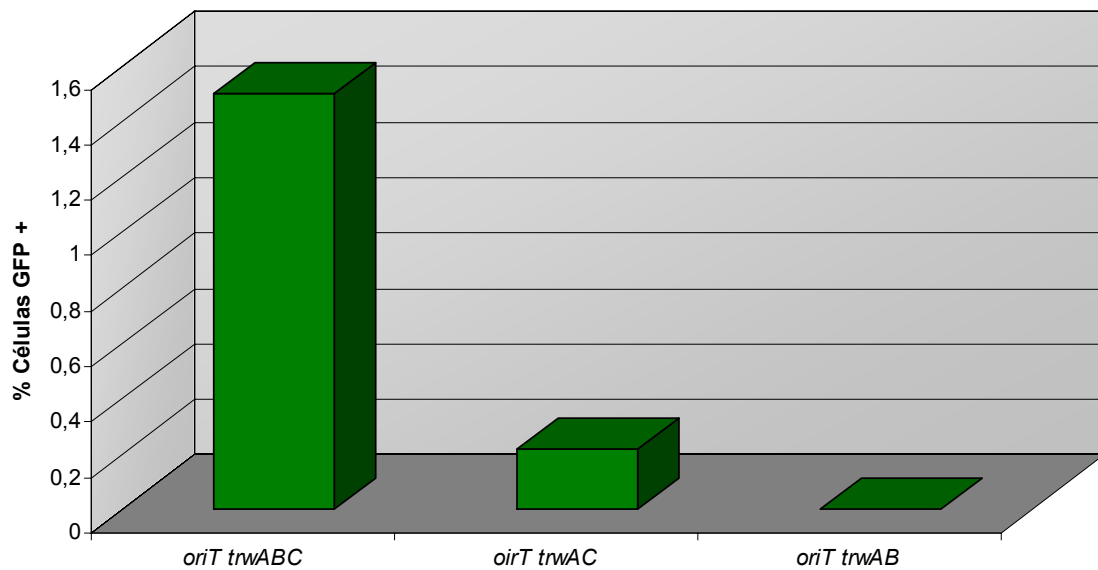


Figure 3. Percentage of eGFP positive cells infected by *Bh* carrying plasmids which code for the indicated R388 Dtr region.

It can be observed that TrwC is totally required for DNA transfer, while in the absence of TrwB there is a 90% decrease in transfer efficiency. In this way, we prove that DNA mobilization from *Bh* to human cells is a conjugative process, and thus, the transferred substrate must be a TrwC-DNA complex.

We also constructed mobilizable plasmids carrying the TrwB mutants obtained in Chapter 1 which showed stronger interactions with *Bt* TrwE, and assayed their transfer into human cells. As shown in Figure 4, in contrast to our expectations, TrwB mutants show a significantly lower DNA transfer efficiency, suggesting that a stronger interaction between the T4CP and the T4SS is not necessary ligated to higher substrate transfer efficiency. In fact, the VirB10 homologues are thought to be T4SS sensors which allow the opening of the T4SS channel for substrate translocation (Cascales and Christie, 2004). So, a stronger interaction with the T4CP could be too rigid to transfer such a signal. But in any case, the drastic effect of the TrwB point mutants on DNA transfer efficiency underscores the importance of TrwB and its interaction with the T4SS in the DNA transfer process.

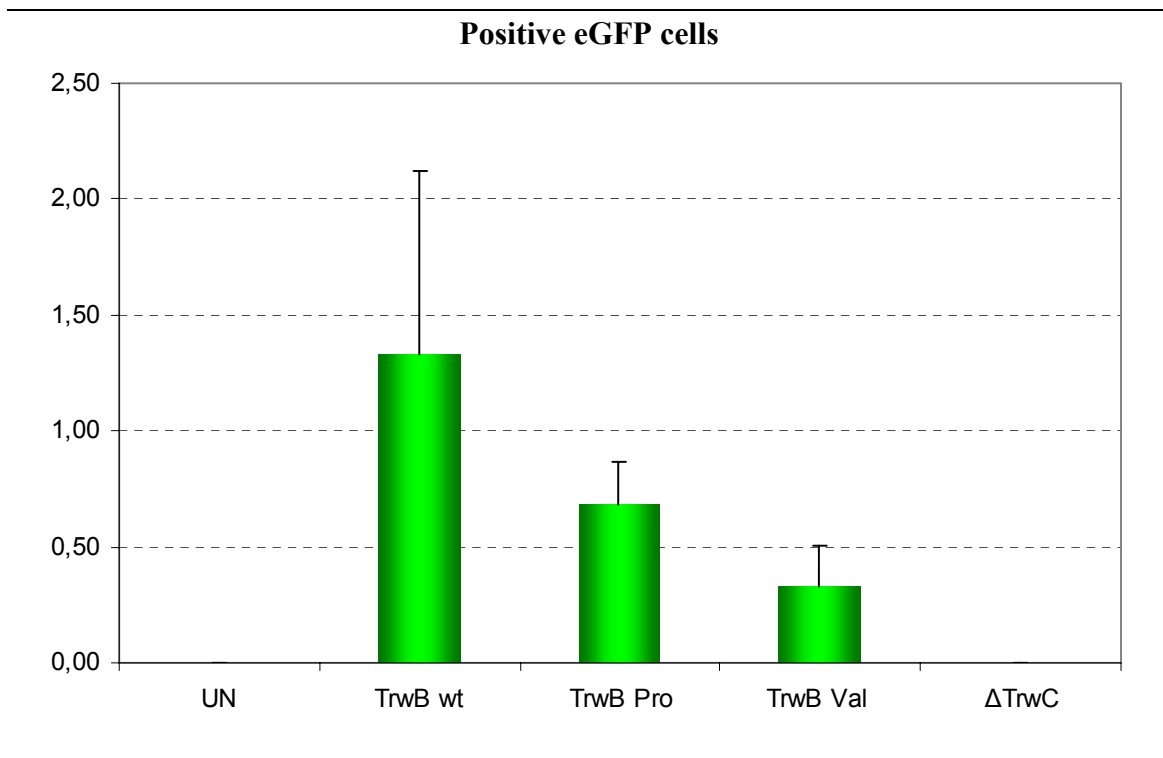


Figure 4. Percentage of eGFP positive cells infected by *Bh* carrying plasmids which expressed different TrwB mutants. UN, uninfected cells; TrwB wt, wild-type; TrwB Pro, mutant P18S; TrwB Val, mutant V74I; ΔTrwC, negative control (mobilizable plasmid with no TrwC).

B. henselae has two different T4SS, both required for virulence: the Trw T4SS, which is probably required for attachment to the erythrocytes, and the VirB T4SS, necessary for endothelial cell infection (Dehio, 2008). For this reason, although we hypothesized that the transfer would occur through the Trw T4SS due to its similarity with the R388 Trw, we tested all possibilities. We assayed several *B. henselae* mutant strains carrying different T4SS mutations: a VirB4 deficient mutant, a whole VirB deletion mutant, a VirD4 deficient mutant, a TrwE deficient mutant, and a double TrwE Δ VirB mutant.

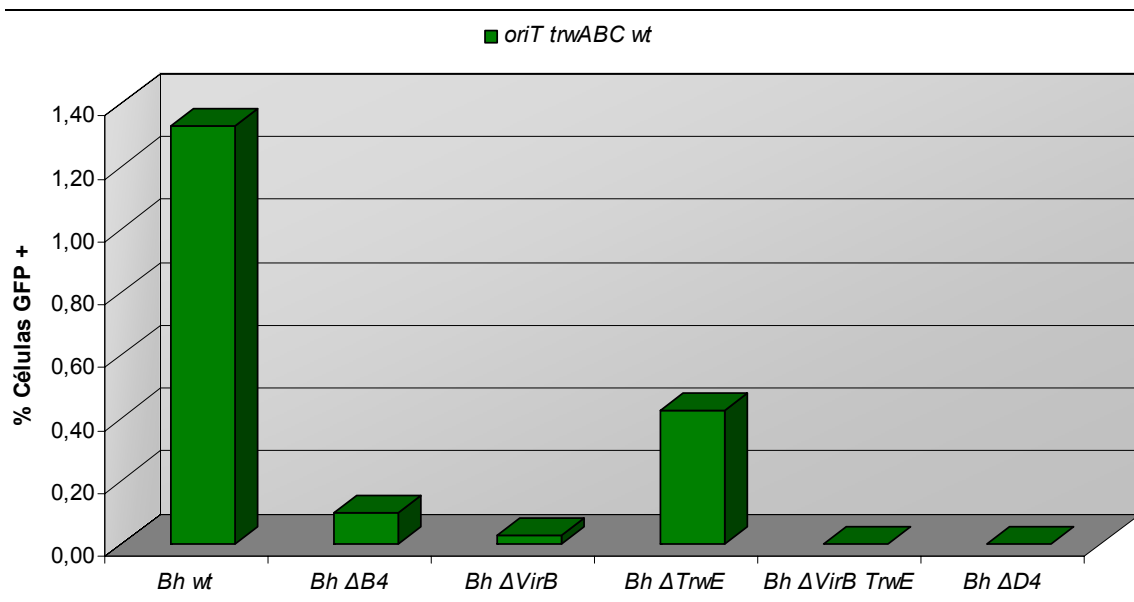


Figure 5. Percentage of eGFP positive cells infected by the indicated *Bh* strains carrying plasmid pHP161 (*oriT trwABC*).

The results (Figure 5) show that the double mutant Δ VirB Δ TrwE is not able to transfer DNA to human cells, confirming that DNA transfer occurs necessarily through one or both T4SS. In the case of the TrwE mutant there is roughly one third of DNA transfer. However, the VirB mutants are DNA transport deficient. Some DNA transfer is detectable in the VirB4 mutant, maybe because VirB4 is substituted by TrwK of the Trw system. Taken together, these data suggest that DNA transfer occurs mainly through the VirB T4SS. It could also occur through the Trw T4SS, given that the TrwE mutant shows a significant decrease in DNA transfer efficiency; but we cannot exclude the possibility of interactions between both systems: some elements of the unassembled Trw T4SS could interfere with the normal functioning of the Vir T4SS.

These are not the results we expected, because the R388 and *Bartonella* Trw T4SS are closely related, while the *Bartonella* VirB T4SS is not. However, VirB has known protein substrates (Schulein *et al.*, 2005), whereas no substrate has been detected so far for the *Bartonella* Trw T4SS. This T4SS does not have a T4CP either. Thus, it is possible that the Trw T4SS does not work as a secretion system, and thus it cannot be used for our purposes, while TrwC seems to work as a substrate for the VirB T4SS.

Regarding the T4CP required for DNA transfer, both TrwB (the R388 T4CP) and VirD4 (the VirB T4CP) are required (Figures 3-5). One possibility is that VirD4, alone or cooperating with TrwB, could recruit the substrate and pump out the DNA. However, we do not favour this possibility, since VirD4 is not involved in DNA transfer during *Bartonella* infection, so it is unlikely that it would be able to pump DNA. It seems more plausible that VirD4 would be required as an integral component of the VirB T4SS, whereas TrwB would act as a T4CP, pumping out the DNA molecule.

Conclusions and prospects

Our results increase the understanding on the molecular basis of Type IV secretion of proteins and DNA in T4SS involved in both DNA transfer and virulence. The main conclusion is that, due to the similarity among different T4SS, it is possible to exchange their substrates. We succeeded in obtaining DNA transfer from *Bartonella henselae* to human cells by using elements of a DNA conjugation system and the pathogen T4SS.

Some questions are still open concerning the role of both T4SS and their T4CP (VirD4 and TrwB). In the future, it will be interesting to study TrwC transport without DNA, achieving more sensitive assays, which will let us know more exactly the role of the different components involved in the secretion process. Currently, in our laboratory we have started to set up TrwC-reporter fusion assays to detect TrwC translocation into mammalian cells.

The continuation of the research line we have started could open the way to the development of new tools for the genetic modification of human cells. There are several advantages of the system we propose:

- The specificity of the infected tissue by specific pathogens. Many pathogens harbouring T4SS address specific cell types. For example, *Bartonella* infects only vascular endothelial cells and erythrocytes; *Brucella* infects macrophage, *Helicobacter pilory* infects gastric cells, and so on. If we could use those T4SS the same way we have shown for *Bartonella*, we could target specific tissues *in vivo*.

- Our conjugation-based system, using bacteria as opposed to the use of viruses as DNA delivery vectors, would allow the transfer of DNA molecules of any origin and length. Due to the processivity of the conjugative process, DNA size is not a problem. In contrast, viral tools pose strict limitations on the DNA size by the viral capsids. Thus, we could introduce complete human genes, even accompanied by their regulatory sequences.

- The R388 conjugative system has an additional advantage: the leader protein TrwC, which is transported covalently linked to the DNA into the host cell, has site-specific integrase activity (Draper *et al.*, 2005). TrwC is able to integrate the attached DNA into specific sequences in the recipient cell. There are some sequences in the human genome with high homology to the TrwC target DNA sequence, where TrwC could integrate the incoming DNA.

In the future, it could be possible to develop a tool combining *in vivo* DNA delivery and site-specific integration of any DNA molecule into the human genome of specific human cells. This would be an invaluable tool for gene therapy.

References

- Cascales, E., and Christie, P.J. (2004) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17228-17233.
- Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Breitschwerdt, E.B., Kasten, R.W., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R.J., Koehler, J.E., and Dehio, C. (2009) Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res* **40**: 29.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**: 451-485.
- de Paz, H.D., Sangari, F.J., Bolland, S., Garcia-Lobo, J.M., Dehio, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005) Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151**: 3505-3516.
- de Paz, H.D., Larrea, D., Zunzunegui, S., Dehio, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2010) Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. Submitted for publication to *J Bacteriology*.
- Dehio, C. (2008) Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* **10**: 1591-1598.
- Draper, O., Cesar, C.E., Machon, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16385-16390.
- Fernandez-Lopez, R., Garcillan-Barcia, M.P., Revilla, C., Lazaro, M., Vielva, L., and de la Cruz, F. (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942-966.
- Hubber, A., Vergunst, A.C., Sullivan, J.T., Hooykaas, P.J., and Ronson, C.W. (2004) Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Microbiol* **54**: 561-574.
- Llosa, M., Zunzunegui, S., and de la Cruz, F. (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10465-10470.
- Schmiederer, M., Arcenas, R., Widen, R., Valkov, N., and Anderson, B. (2001) Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB operon by human endothelial cells. *Infect Immun* **69**: 6495-6502.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C., Carena, I., and Dehio, C. (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 856-861.
- Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F., and Dehio, C. (2003) A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**: 1253-1266.

Conclusions

1. All of the *trw* genes of the Mpf region of R388, except for *trwN* and *trwH*, are essential for R388 conjugal transfer. The genes *trwL-trwI* and *trwH-trwD* are grouped in two possible transcriptional units, named operons 1 and 2 respectively, which reconstitute conjugative function when expressed from separate replicons.

2. All genes from operon 2, and none from operon 1, can be substituted in conjugation by their homologues in *Bartonella tribocorum*.

3. The cellular levels of some Trw proteins are affected in the absence of other T4SS proteins, suggesting they need a functional T4SS for their stability. TrwJ levels are undetectable in the absence of any other Trw protein. In the case of TrwD, the absence of the core-complex components affects TrwD protein levels significantly more than the absence of the components of the pilus. Conversely, the amount of both TrwK and the relaxase TrwC are not affected by the absence of any other Trw T4SS protein.

4. The amount of TrwJ raises back to wild-type levels when the absence of some of the Trw proteins is complemented by their homologues in *B. tribocorum*; this happens with proteins coded by operon 2 and with TrwI.

5. We have obtained TrwB and TrwE *Bt* mutants which show a stronger interaction between them, without affecting their function in conjugation. Most of the mutants lie on the transmembranal segments of both proteins. Two Proline residues in particular seem to play a central role in the T4CP : T4SS interaction, since they appeared mutated repeatedly.

6. The TrwB mutants showing a stronger interaction with TrwE *Bt*, also increase the strength of TrwB monomer-monomer interactions.

7. We have set up a conjugation assay in which the frequency of transfer is correlated with the amount of TrwB.

8. We have characterized a collection of TrwB point mutants. Mutants in the residues in contact with or surrounding the NTP, completely abolish TrwB function in conjugation, and show a strong dominant negative effect. Mutations which change the charge of residues located in the surface of the all-alpha domain or inside the channel of the TrwB hexamer, also affect the functionality of the protein.

9. TrwB mutants K136T and D158A, in contact with the NTP, and the deletion of the C-terminal 12 residues, affect the oligomerization of the protein, but do not affect its interaction with the T4SS component TrwE.

10. We have set up an assay to detect DNA transfer from bacteria to human cells based on the detection by flow cytometry of the expression of an eGFP cassette which is not functional in prokaryotes.

11. There is transfer of DNA from *Bartonella henselae* to human vascular endothelial cells. 1-2% of the cells infected with *B. henselae* carrying a mobilizable plasmid with the eGFP cassette, turned out eGFP positive.

12. This DNA transfer is mediated by both the coupling protein TrwB and the relaxase TrwC of R388.

13. The DNA transfer is abolished in the absence of both T4SS of *B. henselae*, thus confirming that the transfer process is mediated by both the conjugative machinery of R388 and the T4SS of the pathogen.

14. There is also a total dependence on VirD4, the T4CP of the VirB system, but we do not know if it works as a coupling protein or if it is required as a structural element of the T4SS.

15. A *B. henselae* mutant lacking the *virB* genes shows only residual levels of eGFP expression, indicating that DNA transfer occurs mainly through the VirB T4SS, although transfer through the Trw T4SS cannot be discarded at this point.

Publications

1. - de Paz, H.D., Sangari, F.J., Bolland, S., Garcia-Lobo, J.M., Dehio, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005) Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151**: 3505-3516.
2. - de Paz, H.D., Larrea, D., Zunzunegui, S., Dehio, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2010) Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. Submitted for publication to *J Bacteriology*.

Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence

Héctor D. de Paz,¹ Félix J. Sangari,¹ Silvia Bolland,^{1†}
Juan M. García-Lobo,¹ Christoph Dehio,² Fernando de la Cruz¹
and Matxalen Llosa¹

Correspondence
Matxalen Llosa
llosam@unican.es

¹Departamento de Biología Molecular (Unidad Asociada al CIB-CSIC), Universidad de Cantabria, C. Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain

²Division of Molecular Microbiology, Biozentrum of the University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland

This paper reports an analysis of the functional interactions between type IV secretion systems (T4SS) that are part of the conjugative machinery for horizontal DNA transfer (cT4SS), and T4SS involved in bacterial pathogenicity (pT4SS). The authors' previous work showed that a conjugative coupling protein (T4CP) interacts with the VirB10-type component of the T4SS in order to recruit the protein–DNA complex to the transporter for conjugative DNA transfer. This study now shows by two-hybrid analysis that conjugative T4CPs also interact with the VirB10 element of the pT4SS of *Agrobacterium tumefaciens* (*At*), *Bartonella tribocorum* (*Bt*) and *Brucella suis* (*Bs*). Moreover, the VirB10 component of a cT4SS (protein TrwE of plasmid R388) could be partially substituted by that of a pT4SS (protein TrwE of *Bt*) for conjugation. This result opens the way for the construction of hybrid T4SS that deliver DNA into animal cells. Interestingly, in the presence of part of the *Bs* T4SS the R388 T4SS protein levels were decreased and R388 conjugation was strongly inhibited. Complementation assays between the Trw systems of R388 and *Bt* showed that only individual components from the so-called 'core complex' could be exchanged, supporting the concept that this core is the common scaffold for the transport apparatus while the other 'peripheral components' are largely system-specific.

Received 4 August 2005
Revised 12 September 2005
Accepted 15 September 2005

INTRODUCTION

Type IV secretion systems (T4SS) constitute a family of macromolecular transporters involved in bacterial functions as different as conjugative DNA transfer and virulence (Cascales & Christie, 2003). Conjugative T4SS (cT4SS) are part of the bacterial machinery involved in horizontal DNA transfer among bacteria. Pathogenic T4SS (pT4SS) are required by many pathogens to infect their eukaryotic hosts; in many instances they have been shown to be the transport channels to eukaryotic cells of essential virulence factors for establishment of the donor bacterium in the eukaryotic host. In the case of *Agrobacterium tumefaciens* (*At*), its T4SS can be considered a cT4SS as well as a pT4SS, since it is required for T-DNA transfer into the plant host cell.

In spite of the differences between cT4SS and pT4SS

in the nature of the secreted substrate (nucleoprotein vs protein complex), in their biological role (DNA transfer vs virulence), and in the target cell (prokaryotic vs eukaryotic), there is homology among them. Most T4SS are formed by 11 proteins, named VirB1 to VirB11 for the components of the prototypical *At* T4SS. The overall architecture of the transporter is conserved in the family, as shown by a common gene organization (see Fig. 1), the same membrane topology of each component, and conservation of protein–protein interactions between the T4SS components. For instance the VirB7–VirB9 interaction has been described for the T4SS of *At* (Baron *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1997; Spudich *et al.*, 1996), *Bordetella pertussis* (Farizo *et al.*, 1996), *Bartonella henselae* (Shamaei-Tousi *et al.*, 2004) and *Xanthomonas axonopodis* (Alegria *et al.*, 2005).

Several lines of evidence suggest that there is a 'core' complex made up of proteins VirB7, VirB8, VirB9 and VirB10 that would make up the central transmembrane channel. Topology studies indicate that these proteins are located mostly in the periplasm. VirB8, VirB9 and VirB10 were shown to interact with each other (Beaupre *et al.*, 1997; Das & Xie, 2000), in addition to the VirB7–VirB9 interaction already mentioned. All four proteins can be extracted

†Present address: Laboratory of Immunogenetics, NIAID/NIH, 12441 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

Abbreviations: *At*, *Agrobacterium tumefaciens*; *Bs*, *Brucella suis*; *Bt*, *Bartonella tribocorum*; *Ec*, *Escherichia coli*; T4SS, type IV secretion system(s); cT4SS, T4SS involved in bacterial conjugation; pT4SS, T4SS involved in pathogenicity; T4CP, coupling protein.

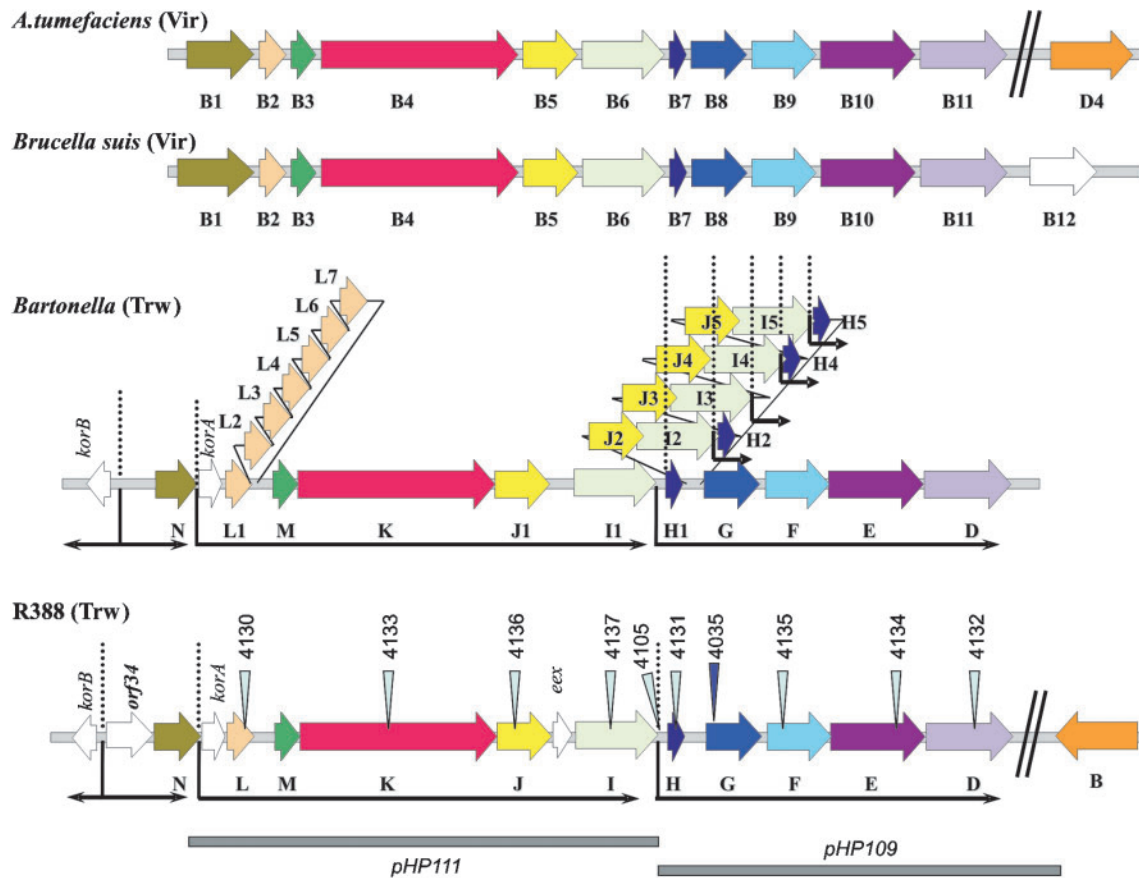


Fig. 1. Scheme of T4SS genetic determinants. Representation of the gene arrays that code for the T4SS studied in this work: *At*-Vir (Berger & Christie, 1994), *Bs*-VirB (O'Callaghan *et al.*, 1999), *Bt*-Trw (Seubert *et al.*, 2003) and R388-Trw (this work). Homologous genes are represented in the same colour. Dashed lines represent genetic discontinuities. The prefix of the genes (*vir* or *trw*, as indicated) has been omitted for clarity. In the maps of R388 and *Bt* T4SS, postulated transcriptional units are indicated with black arrows that start at the proposed promoter sites and point in the direction of transcription. *kor* boxes are indicated by vertical dashed lines. In the *Bt*-Trw region, the seven *trwL* repetitions and the five *trwJ*-*trwI*-*trwH* repetitions are designated as in Seubert *et al.* (2003). The R388 insertion mutants used in this work are indicated with triangles at the site of the transposon insertion and the name of the plasmid, without the pSU prefix. The dark triangle indicates the Ω insertion in pSU4035. Grey rectangles show the extent of the *trw* fragments cloned in plasmids pHP109 and pHP111.

from the membrane as a complex (Krall *et al.*, 2002). Furthermore, there is functional dependence of one protein upon another: VirB9 and VirB10 form clusters in the bacterial envelope only if VirB8 is present (Kumar *et al.*, 2000), VirB8 and VirB9 sequentially bind the substrate DNA during its exit pathway through the *At* T4SS (Cascales & Christie, 2004a), VirB10 undergoes an energy-dependent conformational change to interact with the VirB7–VirB9 complex (Cascales & Christie, 2004b), and VirB9–VirB10 complex formation is required for substrate passage through the secretion channel (Cascales & Christie, 2004a, b).

The other components that make up a T4SS can be summarized as follows (for a review and update, see Cascales & Christie, 2003; Llosa & O'Callaghan, 2004): two highly conserved inner-membrane-bound NTPases, VirB11 and VirB4, are involved in early substrate transfer reactions

(Atmakuri *et al.*, 2004); VirB2 and VirB5 are pilus components (Lai & Kado, 1998; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999); VirB6 is an integral membrane protein required for T4SS assembly and function (Hapfelmeier *et al.*, 2000; Jakubowski *et al.*, 2004); VirB1 is a lytic transglycosylase required for T4SS early assembly (Koraimann, 2003), although not an essential component in all systems; finally, the function of the outer-membrane associated protein VirB3 is unknown.

Many T4SS, including all cT4SS, have an associated coupling protein (T4CP). T4CPs are proteins anchored to the inner membrane through their N-terminus, so named because they interact both with the secretion substrate and with the secretion machinery (Cabezón *et al.*, 1997; Llosa *et al.*, 2003). Besides their coupling role, they may act as DNA pumps during conjugation (Gomis-Rüth *et al.*, 2001;

Tato *et al.*, 2005). Specific protein–protein interactions between the T4CP and cT4SS components have now been described. TrwB, the T4CP of conjugative plasmid R388, interacts with proteins TrwC and TrwA, which bind to the substrate DNA, and with protein TrwE, a VirB10 homologue (Llosa *et al.*, 2003). Moreover, T4CPs interact with VirB10 homologues from heterologous cT4SS so that they can deliver their substrate DNA through the heterologous transporter, with efficiencies that correlate with the strength of the corresponding T4CP–VirB10 interaction (Llosa *et al.*, 2003). Interactions of the *At* T4CP have been described with a protein substrate, protein VirE2, and with the T4SS NTPases VirB4 and VirB11 (Atmakuri *et al.*, 2003, 2004).

Functional complementation between homologues from different T4SS has been reported in a few instances: the VirB5 homologues of two cT4SS, TraC protein of conjugative plasmid pKM101 and VirB5 of *At* T4SS (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999); and some VirB1 homologues, but not others, could be exchanged (Hoppner *et al.*, 2004). The most related T4SS systems described to date are the Trw systems found in the conjugative plasmid R388 and in *Bartonella* spp. [*B. henselae* and *B. tribocorum* (*Bt*)], which are a cT4SS and a pT4SS respectively. Identities among the Trw components of each system range from 25 to 80%; the ‘core’ components share more than 50% identity. Functional complementation was observed between the TrwD and TrwH components of both systems (Seubert *et al.*, 2003), underscoring the close relationships between T4SS

even when their biological role involves very different processes. Thus, the Trw T4SS of R388 and *Bartonella* spp. are probably the best candidates to obtain a hybrid c/pT4SS which ideally could be used to deliver DNA into the eukaryotic host cells (Llosa & de la Cruz, 2005).

In this work we undertook an extended analysis of T4CP–T4SS interactions and showed that T4CPs also interact with the VirB10-like component of several pT4SS. This interaction reflects a functional interaction in the case of the Trw T4SS, as shown by functional complementation between the respective T4SS components. We performed a complementation analysis between these two systems in order to obtain information about the building blocks of a T4SS that can be exchanged. Our results support the concept of a ‘core complex’ of highly conserved components that can be substituted, while the ‘peripheral’ components are more specific for their host/function.

METHODS

Bacterial strains. These are listed in Table 1. The *Escherichia coli* (*Ec*) *lacI^q* strain D1210 was used for *Plac*-driven expression. For conjugation experiments, strains D1210, HB101 or DH5 α were used as donor and recipient strains, as indicated. Strain DHM1 was used as a host in two-hybrid assays. Strain JC7623 was used to transfer mutations to R388 by homologous recombination. *At* genomic DNA was obtained from wild-type nopaline *At* strain C58. *Brucella suis* (*Bs*) 1330 is a virulent wild-type strain. *Bs* 1330 *virB5::Kan* is a mini-Tn5-km2 *virB5* mutant.

Table 1. Bacterial strains

Strain	Genotype*	Source or reference
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>At</i>)		
C58	Wild-type nopaline	Patricia Zambryski, University of California at Berkeley
<i>Brucella suis</i> (<i>Bs</i>)		
1330	Wild-type	David O’Callaghan, INSERM, France
1330 <i>virB5::Kan</i>	Km ^R <i>virB5</i> polar mutant	O’Callaghan <i>et al.</i> (1999)
<i>Escherichia coli</i> (<i>Ec</i>)		
D1210	Sm ^R <i>proA2 leuB6 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 xyl5 mtl-1 recA13 hsdR hsdM rpsL lacI^q</i>	Sadler <i>et al.</i> (1980)
DH5 α	Nx ^R <i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(argF–lacZYA)U169 ϕ80dlacZΔM15</i>	Grant <i>et al.</i> (1990)
DHM1	Nx ^R <i>cya-854 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 spoT1 rfbD1 glnV44(AS)</i>	Karimova <i>et al.</i> (2005)
HB101	Sm ^R <i>thi-1 hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 supE44</i>	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)
JC7623	Sm ^R <i>recB21 recC22 sbcB15 sbcC arg thi thr leu pro his strA</i>	Kushner <i>et al.</i> (1971)

*Km^R, Sm^R and Nx^R, resistant to kanamycin, streptomycin and nalidixic acid, respectively.

Table 2. Plasmids

Plasmid	Description	Reference
pAB2	pLAFR5-Km:: <i>Bt trw</i> region	Seubert <i>et al.</i> (2003)
pFJS134	pRL662::MobW (<i>oriT</i> + <i>trwABC</i>)	This work
pFJS193	pRL662::Mob (CloDF13)	This work
pHG327	Ap ^R Cloning vector, Rep (pMB1)	Stewart <i>et al.</i> (1986)
pHG329	Ap ^R Cloning vector, Rep (pMB1)	Stewart <i>et al.</i> (1986)
pHP100	pSU24:: <i>trwE</i> (<i>Bt</i>)	This work
pHP101	pSU24:: <i>virB10</i> (<i>Bs</i>)	This work
pHP102	pSU24:: <i>trwE</i> (R388)	This work
pHP109	pSU18:: <i>trwH-D</i> + <i>korB</i>	This work
pHP111	pHG329:: <i>trwL-I</i>	This work
pMTX513	pUT18C:: <i>trwB</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX514	pT25:: <i>trwB</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX631	pUT18C:: <i>trwE</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX632	pT25:: <i>trwE</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX644	pUT18C:: <i>traJ</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX651	pT25:: <i>traJ</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX667	pUT18C:: <i>traF</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX671	pUT18C:: <i>virB10</i> (<i>At</i>)	This work
pMTX672	pUT18C:: <i>virD4</i> (<i>At</i>)	This work
pMTX673	pT25:: <i>virB10</i> (<i>At</i>)	This work
pMTX674	pT25:: <i>traF</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX677	pUT18C:: <i>pilX10</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX679	pUT18C:: <i>taxB</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX680	pT25:: <i>taxB</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pMTX682	pT25:: <i>pilX10</i>	This work
pMTX687	pT25:: <i>virD4</i> (<i>At</i>)	This work
pMTX688	pT25:: <i>virB10</i> (<i>Bs</i>)	This work
pMTX689	pUT18C:: <i>virB10</i> (<i>Bs</i>)	This work
pMTX697	pUT18C:: <i>trwE</i> (<i>Bt</i>)	This work
pMTX698	pT25:: <i>trwE</i> (<i>Bt</i>)	This work
pRL662	Gm ^R broad host-range cloning vector	Vergunst <i>et al.</i> (2000)
pSU18	Cm ^R cloning vector, Rep (p15A)	Bartolomé <i>et al.</i> (1991)
pSU24	Cm ^R cloning vector, Rep (p15A)	Bartolomé <i>et al.</i> (1991)
pSU1423	pSU18:: <i>oriT</i> + <i>trwABC</i>	Bolland <i>et al.</i> (1990)
pSU1425	R388 without <i>EcoRI</i> site	Llosa <i>et al.</i> (1994)
pSU2007	R388 Km ^R	Martínez & de la Cruz (1988)
pSU1087	pUB2413 (Cm ^R , Rep (p15A)):: <i>trwA-trwN</i>	Bolland <i>et al.</i> (1990)
pSU4035	pSU1087:: Ω insertion in <i>trwG</i>	Bolland <i>et al.</i> (1990)
pSU4051	pHG327:: <i>oriT</i> + <i>trwABC</i>	Bolland <i>et al.</i> (1990)
pSU4058	pHG327:: <i>trwL-trwD</i>	Bolland <i>et al.</i> (1990)
pSU4063	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwD</i>	This work (Table 4)
pSU4064	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwK</i>	This work (Table 4)
pSU4065	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwL</i>	This work (Table 4)
pSU4067	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwE</i>	This work (Table 4)
pSU4070	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwF</i>	This work (Table 4)
pSU4078	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwH</i>	This work (Table 4)
pSU4082	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwJ</i>	This work (Table 4)
pSU4089	pSU4058:: Tn5tac1 in <i>trwI</i>	This work (Table 4)
pSU4105	pSU4058:: Tn5tac1 between <i>trwH</i> and <i>trwI</i>	This work
pSU4130	pSU1425:: Tn5tac1 in <i>trwL</i>	This work (Table 4)
pSU4131	pSU1425:: Tn5tac1 in <i>trwH</i>	Seubert <i>et al.</i> (2003)
pSU4132	pSU1425:: Tn5tac1 in <i>trwD</i>	Rivas <i>et al.</i> (1997)
pSU4133	pSU1425:: Tn5tac1 in <i>trwK</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)
pSU4134	pSU1425:: Tn5tac1 in <i>trwE</i>	Llosa <i>et al.</i> (2003)

Table 2. cont.

Plasmid	Description	Reference
pSU4135	pSU1425::Tn5tac1 in <i>trwF</i>	This work (Table 4)
pSU4136	pSU1425::Tn5tac1 in <i>trwJ</i>	This work (Table 4)
pSU4137	pSU1425::Tn5tac1 in <i>trwI</i>	This work (Table 4)
pT25	Cm ^R vector for T25 fusions, Rep (p15A)	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pT25zip	Positive control for two-hybrid assays	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18C	Ap ^R vector for T18 fusions, Rep (pMB1)	Karimova <i>et al.</i> (2001)
pUT18Czip	Positive control for two-hybrid assays	Karimova <i>et al.</i> (2001)

Plasmid constructions. Plasmids used are shown in Table 2. Plasmids were constructed by using standard recombinant DNA technology (Sambrook *et al.*, 1989). Inserts were obtained by restriction digestion or PCR amplification with specific oligonucleotides which created the appropriate restriction sites for cloning into the same sites of the corresponding vector. All constructions involving PCR were confirmed by DNA sequencing. Table 3 shows the oligonucleotides used, with the restriction sites introduced underlined. As template DNA for amplification, we used plasmid minipreps of R388 derivatives for R388 genes, total genomic DNA obtained as described by Bruce & Jordens (1991) for *Bs* genes, and miniprep DNA from cosmid pAB2 for *Bt* genes.

To obtain fusion proteins with the T18 and T25 domains of adenylate cyclase for two-hybrid assays, ORFs of the test proteins were placed in-frame with T18 and T25 in plasmids pUT18C and pT25 using *Bam*HI and *Kpn*I restriction sites. The only exception is *At-VirD4*, since the gene includes a *Bam*HI site, so the oligonucleotides introduced instead a *Xba*I site (T18 fusion) or *Sma*I site (T25 fusion).

To produce wild-type proteins R388-TrwE (pHP102), *Bt*-TrwE (pHP100) and *Bs*-VirB10 (pHP101), the corresponding genes were amplified with oligonucleotides that introduced *Sal*I and *Eco*RI sites

and the digested products were inserted into the same sites of vector pSU24. Expression of the inserted genes was dependent on the vector *lac* promoter.

Plasmid pFJS134 was constructed by insertion of an *Eco*RI–*Hind*III fragment from pSU4051 carrying the R388 *oriT*–*trwABC* region into the same sites of broad-host-range vector pRL662. Plasmid pFJS193 contains a 3.6 kb fragment from plasmid pSU4814 (Núñez & de la Cruz, 2001) cloned into the *Eco*RI–*Hind*III sites of pRL662; this fragment contains the mobilization region of CloDF13.

To obtain separately the two putative R388 *trw* operons present in pSU4058, we used plasmid pSU4105 (Table 2), which carries a Tn5tac1 insertion at coordinate 4101 (GenBank sequence X81123), in the intergenic region between the two proposed transcripts. The insertion lies between *trwH* and *trwI* and does not affect any *trw* gene, and in fact it was the only mutant obtained that retained sensitivity to the pilus-specific phage PRD1 (data not shown). Since the transposon has several restriction sites close to both ends and pSU4058 has *Hind*III sites at both ends of the R388 *trw* region, the 5.5 kb *Eco*RI–*Hind*III fragment and the 4 kb *Bgl*II–*Hind*III fragment from pSU4105 contained the *korA*–*trwI* and *trwH*–*trwD* regions of R388, respectively. Plasmid pHP111 was constructed by insertion of the *Eco*RI–*Hind*III fragment

Table 3. Oligonucleotides

Name	Used for construct	Sequence (5'–3')*
CYABam-B10	pT25/pUT18C: <i>At-virB10</i>	CCAGGATCCCATGAACGACGACAATCAGCA
B10stop-Kpn	pT25/pUT18C: <i>At-virB10</i>	CCAGGTACCTTATGGACGGCGATCCC
CYAXba-D4	pUT18C: <i>At-virD4</i>	CCATCTAGAGATGAATTCGAGCAAGACTAC
CYA-Sma-D4	pT25: <i>At-virD4</i>	CCACCCGGGTAATGAATTCGAGCAAGACTAC
D4stop-Kpn	pT25/pUT18C: <i>At-virD4</i>	CCAGGTACCTCATTTCACCGAGTGCGA
CYABam-BarTrwE2	pT25/pUT18C: <i>Bt-trwE</i>	CCAGGATCCAATGTTTGACAATAAGGAAGGAGA
BarTrwEstop-Kpn	pT25/pUT18C: <i>Bt-trwE</i>	CCAGGTACCTAACGTGTGACGAGACTG
CYABam-BruB10	pT25/pUT18C: <i>Bs-virB10</i>	CCAGGATCCAATGACACAGGAAAACATTC
BruB10 stop-Kpn	pT25/pUT18C: <i>Bs-virB10</i>	CCAGGTACCTCACTTCGGTTTGACATCA
SalSD-trwE	pSU24: <i>trwE</i>	CCAGTCGACAAGGAGGCAACTAATGTTCCG
trwEstop-Eco	pSU24: <i>trwE</i>	CCAGAATTCCGGTCCCCTACTTAGT
SalSD-BarTrwE	pSU24: <i>Bt-trwE</i>	CCAGTCGACGGAGGAAAATAATGTTTGACA
BarTrwEstop-Eco	pSU24: <i>Bt-trwE</i>	CCAGAATTCTCTTTTGTATAGGGTTAAC
SalSD-BruB10	pSU24: <i>Bs-virB10</i>	CCAGTCGACGGGAGGAAACCTGCAATGAC
BruB10stop-Eco	pSU24: <i>Bs-virB10</i>	CCAGAATTCTCACTTCGGTTTGACATCA
Eco-KorA	pSU18: <i>korA</i>	CCAGAATTCAAGGGCCAACCAAAATG
KorAstop-Bam	pSU18: <i>korA</i>	CCAGGATCCGTTAGCTTTCGCCCGGA

*New restriction sites are underlined.

from pSU4105 into the same sites of vector pHG329. Plasmid pHP109 carries the R388 *trwH-trwD* operon in vector pSU18. Since this operon includes a Kil function (Bolland *et al.*, 1990), the plasmid was constructed in two steps: first, the *korA* gene from R388 was PCR-amplified and cloned into the *EcoRI-BamHI* sites of vector pSU18, selecting for the orientation that allows KorA expression from the vector lactose promoter; second, the *BglII-HindIII* fragment from pSU4105 was inserted into the *BamHI-HindIII* sites of the previous construction. These plasmids were maintained in strain D1210, which has a chromosomal *lacI^d* gene, to avoid toxicity by expression of the *trw* genes from the vector *lac* promoter.

Two-hybrid assay. Strain DHM1 was co-transformed with plasmids bearing a T25 and a T18 fusion. Three independent transformants were grown together overnight in liquid medium at 30 °C, then 10 µl samples of these cultures were spread on sectors of X-Gal-containing plates to observe and compare the blue colour. β -Galactosidase levels were measured on 100 µl samples as described by Miller (1992). All experiments included positive and negative controls. Plasmid pSU4111 (Moncalián *et al.*, 1997), which carries *lacZ* under the control of the lactose promoter, produced about 6000 Miller units in this system.

Quantitative mating assays. Samples (100 µl, or 1 ml in the case of matings involving *Bs* strains) of overnight cultures of donor and recipient strains were mixed; cells were collected and placed on 0.22 µm filters on prewarmed agar plates for 1 h at 37 °C. When indicated, IPTG (0.5 mM) was added to the agar plate. To induce expression of *Bs virB* genes by low pH (Boschiroli *et al.*, 2002), the *Bs* pellets were resuspended in 1 ml MM broth at pH 4.5 (Rouot *et al.*, 2003), and incubated for 4 h at 37 °C with shaking prior to mating. Plating was done in selective medium for both donor cells and transconjugants. Transfer frequencies are expressed as the number of transconjugants per donor cell. The data reported are the mean of at least two independent assays. Mean values were calculated as simple means of the logarithm of the frequencies obtained, followed by calculation of the anti-logarithm of this mean value.

Transposon mutagenesis. *In vivo* insertional mutagenesis with transposon Tn5tacl was carried out as described by Chow & Berg (1988) on plasmid pSU4058. Selected transposon insertions were then transferred to plasmid pSU1425 by homologous recombination using strain JC7623, as previously described (Llosa *et al.*, 1994).

Bacteriophage PRD1 sensitivity assays. Sensitivity to the pilus-specific phage PRD1 was assayed as previously described (Bolland *et al.*, 1990).

Cell extracts for protein analysis. Bacterial cultures (50 ml) in early stationary phase were harvested at 4500 r.p.m. for 15 min. Bacterial pellets were resuspended in 500 µl PBS buffer containing 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and 10 mM benzamidine. The suspensions were transferred to chilled FASTPREP tubes containing glass beads (lysing matrix B) and cells lysed in a FASTPREP FP120 instrument (Bio 101 Thermo Savant) at a speed of 6.0 for two cycles of 30 s. Cell supernatants were harvested by centrifugation at 13 000 r.p.m. for 15 min at 4 °C. Protein concentrations were quantified by the Bradford method using decimal dilutions of BSA as a standard, and kept frozen at -80 °C.

Immunoblot analysis. Samples (20 µg) of total protein from each of the *Bs* cell lysates were run in 12% (w/v) SDS-PAGE. After the run, protein samples were transferred from the SDS-PAGE gel to a PVDF membrane (Bio-Rad) (Towbin *et al.*, 1979), and blocked using 3% (w/v) bovine serum albumin (Sigma) in TBST. Incubation with primary antibody was performed for 1 h at room temperature using rabbit polyclonal antibodies at the following dilutions: anti-TrwC (Grandoso *et al.*, 1994), 1:10 000; anti-TrwD

(Rivas *et al.*, 1997), 1:5000; anti-TrwF (Sastre, 1996; Seubert *et al.*, 2003), 1:20 000. The secondary antibody was goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (1:2000 dilution) (Pierce). Blots were then developed with SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce), and either exposed to Hyperfilm MP (Amersham), or quantified by using the Chemidoc system and Quantity One software (Bio-Rad).

RESULTS

Protein-protein interactions between T4CP and pT4SS

Previous work showed that the strength of a T4CP-VirB10-like interaction correlates with the ability of a given cT4SS to serve as a conduit for the heterologous substrates driven by the T4CP (Llosa *et al.*, 2003). Using the bacterial two-hybrid assay (Karimova *et al.*, 1998), we tested for protein-protein interactions between T4CPs and VirB10-like elements of different pT4SS. To the elements previously analysed from the cT4SS of plasmids R388, pKM101 and R6K (Llosa *et al.*, 2003), we added those of the pT4SS VirB of *At*, Trw of *Bt* and VirB of *Bs*. The different T4CPs and VirB10s obtained from the pT4SS were expressed as fusion proteins with the T18 and T25 domains of adenylate cyclase (*Cya*). *Cya* domains were always placed at the N-terminus, since both T4CPs and VirB10 homologues are expected to have their N-termini in the cytoplasm, where the combined T18 + T25 can form an active *Cya*. Two-hybrid assays were performed with all pairs of proteins. Protein interactions, detected by development of blue colour on X-Gal-containing plates, were confirmed by measuring β -galactosidase activity.

Fig. 2 shows a summary of the results obtained. All interactions were made reciprocal (with each protein fused to the T25 or the T18 *Cya* domains) and no significant differences were found in any of the pairs (data not shown). The T4CP protein *At* VirD4 did not interact with any of the other fusion proteins. We do not have a way of testing the integrity of the protein, so no conclusions can be drawn from this negative result. The remaining constructions tested showed interactions with one another. VirB10 homologues interacted with themselves and with each other, as previously observed for the VirB10 members of cT4SS (Llosa *et al.*, 2003). The main result was the existence of interactions between the conjugative T4CPs (TrwB, TraJ and TaxB) and the VirB10 components of pT4SS (*At*, *Bt* and *Bs*). Interactions with their cognate VirB10 homologues (TrwE, TraF and PilX10) are also shown for comparison, although in the absence of protein quantification the results are considered only qualitative.

We performed complementation tests of an R388 *trwE* mutant that is transfer-deficient (pSU4134; Table 2) with the various VirB10-like proteins used in the two-hybrid assays to further confirm the interactions detected in Fig. 2. Plasmids were constructed that carry the R388-*trwE*, *Bt-trwE* and *Bs-virB10* wild-type genes with appropriate expression signals under the control of the vector *lac*

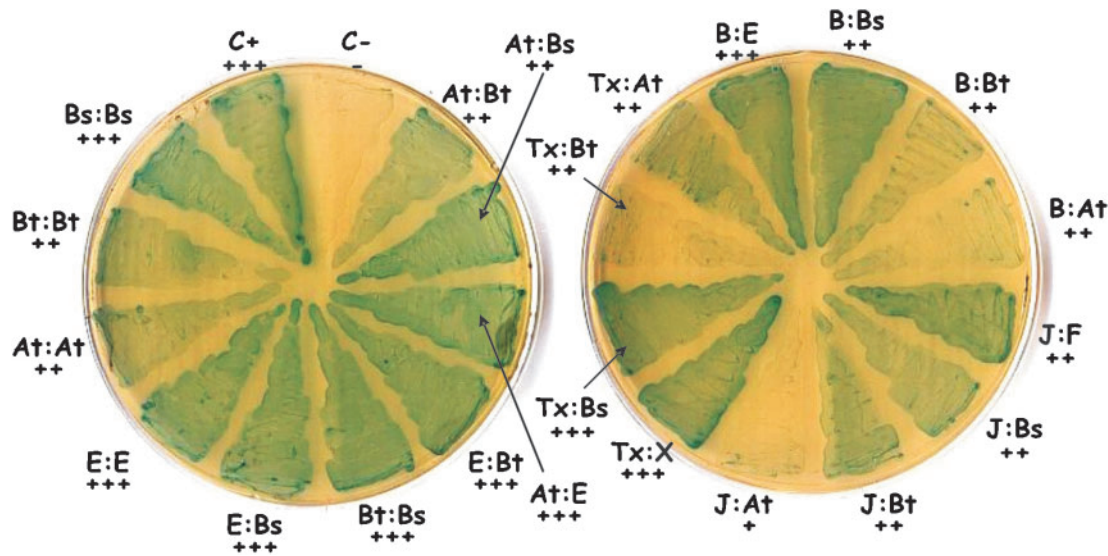


Fig. 2. Two-hybrid interactions among T4CP and VirB10 homologues of various T4SS. Strain *Ec* DHM1 (*cya*) was transformed with plasmids encoding T25 and T18 fusions. Co-transformants were grown at 30 °C and spread on sections of LB plates supplemented with antibiotics and X-Gal for colour development. β -Galactosidase activity was calculated in Miller units and is summarized as follows: +++, >1000 units; ++, 100–1000 units; +, 20–100 units; -, <20 units. Key plasmid pairs are shown in the figure and labelled in the format T18:T25 fusions with the following abbreviations: At, *At*-VirB10; Bs, *Bs*-VirB10; Bt, *Bt*-TrwE; B, R388-TrwB; E, R388-TrwE; J, pKM101-TraJ; F, pKM101-TraF; Tx, R6K-TaxB; X, R6K-PilX10; C+ and C-, positive and negative controls (T18zip:T25zip and T18:T25zip, respectively).

promoter (plasmids pHP102, pHP100 and pHP01; Table 2). The R388 *trwE* mutant was complemented by R388-TrwE *in trans* although the conjugation efficiency decreased more than one log compared to wild-type R388. The non-polar effect of the *trwE* insertion mutation was confirmed by complementation by a *trwD* mutant (pSU4063) to wild-type levels. The same frequency was obtained when matings were done in the presence of IPTG to increase *trwE* expression (data not shown). Since TrwE forms part of a multiprotein complex it might need to be co-expressed with other components of the complex for optimal efficiency. Requirement for tight regulation of the *Bt*-*trwE* copy number has been reported (Seubert *et al.*, 2003).

With respect to heterologous complementations, we did not detect significant complementation with *Bs*-VirB10. However, there was a low but consistent complementation by *Bt*-TrwE, the closest homologue to R388-TrwE. The transfer efficiency of the R388 *trwE* mutant when complemented with *Bt*-TrwE was 100 times lower than when complemented with R388-TrwE. Similar frequencies were obtained in the presence of IPTG (not shown). Thus, the interaction observed between R388-TrwB and *Bt*-TrwE could reflect a functional interaction since *Bt*-TrwE can partially substitute for R388-TrwE.

Analysis of the R388 Trw region

The DNA sequence of the R388 T4SS genetic region (GenBank accession no. X81123) includes 11 genes, named

trwN to *trwD*, with homology to *virB1* to *virB11* respectively, plus four additional ORFs presumably involved in entry exclusion (*eex*) and regulation functions (*korA*, *orf34* and *korB*) (Bolland *et al.*, 1990 and our unpublished results). Fig. 1 shows a detailed map of this region. The role of *trwN* in R388 conjugation remains to be determined, since full transfer efficiency was obtained without this gene (Bolland *et al.*, 1990). Analysis of the DNA sequence suggested that this region is organized in four operons: *korB* (which is transcribed in the opposite direction to the rest of the genes), *trwN*-*orf34*, *korA*-*trwI*, and *trwH*-*trwD*. This assumption is based first on the arrangement of the genes within each proposed transcript, suggesting translational coupling, while two intergenic regions of more than 100 bp are found between each proposed transcript (225 bp between *trwN* and *korA*, and 112 bp between *trwI* and *trwH*); second, on the presence of sequences with homology to the consensus promoter 5' of each proposed transcript; and third, the three putative promoter regions are defined by the presence of 'kor boxes' (shown as dashed vertical lines in Fig. 1), presumed transcription control sites by the Kor proteins (R. Fernández, C. Revilla, M. P. Garcillán & F. de la Cruz, unpublished), that are shared by the homologous T4SS of plasmid pKM101 and *Bt*-Trw (More *et al.*, 1996; Seubert *et al.*, 2003). From now on we will refer to the two putative operons containing the R388 T4SS genes as 'trw region 1' (*korA*-*trwI*) and 'trw region 2' (*trwH*-*trwD*).

In order to analyse this R388 region in detail, we obtained Tn5tac1 insertion mutants along the R388 DNA segment

Table 4. Selected Tn5tac1 insertion mutants in the R388 T4SS genetic region

Insertion in pSU4058 (<i>trwL-trwD</i>)	Disrupted gene	Coords.*	Same insertion in R388†	Transfer frequency with helper plasmid‡				
				None	pSU4058 (<i>trwL-D</i>)	pHP109 (<i>trwH-D</i>)	pHP111 (<i>trwL-I</i>)	pHP109 + pHP111 (<i>trwL-I + trwH-D</i>)
pSU4065	<i>trwL</i>	8931	pSU4130	$< 10^{-6}$	2.6×10^{-1}	ND	8.6×10^{-5}	1.0×10^{-2}
pSU4064	<i>trwK</i>	7271	pSU4133	$< 10^{-6}$	8.0×10^{-2}	ND	3.2×10^{-4}	8.4×10^{-3}
pSU4082	<i>trwJ</i>	5920	pSU4136	$< 10^{-6}$	9.0×10^{-2}	ND	5.0×10^{-2}	1.0×10^{-2}
pSU4089	<i>trwI</i>	4686	pSU4137	$< 10^{-6}$	3.3×10^{-1}	ND	2.3×10^{-3}	1.8×10^{-2}
pSU4078	<i>trwH</i>	3974	pSU4131	5.2×10^{-5}	1.5×10^{-1}	1.6×10^{-3}	ND	1.6×10^{-2}
	<i>trwG</i>	3800	pSU4035§	$< 10^{-6}$	5.1×10^{-2}	ND	ND	ND
pSU4070	<i>trwF</i>	2897	pSU4135	$< 10^{-6}$	3.0×10^{-1}	7.0×10^{-3}	ND	2.2×10^{-2}
pSU4067	<i>trwE</i>	1622	pSU4134	$< 10^{-6}$	1.8×10^{-1}	7.9×10^{-3}	ND	9.8×10^{-3}
pSU4063	<i>trwD</i>	622	pSU4132	$< 10^{-6}$	1.2×10^{-1}	9.1×10^{-3}	ND	3.5×10^{-2}

*Coordinates at the site of Tn5tac1 insertion (GenBank X81123). The transposon duplicates 9 bp upon insertion. The site of insertion has been considered 3' to the 9 bp repeat closer to the 5' end of the gene.

†Mutations were transferred to the R388 derivative pSU1425 by homologous recombination, as explained in Methods.

‡Each R388 insertion mutant was introduced into *Ec* D1210 with the indicated helper plasmids for complementation, and mated with *Ec* DH5 α . Plasmid pSU4058 carries the complete *trw* region, and plasmids pHP109 and pHP111 carry putative operons 1 and 2, respectively (see text for further details). Transfer frequencies are expressed as number of transconjugants per donor cell; ND, not determined.

§pSU4035 is a Ω insertion mutant of pSU1087 (Table 2); the exact coordinates of the insertion were not determined. pSU4035 could not be assayed for complementation by pHP109 since both plasmids have a p15A replicon.

present in plasmid pSU4058, which includes *trw* regions 1 and 2. Tn5tac1 insertions have been shown to be non-polar (Llosa *et al.*, 1991), so mutations are expected to affect only the target ORF, unless high levels of expression of the gene are required for its normal functioning. Insertions were obtained in all *trw* genes except for *trwG* and *trwM*. A *trwG* mutant was obtained from a previous collection of mutants by insertion of interposon Ω along the *trw* region (Bolland *et al.*, 1990). All insertions affecting a *trw* gene conferred resistance to the pilus-specific phage PRD1. Selected insertions mapping in each gene (shown in Fig. 1) were transferred to R388 by homologous recombination to test for their conjugation frequency (see relevant plasmid pairs in Table 4). The *trwG* mutation was already in a plasmid containing the whole R388 transfer region. The nine mutants with insertions in different *trw* genes were transfer-deficient, except the mutant in *trwH*, which conjugated about 1000-fold less efficiently than wild-type (Table 4). All were complemented to wild-type frequencies by pSU4058, which provides the whole *korA-trwD* region (Table 4). We confirmed the non-polar character of these mutants by showing full complementation of mutant pairs in adjacent genes in all cases (e.g. pSU4130 + pSU4064, see Table 4; data not shown).

We next dissected the T4SS region into two segments corresponding to *trw* regions 1 and 2 (plasmids pHP111 and pHP109, respectively; Fig. 1). In order to check for the integrity and functionality of both putative operons when expressed separately, we performed mobilization assays of plasmid pFJS134, containing the R388 *oriT-trwABC* region in a compatible vector. pFJS134 was mobilized from strain

Ec D1210 by plasmid pSU4058 (containing the *korA-trwD* region) at a frequency of 1.1×10^{-1} transconjugants per donor and it was mobilized with a similar frequency in the presence of plasmids pHP109 + pHP111, providing *trw* regions 1 and 2 (2.1×10^{-1} transconjugants per donor), thus providing evidence that a functional T4SS is assembled when the two putative operons are expressed separately.

We also assayed complementation of the R388 insertion mutants by each putative *trw* operon separately, as shown in Table 4. All mutants were complemented to some extent; however, complementation levels were significantly lower than when complemented by pSU4058. When both pHP109 and pHP111 plasmids were present, complementation levels were higher, but still about 10 times lower than when complemented by pSU4058.

Functional interactions between R388 cT4SS and *Bs* pT4SS

In order to detect possible functional relationships between the R388 and *Brucella* T4SS, a series of matings were performed using *Bs* strains as donors harbouring R388 or its mobilizable derivatives. R388 conjugated from *Bs* as efficiently as from *Ec* (about 10^{-1} transconjugants per donor). None of the R388 insertion mutants was mobilized from *Bs* significantly better than from *Ec* donors (data not shown), suggesting that individual T4SS components cannot be exchanged between the two T4SS. We did not detect conjugative transfer of a plasmid carrying the R388 *oriT-trwABC* region (pFJS134) through the intact *Bs* T4SS. We assayed mobilization of pFJS193, a plasmid containing

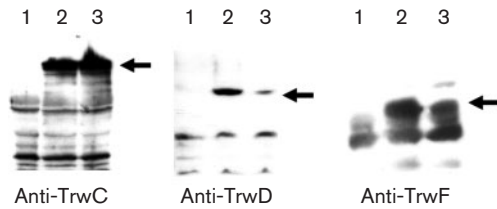


Fig. 3. Immunoblots showing Trw protein levels in cell extracts from *Bs* 1330 (sample 1), *Bs* 1330 (pSU2007) (sample 2) and *Bs* 1330 *virB5::Kan* (pSU2007) (sample 3). Sample preparation and Western blotting were performed as described in Methods. The primary antibody used is indicated at the bottom of each blot. Arrows indicate the expected size of the corresponding Trw protein.

the mobilization region of plasmid CloDF13, in order to test if *Bs*-T4SS could be used by a mobilizable plasmid rather than a conjugative system, since the former are more flexible in the use of T4SS. pFJS193 was not mobilized by the *Bs* T4SS either.

We assayed a *Bs virB5* mutant that contains a polar mutation in *virB5* (Boschiroli *et al.*, 2002; O'Callaghan *et al.*, 1999). Thus, in this strain presumably only the VirB1 to VirB4 proteins are produced and no functional T4SS is assembled. Consequently, the strain is avirulent in cellular models of infection (O'Callaghan *et al.*, 1999). When R388 was mobilized from this strain, the transfer frequency dropped drastically to 10^{-6} transconjugants per donor. We determined R388 Trw protein levels in both wild-type and *virB5* *Bs* strains harbouring R388. Fig. 3 shows immunoblots of cell extracts from *Bs* strains probed with anti-TrwC, anti-TrwD and anti-TrwF antibodies. It can be observed that, while the amount of TrwC (the conjugative relaxase) remains constant in both wild-type and *virB5* strains, the levels of the T4SS components TrwD and TrwF are diminished significantly. We calculated a 17-fold decrease in the amount of TrwD in the *Bs virB5* mutant compared to wild-type. Quantification of TrwF was not accurate due to non-specific binding of the anti-TrwF antibody to proteins of a size similar to TrwF (Fig. 3).

Heterologous complementation between components of the R388 and *Bt* T4SS

The Trw T4SS of R388 and *Bt* are the closest family members according to DNA sequence identity, yet they are a cT4SS and a pT4SS, respectively. Analyses of the functional relationships between these two T4SS are thus especially relevant. In previous sections we have shown that *Bt-trwE* is the only VirB10 homologue capable of complementing a R388 *trwE* mutant. We extended this analysis with a series of complementation assays using plasmid pAB2, which carries the whole *trw* locus from *Bt* to a cosmid that can replicate in *Ec*, and the R388 insertion mutants described in Table 4. Results are shown in Table 5. R388 derivatives with mutations in *trwD*, *trwE*, *trwF*, *trwG* and *trwH* showed a

Table 5. Complementation of R388 T4SS mutants

Plasmids in the first column were introduced in *Ec* D1210 and mated with *Ec* DH5 α . Plasmids pSU4130 to 4137 are described in Table 4.

Plasmids in donor	R388 Trw	<i>Bt</i> T4SS	Transfer frequency
pSU4130	All but TrwL	–	$<10^{-6}$
pSU4130 + pAB2	All but TrwL	+	$<10^{-6}$
pSU4133	All but TrwK	–	$<10^{-6}$
pSU4133 + pAB2	All but TrwK	+	$<10^{-6}$
pSU4136	All but TrwJ	–	$<10^{-6}$
pSU4136 + pAB2	All but TrwJ	+	$<10^{-6}$
pSU4137	All but TrwI	–	$<10^{-6}$
pSU4137 + pAB2	All but TrwI	+	$<10^{-6}$
pSU4131	All but TrwH	–	5.2×10^{-5}
pSU4131 + pAB2	All but TrwH	+	1.6×10^{-4}
pSU4035	All but TrwG	–	$<10^{-7*}$
pSU4035 + pAB2	All but TrwG	+	2.9×10^{-6}
pSU4135	All but TrwF	–	$<10^{-6}$
pSU4135 + pAB2	All but TrwF	+	1.7×10^{-5}
pSU4134	All but TrwE	–	$<10^{-6}$
pSU4134 + pAB2	All but TrwE	+	1.1×10^{-5}
pSU4132	All but TrwD	–	$<10^{-6}$
pSU4132 + pAB2	All but TrwD	+	2.1×10^{-2}
pSU1423† + pSU4058	TrwABC + TrwL-D	–	4×10^{-1}
pSU1423† + pAB2	TrwABC	+	$<10^{-6}$
pSU1423† +	TrwABC + TrwL-I	+	$<10^{-6}$
pHP111 + pAB2			
pSU4051† +	TrwABC + TrwH-D	+	$<10^{-6}$
pHP109 + pAB2			

*Matings were scaled up to better discriminate between a low transfer frequency and the negative control.

†Plasmids pSU1423 and pSU4051 contain the same R388 region, but in different replicons (see Table 2).

significant increase in transfer efficiency in the presence of plasmid pAB2, while those with mutations in *trwI*, *trwJ*, *trwK* and *trwL* remained transfer-deficient. In order to rule out the possibility that recombination had taken place between the two *trw* regions, transconjugants from the above matings were checked for tetracycline sensitivity and were also used as donors in a new round of conjugations; the results confirmed that transconjugants remained transfer-deficient.

We next tried to mobilize an R388 derivative by the *Bt*-T4SS (Table 5). Plasmid pSU1423 carries R388 *oriT* + *trwABC* and could be readily mobilized by a plasmid containing *trwL* to *trwD* (pSU4058). However, we could not detect mobilization of plasmid pSU1423 by the *Bt-trw* locus present in plasmid pAB2. Since complementation of R388 single mutants by pAB2 was observed only for mutations lying in the *trwH*–*trwD* putative operon, plasmids containing *oriT* + *trwABC* were assayed for mobilization by pAB2 in the presence of an additional plasmid carrying one of the

two R388 *trw* regions (either pHP111 or pHP109). The pAB2 plasmid did not provide the remaining functions in either case (Table 5).

DISCUSSION

In this work we have analysed the functional interactions between cT4SS and pT4SS in order to better understand their constituent genetic modules and the level of functional conservation among their individual protein components.

Our model cT4SS is the R388 Trw system. Its T4SS genetic determinant comprises genes *trwL*–*trwD* (Fig. 1). The adjacent gene *trwN* is a homologue of the VirB1-type components of other T4SS; however, to date there is no evidence that *trwN* is required for R388 conjugal transfer (Bolland *et al.*, 1990), so we have excluded this gene from our analysis. Non-polar insertion mutations proved that genes *trwD*, *E*, *F*, *G*, *I*, *J*, *K* and *L* are essential for R388 conjugation; an insertion in *trwH* renders a plasmid that can self-transfer with very low efficiency (Table 4). Analysis of the DNA sequence strongly suggests that the *trwL*–*D* genes are expressed from two transcriptional units: *korA*–*trwI* and *trwH*–*trwD*. The functionality of the promoter upstream of *trwH* has been shown for the homologous regions in *Bt*-Trw and conjugative plasmid pKM101 (More *et al.*, 1996; Seubert *et al.*, 2003). We have shown that expression of each putative operon from different replicons allows the assembly of a functional T4SS, as tested by high-efficiency mobilization of a plasmid carrying R388 *oriT*–*trwABC* (pFJS134).

It was previously reported that conjugative T4CPs could interact with VirB10 homologues from other cT4SS, and moreover the strength of this interaction affected the efficiency of DNA mobilization (Llosa *et al.*, 2003). We extended the analysis of this interaction to the pT4SS of *At*, *Bt* and *Bs*. By two-hybrid analysis we have shown that conjugative T4CPs interact similarly with VirB10 homologues from pT4SS. VirB10 proteins interact with themselves and with each other, from both pT4SS and cT4SS. Thus, these interactions are conserved even in T4SS that do not have any known T4CP, such as *Bt* and *Bs*. In the case of *Bt*, it cannot be excluded that the T4CP from the VirB T4SS is being used by both coexisting T4SS (Schröder & Dehio, 2005).

The interaction detected between TrwB and *Bt*-TrwE (the closest TrwE homologue according to the amino acid sequence) may also reflect a functional interaction since *Bt*-TrwE could partially complement an R388-*trwE* mutation. This complementation adds evidence to previous work showing that *Bt*-*trwD* and *Bt*-*trwH* could complement *trwD* and *trwH* mutations in R388 (Seubert *et al.*, 2003), underscoring the functional similarity between the R388- and *Bt*-Trw T4SS. This prompted us to extend the complementation analysis between these two systems. As shown in Table 5, several R388 *trw* mutants could conjugate at low efficiency in the presence of pAB2, a cosmid providing the whole *Bt*-*trw* region. It is noteworthy that complementation is observed only for genes belonging to R388 *trw*

region 2. The conservation of gene synteny is frequently due to the need for co-expression of gene products that strongly depend on each other for function. Region 2 encodes the more conserved elements of the T4SS apparatus, the ‘core’ components, which may play a similar function in both systems and could thus be exchanged to a certain extent. On the other hand, the T4SS components encoded in region 1 may be system-specific. For instance, the pilus components (TrwL and TrwJ) could be responsible for specific interactions with the recipient cells.

Possible functional relationships between R388-Trw and *Bs*-VirB T4SS were also addressed. *Bs* T4SS did not complement any of the R388 T4SS individual mutants, not surprisingly considering that the similarity between these two T4SS is significantly lower than that between the R388- and *Bt*-Trw T4SS. However, when a *Bs virB5* polar mutant was used as a donor, a strong dominant negative effect was exerted on R388 transfer. Dominant negative effects are typical of proteins that make oligomers. The results suggest that when components of the *Bs*-T4SS cannot assemble into their own T4SS, they interact with the related R388 Trw proteins, resulting in non-functional heteromultimers. The unassembled Trw proteins are probably destabilized, leading to diminished cellular levels of the R388 T4SS proteins (Fig. 3). The poisoning effect could be mediated for example by VirB2, the homologue to the major pilus component. Pili are made up of a high number of pilin subunits and interference by a low number of heterologous pilin subunits could impede T4SS assembly, thus explaining the strong interference observed.

The existence of interactions between cT4SS and pT4SS components opens up the attractive possibility that DNA substrates recruited by the T4CPs could be coupled to pT4SS, so pathogens could be used as intracellular DNA delivery tools. So far, our attempts to use the pT4SS of both *Bs* and *Bt* to mobilize R388 derivatives lacking their cognate T4SS have had no success. Substrate selection by T4SS probably depends on more than a single protein–protein interaction. Each T4SS component interacts with several other components of the secretion machinery (Ward *et al.*, 2002). Recent results on the *At* T4SS show that formation of the VirB9–VirB10 complex is essential for T-DNA substrate selection and translocation through the distal portion of the secretion channel (Cascales & Christie, 2004a, b; Jakubowski *et al.*, 2005). The partial functional exchanges found between the R388 and *Bt* T4SS open up the way for mutagenesis experiments in order to obtain mutant T4CPs that better interact with selected pT4SS components or subassemblies. The study of these two highly related T4SS will also help in understanding the similarities and differences between cT4SS and pT4SS.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Ana M. Cayón and Jorge Díaz for technical assistance, to Dr David O’Callaghan (INSERM, France) for providing

strains *Bs* 1330 and *Bs* 1330 *virB5*, and to Dr Iñaki Sastre for providing anti-TrwF antibody. Work in the authors' laboratories was supported by grants BIO2002-00063, BMC2002-00379 and BIO2004-06167 from the MEC (Spain) to M.L., F.C. and F.J.S., respectively; by grant QLK-CT-2001-01200 from the EC to J.M.G.; and by grant API04/09 from Fundación Marqués de Valdecilla to F. J. S. H. P. was supported by a predoctoral fellowship from Fundación Marqués de Valdecilla.

REFERENCES

- Alegria, M. C., Souza, D. P., Andrade, M. O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., da Silva, A. C. & Farah, C. S. (2005). Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* **187**, 2315–2325.
- Atmakuri, K., Ding, Z. & Christie, P. J. (2003). VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **49**, 1699–1713.
- Atmakuri, K., Cascales, E. & Christie, P. J. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* **54**, 1199–1211.
- Baron, C., Thorstenson, Y. R. & Zambryski, P. C. (1997). The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **179**, 1211–1218.
- Bartolomé, B., Jubete, Y., Martínez, E. & de la Cruz, F. (1991). Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**, 75–78.
- Beaupre, C. E., Bohne, J., Dale, E. M. & Binns, A. N. (1997). Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol* **179**, 78–89.
- Berger, B. R. & Christie, P. J. (1994). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J Bacteriol* **176**, 3646–3660.
- Bolland, S., Llosa, M., Avila, P. & de la Cruz, F. (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.
- Boschiroli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V. & 7 other authors (2002). The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1544–1549.
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**, 459–472.
- Bruce, K. D. & Jordens, J. Z. (1991). Characterization of noncapsulate *Haemophilus influenzae* by whole-cell polypeptide profiles, restriction endonuclease analysis, and rRNA gene restriction patterns. *J Clin Microbiol* **29**, 291–296.
- Cabezón, E., Sastre, J. I. & de la Cruz, F. (1997). Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet* **254**, 400–406.
- Cascales, E. & Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial Type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**, 137–149.
- Cascales, E. & Christie, P. J. (2004a). Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**, 1170–1173.
- Cascales, E. & Christie, P. J. (2004b). *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17228–17233.
- Chow, W. Y. & Berg, D. E. (1988). Tn5tac1, a derivative of transposon Tn5 that generates conditional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6468–6472.
- Das, A. & Xie, Y. H. (2000). The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J Bacteriol* **182**, 758–763.
- Das, A., Anderson, L. B. & Xie, Y. H. (1997). Delineation of the interaction domains of *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 by use of the yeast two-hybrid assay. *J Bacteriol* **179**, 3404–3409.
- Farizo, K. M., Cafarella, T. G. & Burns, D. L. (1996). Evidence for a ninth gene, *ptII*, in the locus encoding the pertussis toxin secretion system of *Bordetella pertussis* and formation of a PtlI-PtlF complex. *J Biol Chem* **271**, 31643–31649.
- Gomis-Rüth, F. X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezón, E., de la Cruz, F. & Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**, 637–641.
- Grandoso, G., Llosa, M., Zabala, J. C. & de la Cruz, F. (1994). Purification and biochemical characterization of TrwC, the helicase involved in plasmid R388 conjugal DNA transfer. *Eur J Biochem* **226**, 403–412.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645–4649.
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P. C. & Baron, C. (2000). VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **182**, 4505–4511.
- Hoppner, C., Liu, Z., Domke, N., Binns, A. N. & Baron, C. (2004). VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **186**, 1415–1422.
- Jakubowski, S. J., Krishnamoorthy, V., Cascales, E. & Christie, P. J. (2004). *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion. *Syst J Mol Biol* **341**, 961–977.
- Jakubowski, S. J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V. & Christie, P. J. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a Type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol* **187**, 3486–3495.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5752–5756.
- Karimova, G., Ullmann, A. & Ladant, D. (2001). Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 73–82.
- Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D. (2005). Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**, 2233–2243.
- Koraimann, G. (2003). Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2371–2388.
- Krall, L., Wiedemann, U., Unsin, G., Weiss, S., Domke, N. & Baron, C. (2002). Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11405–11410.

- Kumar, R. B., Xie, Y. H. & Das, A. (2000). Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol Microbiol* **36**, 608–617.
- Kushner, S. R., Nagaishi, H., Templin, A. & Clark, A. J. (1971). Genetic recombination in *Escherichia coli*: the role of exonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 824–827.
- Lai, E. M. & Kado, C. I. (1998). Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **180**, 2711–2717.
- Llosa, M. & de la Cruz, F. (2005). Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res Microbiol* **156**, 1–6.
- Llosa, M. & O'Callaghan, D. (2004). Euroconference on the biology of Type IV secretion processes: bacterial gates into the outer world. *Mol Microbiol* **53**, 1–8.
- Llosa, M., Jubete, Y. & de la Cruz, F. (1991). Tn5tacl insertion polarity in *Escherichia coli*. *Plasmid* **26**, 222–224.
- Llosa, M., Bolland, S. & de la Cruz, F. (1994). Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* **235**, 448–464.
- Llosa, M., Zunzunegui, S. & de la Cruz, F. (2003). Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10465–10470.
- Martínez, E. & de la Cruz, F. (1988). Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol Gen Genet* **211**, 320–325.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics: a Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Moncalián, G., Grandoso, G., Llosa, M. & de la Cruz, F. (1997). *oriT*-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **270**, 188–200.
- More, M. I., Pohlman, R. F. & Winans, S. C. (1996). Genes encoding the pKM101 conjugal mating pore are negatively regulated by the plasmid-encoded KorA and KorB proteins. *J Bacteriol* **178**, 4392–4399.
- Núñez, B. & de la Cruz, F. (2001). Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Mol Microbiol* **39**, 1088–1099.
- O'Callaghan, D., Cazevieuille, C., Allardet-Servent, A., Boschirolì, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. & Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* **33**, 1210–1220.
- Rivas, S., Bolland, S., Cabezón, E., Goñi, F. M. & 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.
- Rouot, B., Alvarez-Martinez, M. T., Marius, C. & 7 other authors (2003). Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect Immun* **71**, 1075–1082.
- Sadler, J. R., Tecklenburg, M. & Betz, J. L. (1980). Plasmids containing many tandem copies of a synthetic lactose operator. *Gene* **8**, 279–300.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sastre, J. I. (1996). *El extremo carboxilo de la proteína TraD del plásmido F confiere especificidad y eficiencia en el proceso de la conjugación*. PhD Thesis, Universidad de Cantabria.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N. & Baron, C. (1999). TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 5563–5571.
- Schröder, G. & Dehio, C. (2005). Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends Microbiol* **13**, 336–342.
- Seubert, A., Hiestand, R., de la Cruz, F. & Dehio, C. (2003). A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**, 1253–1266.
- Shamaei-Tousi, A., Cahill, R. & Frankel, G. (2004). Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* **186**, 4796–4801.
- Spudich, G. M., Fernandez, D., Zhou, X. R. & Christie, P. J. (1996). Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7512–7517.
- Stewart, G. S., Lubinsky-Mink, S., Jackson, C. G., Cassel, A. & Kuhn, J. (1986). pHG165: a pBR322 copy number derivative of pUC8 for cloning and expression. *Plasmid* **15**, 172–181.
- Tato, I., Zunzunegui, S., de la Cruz, F. & Cabezón, 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.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350–4354.
- Vergunst, A. C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C. M., Regensburg-Tuink, T. J. & Hooykaas, P. J. (2000). VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**, 979–982.
- Ward, D. V., Draper, O., Zupan, J. R. & Zambryski, P. C. (2002). Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11493–11500.

Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB

Héctor D. de Paz, Delfina Larrea, Sandra Zunzunegui, Christoph Dehio¹, Fernando de la Cruz, and Matxalen Llosa*

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

¹ Focal Area Infection Biology, Biozentrum, Universität Basel, Switzerland.

*Corresponding author. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, C. Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. Phone: +34 942201957. Fax: +34 942201945. e-mail: llosam@unican.es

Running title: Functional dissection of T4CP TrwB

Keywords: bacterial conjugation / coupling protein / type IV secretion / plasmid R388 / site-directed mutagenesis

Abbreviations used: AAD, all-alpha domain; ICH, internal channel; NBD, nucleotide binding domain; TMD, transmembrane domain; *P_{trwA}*, natural R388 promoter for the *trwABC* operon; T4CP, coupling protein; T4SS, type IV secretion system; TrwEBt, *Bartonella tribocorum* TrwE protein.

Abstract

The conjugative coupling protein TrwB is responsible for connecting the relaxosome to the type IV secretion system during conjugative DNA transfer of plasmid R388. It is directly involved in transport of the relaxase TrwC, and it displays an ATPase activity probably involved in DNA pumping. We designed a conjugation assay in which the frequency of DNA transfer is directly proportional to the amount of TrwB. A collection of point mutants was constructed in TrwB cytoplasmic domain on the basis of the crystal structure of TrwB Δ N70, targeting the NTP-binding region, the cytoplasmic surface, or the internal channel in the hexamer. An additional set of transfer-deficient mutants was obtained by random mutagenesis. Most mutants were impaired in both DNA and protein transport. We found that the integrity of the nucleotide binding domain is absolutely required for TrwB function, being also involved in monomer-monomer interactions. Polar residues surrounding the entrance and inside the internal channel are important for TrwB function, and may be involved in interactions with the relaxosomal components. Finally, the N-terminal transmembrane domain of TrwB was subjected to random mutagenesis followed by a two-hybrid screen for mutants showing enhanced protein-protein interactions with the related TrwE protein of *Bartonella tribocorum*. Several point mutants were obtained in the transmembranal helices; specifically, one Proline from each protein may be the key residue involved in the interaction of the coupling protein with the type IV secretion apparatus.

Introduction

Bacterial conjugation can be viewed mechanistically as a rolling-circle replication system linked to a type IV secretion process. The two processes come into contact through the activity of a protein that couples the plasmid replication machinery to the export system in the membrane, allowing horizontal dissemination of the replicating DNA molecule (32). This key protein is called coupling protein (T4CP). It is present in all conjugative systems as well as in many type IV secretion systems (T4SS) involved in bacterial virulence (14). The secreted substrate in bacterial conjugation is the relaxase or pilot protein, attached to the DNA strand. The shoot-and-pump model for bacterial conjugation proposes that, after secretion of the protein through the T4SS, the T4CP works as a motor for export of the rest of the DNA molecule (33). In addition to its presumed role as a DNA transporter, TrwB is also required for transport of relaxase TrwC in the absence of DNA transfer (13).

In accordance with its proposed coupling activity, early genetic experiments made patent that the function of conjugative T4CPs depended on interactions with both the cytoplasmic substrate complex (the relaxosome) and the T4SS (5, 6). Thus, T4CP interactions with other conjugation proteins are a key aspect of their function. There have been several reports of interactions between T4CPs from several conjugative plasmids and either T4SS components (R27-TraG with TrhB) (15) or relaxosomal components (F-TraD with TraM (12, 35), RP4-TraG with TraI (46), pCF10-PcfC with PcfF and PcfG (9)). Both sets of interactions have only been concurrently shown for TrwB, the T4CP of plasmid R388. TrwB interacts with proteins TrwA and TrwC, which form the R388 relaxosome, and with the R388 T4SS component TrwE (34). While the interaction with the relaxosome is highly specific for its cognate system, the interaction between the T4CP and the T4SS is less specific: a single T4CP can interact functionally with several conjugative T4SS. Interestingly, a correlation was observed between the strength of the T4CP:TrwE-like interaction and the efficiency of DNA transfer (34). T4CPs also interact with TrwE-like components of T4SS involved in virulence (11). In the case of the highly related Trw T4SS systems of plasmid R388 and the human pathogen *Bartonella*

spp, it was further demonstrated that R388-TrwE could be functionally replaced by the *B. tribocorum* homolog TrwEBt (11).

T4CPs are integral membrane proteins anchored to the inner membrane by an N-terminal transmembrane domain (TMD). The soluble cytoplasmic domain of TrwB (TrwB Δ N70), lacking this TMD, has been biochemically and structurally analyzed in detail. It retains the ability to bind NTPs and to unspecifically bind DNA (39). The characterization of its DNA-dependent ATPase activity (51) strengthened the possibility that T4CPs work as DNA motors. This activity was also stimulated by the *oriT*-binding protein TrwA (49).

The determination of the 3D-structure of TrwB Δ N70 indicated a quaternary structure consisting of hexamers that form an almost spherical, orange-shaped structure with a 20Å inner channel (ICH) (16, 17). Each monomer is composed of two main structural domains: the nucleotide-binding domain (NBD) and the all-alpha domain (AAD). The NBD has α/β topology and is reminiscent of RecA and DNA ring helicases. The AAD domain is facing the cytoplasmic side, and bears significant structural similarity to the N-terminal domain of site-specific recombinase XerD and also to a 40-residue segment of the DNA binding domain of protein TraM, the component of the relaxosome of F-like plasmids that interacts with its cognate T4CP, TraD. The structure of the hexamer as a whole resembles that of the F1-ATPase, raising interesting perspectives into the possible way of action of coupling proteins as molecular motors in conjugation (4).

There have been several attempts to functionally dissect T4CPs. In F-TraD, it was determined that its C-terminus is essential for relaxosomal specificity, probably through an interaction with TraM (3, 36, 45). The cytoplasmic domain of the related TraD protein of plasmid R1 stimulated both transesterase and helicase activities of its cognate relaxase, TraI (38, 48). A series of random mutants were shown to affect TraD oligomerization (21). In VirD4, the T4CP of the VirB T4SS of *Agrobacterium tumefaciens*, both the periplasmic domain plus key residues of the NBD are required for its location at the cell poles (28); its interaction with the T4SS protein substrate VirE2 does not require the N-terminal TMD (1). Mutational analysis of R27-TraG showed that the periplasmic residues are essential for interaction with the T4SS (20). An N-terminal deletion of PcfC, the T4CP of the *Enterococcus* plasmid pCF10, lost its membrane localization, but retained its ability to bind relaxosomal components (9). Biochemical analysis of full-length R388-TrwB shows that the N-terminal TMD stabilizes the protein, aids oligomerization, and affects nucleotide selection (22-24). This region was essential for T4SS interaction, but TrwB Δ N70 retained the ability to interact with the relaxosomal components TrwA and TrwC (34). Taken together, these analyses suggest that the N-terminal TMD of the T4CPs is necessary for T4SS interaction, oligomerization and cellular location, and the C-terminal cytoplasmic domain is necessary for relaxosomal interactions and ATPase activity associated to DNA transport.

In this study, we set up different assays to search for mutants affecting TrwB function in DNA and protein transfer. We constructed a series of TrwB point mutants based on the 3D structure of TrwB Δ N70. Most selected residues were essential for TrwB function in conjugation, especially under conditions where TrwB was in limiting quantities. We analyzed the in vivo properties of selected mutants with a battery of in vivo assays to map functional domains. Also, random mutants in the TMD were screened for improved interactions with the T4SS, which allowed mapping of the TrwB-TrwE interaction domain.

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids. *E. coli* strain DH5 α (19) was used in all cloning procedures. Strain DY380 (29) was used to express the Red recombination system. Most plasmids were maintained in the *lacI^q* strain D1210 (41). For conjugation experiments, donor and recipient strains were D1210, DH5 α , UB1637 (10), and HMS174 (7), as indicated. The *cya*-deficient strain DHM1 (25) was used for the bacterial two-hybrid assay. Plasmids used are described in **Tables 1 and 2**.

Plasmid constructions. Plasmids were constructed using standard methodology (42). A brief description of each plasmid is included in Table 2. TrwB mutants were constructed in plasmid pSU4633, which codes for *trwA-trwB* under the control of its own *P_{trwA}* promoter, for assay of in vivo functions (complementation of a *trwB* mutant R388, dominant negative effect on wild-type R388). To limit the amount of TrwB, selected mutants were transferred to the pSU19 derivative pHP139, where *trwB* expression is under the control of the lactose promoter. *trwA* was added to pHP139 to express *trwA-trwB* from the lac promoter in plasmid pDEL003. For the two-hybrid assay we used the cloning vectors pUT18C and pT25 (to create fusions to the T18 and T25 domains of adenylate cyclase).

Mutagenesis procedures. Site-directed mutagenesis of selected TrwB residues was performed by the megaprimer method (44). Triple mutation in pMTX546 was not obtained by this method after several attempts, so it was constructed by a Red-recombination based technique, as described (29); briefly, plasmid pSU4633 was introduced into *E. coli* strain DY380, which carries a defective λ prophage harboring the recombination genes *exo*, *bet*, and *gam* under the control of temperature-sensitive *cI*-repressor. The Red recombination system was induced by 15-min incubation at 42°C and cells made competent for electroporation. The mutation to be introduced (a kanamycin-resistance gene from transposon Tn5tac1, flanked by SalI unique restriction sites) was PCR-amplified with oligonucleotides coding for the desired mutation plus 40 nt regions of homology to the regions flanking the site of mutation. This PCR fragment was electroporated into the competent cells and recombinants were selected by the antibiotic resistance marker and subsequently confirmed by PCR and restriction analysis. In a second step, the antibiotic resistance gene was deleted by SalI restriction and religation.

Random mutagenesis of *trwB* was performed by introducing the plasmid to be mutagenized into mutator strain XL1-Red (Stratagene) following the manufacturer's recommendations. Plasmid pSU4633 was introduced into competent XL1-Red cells and grown overnight in 5 ml LB+Cm overnight in the dark. A 10⁻⁵ dilution was continued to grow under the same conditions. Successive dilutions were 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² and 10⁻¹, since the mutagenic strain grows slower after several generations. After the 5 cycles of mutagenic growth, DNA was extracted and re-introduced into fresh competent XL1-Red cells for a second round of mutagenesis. After four complete rounds of mutagenesis, DNA was transformed into D1210 (pSU1443) cells. In order to check for conjugation ability, transformants were replicated on LB plates with a lawn of DH5 α recipient strain, left for 2h at 37°C, and replicated again on plates supplemented with Nx+Km (for transconjugants) and Cm+Km (for donors). Each plate included positive (pSU4633) and negative (pSU4632) controls. Transfer-deficient mutants were selected for DNA extraction, confirmation of the Tra- phenotype, and DNA sequencing to confirm the nature of the mutation.

Random mutagenesis of N-terminal regions of both TrwB and *Bartonella tribocorum*-TrwE (TrwEBt) was performed by mutagenic PCR using the GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Pharmacia) following the manufacturer's recommendations. We adjusted the reactions to obtain an average of one mutation per 400 bp. Template DNAs were pMTX601 for mutagenesis of *trwB*, and pMTX697 for mutagenesis of *trwEBt*. Oligonucleotides used were in both cases pUT18C-F

(GAA GTT CTC GCC GGA TGT) and pUT18C-R (ATG CGG CAT CAG AGC AGA TTG), which flank the cloning site in vector pUT18C. The PCR amplified products were digested with enzymes BamHI + KpnI (for *trwB*) or BamHI + NdeI (for *trwEBt*); the fragment corresponding to the ca. first 400 bp of the genes was gel-extracted and cloned into the corresponding template vector DNAs digested with the same enzymes. Ligations were electroporated into competent DHM1 cells containing the appropriate pT25 derivative (pMTX698 for screening of TrwB mutants, pMTX514 for TrwEBt mutants), and transformants plated in Cm+Ap+X-gal plates for screening of blue colonies representing mutants with stronger TrwB-TrwEBt interactions. DHM1 harbouring the plasmids with the wild-type genes (pMTX601+pMTX698, and pMTX514+pMTX697) was also plated as a control of the colour of the TrwB-TrwEBt interaction.

Bacterial conjugation. Standard matings were performed as described (13). Dominant-negative effect of TrwB mutants was checked in the presence of a wild-type R388 derivative (pSU2007). pSU4622-derived or pHP139-derived TrwB mutants were checked either for complementation of a *trwB*-deficient R388 derivative (pSU1443), or for mobilisation of a plasmid containing *oriT* plus TrwA and TrwC (pHP138) through the T4SS of plasmid pKM101 (present in plasmid pKM101 Δ *mob*). Matings were carried out from the *lacI*^Q strain D1210 in the absence of IPTG (repressed conditions), in the presence of 0.5 mM IPTG in the agar plate during the 1-hour mating period (mild induction), or with an additional induction by previous 1/20 dilution of donor strains and growth for 2 hours in the presence of 0.5 mM IPTG (strong induction).

Relaxase transport assay. Triparental matings were performed to check for TrwC transport in the absence of DNA as described (13). Plasmids containing TrwB or mutant derivatives were introduced in donor cells (D1210 or DH5 α , as indicated) coding for the T4SS of pKM101 (plasmid pKM101 Δ *mob*) and TrwA+TrwC in a non-mobilizable plasmid (pET29:trwAC). None of the three plasmids present in the donor cell contain an *oriT*, so there is no conjugative DNA transport from the donor. Donor cells were mated with a second strain (DH5 α or UB1637, as appropriate) containing a *trwC*-deficient R388 derivative (plasmid pSU1445). TrwC transport into this second strain was detected by complementation of the *trwC* mutation and subsequent mobilization of pSU1445 into a third recipient strain (HMS174).

Two-hybrid assay. In vivo protein-protein interactions were tested by the bacterial two-hybrid assay as described (11). In this assay, the strength of the interactions is reflected in the expression of *lacZ*. Strain DHM1 was grown at 30°C and co-transformed with plasmids bearing a T25 and a T18 fusion. Transformants were grown overnight and spread on sectors of XGal-containing plates to observe and compare the blue colour.

Western blots. The amount of TrwB and TrwA in the cells was estimated by western blot of total protein extracts. *E. coli* D1210 cells containing the indicated plasmids were grown to an O.D. = 0.6 and then IPTG was added as indicated. Cells were collected, centrifuged, resuspended in 1/10 volume of 2x SDS-gel loading buffer (42) and frozen at -20°C. 20 μ l samples were boiled for 5 min and applied to SDS-PAGE gels. After the run, gels were transferred to nitrocellulose filters. Filters were stained with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% methanol to estimate protein transfer. Anti-TrwB and anti-TrwA antibodies from rabbits immunized with purified TrwB Δ N70 or TrwA-His protein were a generous gift of Gabriel Moncalián (University of Cantabria), and were used at a 1:5000 dilution. Secondary antibody (peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG from ICN) was used at a 1:10,000 dilution. Detection was performed with Supersignal kit (Pierce) and bands analyzed on a

BioRad ChemiDoc apparatus. Control proteins TrwB Δ N70 and TrwA-His were purified as described (50).

Results

Mating assays under TrwB limiting conditions.

The amount of TrwB produced from plasmid R388 under normal liquid growth conditions is enough to be visible by Western blot (**Figure 1A**, lane 2). From the comparison with known quantities of purified TrwB Δ N70 protein, it can be estimated that there are several thousands of TrwB monomers per cell. In the RP4 conjugative system, a similar study determined less than 5 molecules per cell of the T4CP TraG (18). This suggests that the R388 *P_{trwA}* promoter, driving the expression of the *trwABC* operon, produces TrwB in excess. If this were the case, mutations affecting the activity of TrwB only partially might not affect the conjugation frequency. In order to construct a system in which the amount of TrwB has a direct effect on the conjugation frequency, we designed a set of conjugation assays in which we modify *trwB* expression conditions and/or we use a heterologous T4SS for DNA transfer. The different transfer assay conditions are depicted in **Figure 2**.

We constructed a plasmid (pHP139) in which the expression of *trwB* was under the control of the lactose promoter. This plasmid was carried in the *lacI^Q* strain D1210 in order to keep *trwB* expression repressed. For induction of its expression, we assayed two different *lac* induction conditions: i) mild overexpression by addition of IPTG to the mating plate, and ii) strong overexpression by an additional 2-hour incubation with IPTG prior to the mating. The amount of TrwB present in each condition was checked by western blot (Fig. 1A). Results confirmed that TrwB was not produced at detectable levels from pHP139 in the absence of induction, while upon addition of IPTG there was an increase in TrwB levels. The amount of TrwB under strong induction conditions was comparable to the TrwB levels in wild type R388 (Fig. 1A, compare lanes 2 and 5). For comparison, TrwB levels were monitored in plasmid pSU4622 (Table 2), where *trwB* is expressed from the *P_{trwA}* promoter and an additional *Plac* promoter originating from the vector; the TrwB levels observed were higher than in R388, and increased upon IPTG induction (Fig. 1A, compare lanes 2, 6 and 7).

Both *trwB* expressing plasmids were tested for complementation of the R388 *trwB* mutant pSU1443 (Fig. 2, assays A and B) under different induction conditions. Results (**Table 3**) showed that even in the absence of induction, the amount of TrwB produced from the lactose promoter was high enough to complement pSU1443 mobilization to the same levels as with the plasmid expressing *P_{trwA}-trwAtrwB* (compare assays A and B). After several hours of overexpression of *trwB* from the lactose promoter in pHP139, the transfer efficiency dropped 1 log (Table 3), which could be due to an adverse effect of an excess of TrwB. However, the steady-state levels of TrwB are not higher than in assay A (Fig. 1A, compare lanes 5 and 6). A reason could be that in assay A, additional TrwA is produced from pSU4622, as checked by western blot (Fig. 1B, lanes 2, 3). We constructed another plasmid (pDEL003, Table 2) by adding *trwA* 5' to *trwB* in plasmid pHP139; TrwA production increased with IPTG induction as expected (Fig. 1B, lanes 6, 7). We used this plasmid to complement the R388 *trwB* mutant (assay type C). The results (Table 3) show a 1-log increase in the conjugation frequency with respect to the *Plac-trwB* construct, and the frequency is not lowered after 3h induction with IPTG, suggesting that TrwA is counteracting the deleterious effect of an excess of TrwB.

We also used the T4SS of plasmid pKM101 for DNA mobilization. The conjugative machinery of this plasmid is related to that of R388, and it was shown that the T4SS of both plasmids are functionally exchangeable (34). Plasmids coding for *trwB* under different expression conditions were tested for conjugation in the presence of compatible plasmids coding for the T4SS of pKM101 (pKM101 Δ *mob*) and the relaxosomal components of R388, *oriT-trwA-trwC* (Fig. 2, assays type D, E

and F). TrwB levels were checked by western blots of donor cells from assays D, E, F (Fig. 1C). The results of the conjugation assays are shown in Table 3; the higher frequencies obtained when the T4SS of pKM101 was used are probably due to the higher copy number of the mobilizable plasmid used in this case (a pMB1-derived replicon, versus the R388 derivative pSU1443). In the absence of induction, there is no detectable TrwB protein produced from the lactose promoter, correlating with the very low conjugation frequencies observed (Fig. 1C and Table 3). Upon addition of IPTG, we observe that conjugation efficiency becomes dependent on the amount of TrwB, especially when *trwB* expression is controlled from the lactose promoter only (assays E, F; Table 3). In summary, the combination of a controlled expression of *trwB* and the use of a heterologous T4SS provide an assay where the conjugation frequency is dependent on the amount of TrwB.

There is a significant increase in the transfer frequencies when the plasmid expressing *Plac-trwAB* is used in place of *Plac-trwB* (compare assays E and F). This is not due to a different amount of TrwB, as judged by western blot (Fig. 1C), but could be due to the different amount of TrwA (Fig. 1D). Thus, the results could suggest that expression of *trwA* is itself another limiting factor, or that it is important for TrwB function in conjugation. To pursue our study of TrwB function, we used assay type E, where the only limiting factor is TrwB.

TrwB is required for TrwC transport into recipient cells, even in the absence of DNA transfer (13). Using triparental matings as described (13), transport of TrwC was detected by complementation of a *trwC* deficient R388 in the recipient cell. Wild-type TrwB was assayed for TrwC transport under different induction conditions (Fig 2, assays type G, H, I). To avoid entry exclusion, the T4SS present in the donor was that of pKM101 in all cases. The transfer frequencies obtained (Table 3) are much lower than in DNA transfer assays, as described (13). It can be observed that frequencies are also increased by induction of *trwB* expression, and that TrwC transport is 10 times more efficient when *trwA* expression is increased from *Plac-trwAB*.

Characterization of TrwB Δ N70 mutants.

Based on the known 3D structure of protein TrwB Δ N70, which contains the cytoplasmic domain of TrwB, we selected the residues highlighted in **Figure 3**, which were more likely to have a key role in TrwB function. We performed site-directed mutagenesis of each one as detailed in Methods. We also performed a random mutagenesis procedure by continuous growth of a *trwB*-containing plasmid in the *E. coli* mutator strain XL1-Red and selection of transfer-deficient mutants, as detailed in Methods. Two transfer-deficient mutants were obtained: S270P and R318H.

Mutations were initially introduced in plasmid pSU4622, which carries genes *trwA* and *trwB* under the control of *P_{trwA}*. In order to assess the steady-state levels of the transfer-deficient mutant TrwB proteins, Western blot analysis was carried out from extracts of cells containing the pSU4622 derivatives after IPTG induction. All mutants showed same protein levels as wild-type TrwB, except when indicated. Plasmids containing TrwB mutations were checked for complementation of the transfer-deficient R388 *trwB* mutant pSU1443, and for dominant negative phenotype in the presence of wild-type TrwB. Results are shown in **Table 4**. TrwB mutations that did not have an effect in the standard complementation assay (type A in Fig. 2) were transferred to plasmid pHP139 and tested for TrwB function under different mating conditions, to see if there was a phenotypic effect under the TrwB limiting conditions defined above. Results are shown in **Table 5**.

Mutants in the NBD. This domain contains the NTP binding pocket. Also, monomer-monomer interactions run mainly along this domain. According to the structure, there are several residues in direct contact with the NTP belonging to two adjacent monomers (Fig. 3 C). Residues K136, D158, D356, E357, Q386 and Q390 contact the NTP from one TrwB monomer, while residues R124 and R375 contact the NTP from the adjacent TrwB monomer. All of them were changed to alanine,

except for the previously characterized mutant K136T (39, 51). In addition, mutant R318H was obtained by random mutagenesis; residue R318 lies at the interface between monomers (Fig. 3B, shown in red). Standard complementation assays (Table 4) showed that almost all designed mutations in contact with the bound NTP were completely transfer-deficient; mutant R124A retained 1% transfer efficiency, and mutation Q390A (which lies slightly separated from the nucleotide molecule) did not affect transfer significantly in the standard mating assay, but shows a strong phenotype when *trwB* expression or the T4SS used are altered (Table 5, assays B, E).

All transfer-deficient NBD mutations showed a dominant negative phenotype (Table 4). The strongest effect (5-log) occurred in mutant Q386A. Mutants with a strong dominant negative effect (2-3 logs) were: K136T (previously reported in (51)), D158A, D356A, E357A, R375A, and the randomly obtained mutant R318H. Mutations R124A and Q390A showed an effect of less than 1-log.

Mutants in the ICH. According to the current model, the ICH is the candidate region for DNA interaction, since transferred DNA is expected to travel through the centre of the hexamer. Positively charged residues could have a role in contacting the negatively charged DNA backbone. Therefore, the three lysines protruding into the ICH (K275, K398, K421; see Fig. 3A) were mutated to alanine. Mutant K421A contained the additional mutation D425A, also mapping in the ICH. In addition, a conserved tryptophan (W216) was previously mutated to alanine and characterized (51). Residue N271 blocks the entrance to the ICH, and was mutated to Asp. The constructed mutants did not significantly affect transfer (Table 4), except for the already described mutant W216A. Mutation N271D did not affect transfer even in limiting conditions (Table 5), in contrast with the randomly obtained transfer-deficient mutant S270P, lying adjacent to N271 (Fig. 3A, shown in dark green). Mutations in the three lysines protruding into the ICH behaved differently under limiting conditions (Table 5, assay E): while mutants K398A and K421A showed 10-times higher conjugation frequencies than the wild-type, those with mutant K275A were 10-times lower.

Mutant W216A, as previously reported, showed a severe dominant negative phenotype (5-log drop in the transfer efficiency of the co-resident wild-type plasmid). Mutants S270P and K275A showed an intermediate dominant-negative effect of about 2-logs.

Mutants in the AAD. This domain is located at the cytoplasmic side of the TrwB hexamer and it surrounds the entrance to the ICH. Thus, it is a candidate for interactions with the components of the relaxosomal substrate: TrwA, TrwC, and the DNA to be transferred. We searched for residues which were polar and surface-exposed, and also residues that were conserved in different T4CPs, and we constructed the following double mutants (Fig. 3 A,B): H244A W245A, based on the conservation of these two residues in the T4CP family; R240A E241A and D252A D253A, based on the charge and proximity of the residues to the cytoplasmic entrance to the ICH; and a more aggressive triple mutant D252R D253R D259R (named triple-AAD mutant), in which the three charged residues were mutated to residues with the opposite charge. Neither of the three double mutants affected transfer (Table 4). The triple mutant D252R D253R D259R, however, knocked down protein function completely. The double mutant H244A W245A showed an effect on conjugation under TrwB limiting conditions (1-2 log drop in transfer frequency; Table 5).

C-terminal deletions. Both $\Delta 12C$ and $\Delta 17C$ deletions were constructed. As judged by the 3D structure (Fig. 3A), the C-terminal 12 residues of the TrwB monomer protrude away from the structure as a random coil, and residues 13-17 from the C-terminus lay on top of the bound NTP molecule. Both deletions resulted in severely reduced protein functionality (3- and 4-log decrease, respectively, in the standard conjugation assay; Table 4). The amount of protein present, as judged by western blot analysis, was reduced: roughly, the $\Delta 12C$ deletion showed half the amount of protein, and the $\Delta 17C$ deletion showed approximately 1/5th of wild-type

levels (data not shown), suggesting that this deletion affected the stability of TrwB. However, considering that under these conditions the amount of TrwB is not a limiting factor, it can be speculated that the C-terminus of TrwB plays a role in its activity.

Effect of TrwB Δ N70 mutants in relaxase transport. In order to determine if any of the TrwB mutations affected specifically protein transport through the T4SS, triparental matings were performed (Fig. 2, assay G). Since the transfer frequency in this assay is much lower than to test DNA transfer (see Table 3), the assays were performed from donor strain DH5 α , which allows expression from the lactose promoter even in the absence of IPTG. Using this donor strain, transfer frequencies without IPTG were higher than with IPTG-induced D1210 donor cells.

All transfer-deficient or severely affected mutants (mutants K136T, R124A, D158A, D356A, E357A, R375A, Q386A, W216A, S270P, R318H, triple-AAD, and Δ 12C) were deficient for TrwC transport in the absence of DNA: $<4 \times 10^{-7}$ transconjugants per donor, compared to a frequency of 4×10^{-3} in the presence of wild-type TrwB (data not shown). The assays with the mutants shown to affect TrwB function only under certain assay conditions are shown in Table 5, last column. All mutants affected in DNA transfer (Q390A, K275A, and double mutant H244AW245A to a lesser extent) were proportionally affected in TrwC transfer. Interestingly, mutants K398A and especially N271D, inside and closing the entrance of the ICH respectively, were not affected in DNA transfer but showed a significant decrease in TrwC transport efficiency (57- and 1000-times decrease, respectively).

Effect of TrwB Δ N70 mutants in oligomerization. We used the adenylate-cyclase based bacterial two-hybrid assay (26) to study protein-protein interactions. Previous results using this assay showed that TrwB interacts with itself in this system, while deletion of the N-terminal 75 residues of TrwB severely affected the interaction (34). We transferred selected TrwB mutations, lying close to the monomer-monomer interface, to plasmids producing TrwB fusions to both adenylate cyclase domains (Table 2) and introduced them in the DHM1 test strain, as explained in Methods. The results are shown in **Figure 4**, left. NBD mutations K136T and D158A, and the C-terminal deletion Δ 12C strongly affected the interaction, suggesting an implication of these residues in TrwB hexamer formation. The rest of mutants tested did not significantly affect TrwB-TrwB interaction, as judged by the blue colonies formed on selective plates.

Using this two-hybrid assay, TrwB has also been shown to interact strongly with the T4SS component TrwE (34). We tested the TrwB mutants impaired in TrwB:TrwB interactions for their interaction with TrwE. The results (Fig. 4, right) show that none of the TrwB mutations involved in TrwB:TrwB interactions affect the TrwB:TrwE interaction.

TrwB mutants improving the interaction with the T4SS.

The TMD domain of TrwB was shown to be essential for the interaction with the T4SS component TrwE, as judged by two-hybrid analysis. In turn, the N-terminal 64 residues of TrwE, which include also a transmembranal segment, were essential for the interaction (34). This suggests that the TrwB-TrwE interaction occurs mainly at the inner membrane. We used the bacterial two-hybrid assay as a screening method to look for TrwB mutations that affected this interaction. Since mutants that lose the interaction are less informative, we decided to address the weaker interaction between TrwB and the TrwE homologue of the highly related Trw T4SS of *Bartonella tribocorum*, TrwEBt (11); the TrwB:TrwEBt interaction renders pale blue colonies in this assay, allowing the screening for mutants with improved TrwB-TrwEBt interactions by selecting dark blue colonies on X-gal containing selective medium.

We performed random mutagenesis on the 5' region of both genes, as explained in Methods, and selected mutants rendering dark blue colonies for further analysis. Several colonies were obtained in both cases: eight out of about two

thousand colonies when screening for TrwB mutations (plus 18 white colonies that were not further characterized), and seven out of about four thousand colonies when screening for TrwEBt mutations (plus 20 white colonies). The TrwB and TrwEBt mutants obtained are listed in **Table 6** and illustrated in **Figure 5**. Mutants altering the TrwB:TrwEBt interaction lied mostly in the transmembranal segments of both proteins. Six out of eight TrwB mutants carried the P18S mutation, alone or together with additional silent mutations; only one of them was selected for further analysis.

Mutants were checked for their functionality in conjugation by complementation assays of either an R388 TrwB mutant or an R388 TrwE mutant, since TrwEBt was previously shown to complement an R388 *trwE* mutation, albeit with 100-fold lower efficiency (11). Results of the complementation tests are shown in Table 6. The TrwEBt mutants maintained their ability to complement an R388 TrwE mutant as efficiently as wild-type TrwEBt; the only mutant that complemented about 10-times lower was the double mutant P57L T107A, while mutations affecting either residue independently did not affect complementation. Similarly, TrwB mutants were not altered in their function in R388 conjugation, showing the same complementation levels as wild-type TrwB (Table 6). We transferred TrwB mutations to pHP139 in order to assay them under restrictive conditions (assay type E). Both mutants V74I and P18S S95N behaved as wild-type TrwB in this assay (data not shown).

All mutants were also tested for their interaction with R388-TrwE, and no significant differences from wild-type TrwB and TrwEBt were observed (data not shown). TrwB mutants were additionally tested for self-interaction and interaction with wild-type TrwB. Results (Fig. 5 right, lower panel) showed an increase in TrwB-TrwB interaction, especially for mutant P18S. Thus, the mutants selected in the N-terminal region increased both TrwB-TrwEBt and TrwB-TrwB interactions.

Discussion

Coupling proteins are key elements of the conjugative transfer machineries; their pivotal role as connectors between the relaxosome and the T4SS implies the existence of protein-protein interactions on both sides and thus an essential role in substrate recruitment. In addition, evidence is accumulating that T4CPs may also act as DNA pumping motors. Consequently, these proteins have to accomplish a number of functions, such as interactions with the T4SS and with the relaxosome, DNA binding, and ATPase activity. In this work, we addressed a mutagenesis analysis of the T4CP TrwB which allowed us to discern key residues of the protein involved in its different functional roles. In order to characterize these mutants, we designed a series of conjugation assays under different *trwB* expression conditions.

TrwB function under different assay conditions.

When expressed from its natural promoter in plasmid R388, there are several thousand TrwB molecules per cell. Thus, we suspected the amount of TrwB was probably in excess under standard assay conditions, a situation which would hamper the search for transfer-deficient *trwB* mutants. Confirming this assumption, we have set up a conjugation assay controlling *trwB* expression from a lactose promoter and using the T4SS of the related plasmid pKM101, where the amount of TrwB correlates directly with the frequency of transfer (Figure 2 and Table 3). In the wild type situation, the conjugation frequency was not dependent on the amount of TrwB. A plausible explanation is that the interaction of TrwB with the T4SS of pKM101 is less efficient, but this loss is compensated by an increased amount of TrwB.

The use of the TrwB limiting system allowed us to detect TrwB mutations affecting transfer efficiency, which were not apparent in the standard conjugation assay. Nevertheless, caution has to be exerted when interpreting data from TrwB mutants which show an impaired phenotype only in the limiting system. It has to

be taken into account that a heterologous T4SS is being used. In the absence of any further phenotype shown by in vitro assays, it remains possible that the effect observed is solely due to a defective interaction of the T4CP with the T4SS of pKM101, and that the mutations would not affect the interaction of TrwB with its cognate T4SS. However, considering the residues showing a phenotype under these conditions (located in the NBD, the AAD, and in the ICH), this seems unlikely. The more plausible explanation is that the inefficient interaction of TrwB with the T4SS of pKM101 cannot be compensated by the impaired TrwB variants when TrwB is not in excess.

We also found that DNA transfer frequency is increased in more than 1 log when *trwA* expression is increased (Table 3); in addition, an imbalance in the TrwA-TrwB ratio seems to be deleterious to the cell, since there is a drop in the transfer frequency upon IPTG induction of Plac-*trwB*, but not Plac-*trwAB* (Table 3). These data suggest that TrwA is important for TrwB function. TrwA has been shown to increase TrwB DNA-dependent ATPase activity (50). It is plausible that the formation of a TrwATrwB complex will work most efficiently for substrate recruitment and translocation.

Production of TrwA from its own promoter has been described to be autorepressed (40). Interestingly, we found that TrwA production from pHP138 (*oriT-trwAC*) is indeed repressed, since only a slight amount of TrwA is detected by western blot (Fig. 1D, lanes 2,3); however, TrwA is produced in large amounts from pSU4622 (*P_{trwA}-trwABC*; Fig. 1B, lanes 2,3). A plausible explanation is that, while pHP138 includes the R388 *oriT* and thus, 400 bp upstream the start of *trwA*, in pSU4622, the *P_{trwA}* promoter sequence starts at nucleotide 270 from the R388 *oriT* sequence (30), including TrwA binding site A but not binding site B (40); thus, TrwA needs both binding sites A and B to repress its own promoter, which should lead to a redefinition of the *trwABC* promoter.

Functional dissection of TrwB

We mutagenized the N-terminal region of TrwB and screened for mutants affected in the interaction with the T4SS. Point mutants in the cytoplasmic domain were designed based on the protein 3D structure addressing putative key residues for NTP binding/hydrolysis, oligomerization, and interaction with the substrate protein and DNA. This approach was complemented with a search for transfer-deficient mutants after random mutagenesis. Mutants were characterized using the above-described assays. A summary of the results obtained is schematized in **Figure 6**. The TrwB domains proposed to be involved in specific TrwB functions are indicated, with the mutated residues highlighted in different shades to indicate the magnitude of their effect in transfer.

Mutants in nucleotide binding/hydrolysis and oligomerization. Residue K136 is in Walker box A, while residues D356 and E357 form the DEXX box (Walker box B) (52). Residue D158 is within a putative Asp box. Residues R124 and R375 contribute to the NTP-binding pocket from the adjacent subunit (Fig. 3C). When the 3D structures of TrwB Δ N70 resembling the substrate and product of NTP hydrolysis were compared (16), the regions that varied most were the P-loop (including K136), residues R124 and R375, and the region that includes Q386 and Q390. The data suggest that the selected residues have a key role in nucleotide binding and hydrolysis.

Six out of eight mutants in contact with the NTP (K136T, D158A, D356A, E357A, R375A, and Q386A) lost their function in conjugation. Mutant R124A retained 1% transfer ability, and mutant Q390A was impaired in conjugation under TrwB-limiting conditions (Tables 4 and 5). The results obtained underscore the essential role of NTP binding-hydrolysis by TrwB in conjugation. All NBD mutants showed a proportional transfer-deficient phenotype when only conjugative TrwC transport was tested, suggesting that the ATPase activity is equally required for DNA and protein transport through the T4SS.

All transfer-deficient mutants in the NBD exerted negative dominance to different extents (Table 4). Negative dominance is typically an effect of mutant proteins that form part of complexes, suggesting that these mutants can oligomerize with wild-type TrwB forming hetero-hexamers. However, a two-hybrid assay showed that mutations K136T and D158A strongly affected the TrwB-TrwB interaction (Fig. 4). It is possible that the mutants with decreased binding ability form unstable, less-functional multimers. It remains also possible that negative dominance is due to the interaction of TrwB with other proteins, such as T4SS components, and subsequent "poisoning" of the TrwB-T4SS functional interaction required for DNA transfer.

The C-terminal deletion $\Delta 12C$ also affects TrwB-TrwB interactions (Fig. 4). Thus, in addition to the N-terminal region, the C-terminal segment and the NBD region of TrwB were involved in TrwB-TrwB interactions. Similar results were obtained with the T4CPs TraD of the F plasmid and TcpA of plasmid pCW3: the TMD is important for oligomerization, together with another segment of the cytoplasmic domain (21, 47). It was suggested that the N-terminal domain of TraD is required for the interaction of the T4CP with the rest of the conjugal machinery, while the region of the soluble domain would be only required for self-interactions. In accordance with these results, we have shown that the residues implicated in the interaction of TrwB with the T4SS component TrwE are located in the N-terminal segment (Fig. 5), while cytoplasmic mutations affecting severely TrwB-TrwB interactions do not affect the interaction with TrwE (Fig. 4).

Putative mutants in relaxosomal interactions. TrwB interacts with the relaxosomal proteins TrwA and TrwC, and binds non-specifically both ss and dsDNA (34, 39). TrwB ICH is expected to be the channel for DNA transfer. The AAD of TrwB $\Delta N70$ is located in the cytoplasmic side of the hexamer and surrounds the entrance to the ICH. We constructed a series of mutants targeting the residues more likely to be involved in interactions with TrwA, TrwC or the DNA (Fig. 3 A,B): conserved or polar residues at the AAD surface, and positively charged residues protruding into the ICH. The targeted AAD region is within the TrwB region from Y233 to G260, which is structurally related to protein TraM of the F plasmid, involved in relaxosomal specificity (16).

When these mutants were tested in the standard conjugation assay, the triple mutant in the AAD region, and the previously characterized W216A mutant in the ICH were transfer deficient (Table 4). In addition, a random mutagenesis experiment rendered mutant S270P, which lies close to the cytoplasmic entrance to the ICH. Thus, the AAD polar surface, the ICH and the entrance to the ICH are essential regions for TrwB function, but under standard conjugation assays, aggressive mutations are required to obtain an impaired phenotype. When transferred to the TrwB limiting assays depicted in Fig. 2, additional mutants showed a decrease in conjugation efficiency (Table 5), such as K275A at the cytoplasmic side of the ICH, and the AAD mutant in two conserved residues, H244AW245A, which was 2-logs less efficient than wild-type TrwB.

It should be noted that all mutants affected in DNA transfer are proportionally affected in TrwC transport (Table 5). No mutants were obtained affecting specifically DNA transfer, which would have mapped a DNA pumping activity of TrwB. However, mutants K398A (inside the ICH) and especially N271D (closing the entrance of the ICH) were not affected in DNA transfer but showed a significant decrease in efficiency for TrwC transport. This could be explained if TrwC is transported in large numbers during conjugation in the absence of DNA, while only one or a few TrwC-DNA complexes are transferred during conjugation. The location of the residues affected in TrwC transport suggests that they could have a role in recruitment of TrwC, or even in the entrance of TrwC to the ICH. Alternatively, TrwB could interact with TrwC as a monomer, and after TrwC translocation through the T4SS, TrwB would hexamerize on the DNA, as suggested by the "shoot and pump" model for DNA transfer (33).

Mutants in the TMD. Previous works showed that the soluble derivative Trw Δ N75 loses the interaction with the T4SS component TrwE and interacts poorly with itself (34). We mutagenized the region coding for the N-terminal 135 residues of TrwB, selecting for mutants which showed stronger interactions with TrwEBt in the two-hybrid assay. The same strategy was applied to the N-terminal region of TrwEBt, which presumably anchors the periplasmic protein to the inner membrane. In this way, we mapped the interacting domain of these proteins to the inner membrane – periplasmic region, according to the location of the residues shown to increase the interaction when mutated (Fig. 5, Table 6). Two proline residues, Pro18 in TrwB and Pro57 in TrwEBt, appeared in independently isolated mutants, highlighting their importance in the interaction, and ensuring that the mutagenesis procedure was exhaustive. Structural motifs that contain proline residues in α -helices are key elements in mechanisms of signalling through conformational ‘switches’, since prolines affect the α -helix topology in the inner membrane by changing the direction of the helix (43). Their mutation probably induces a conformational change that may affect the interaction with other proteins.

The interaction between the T4CP and the VirB10 homologue is of special relevance. It was shown that this interaction drives the efficiency of DNA transfer through heterologous T4SS (34). VirB10 has been proposed to act as an energy sensor which could couple inner membrane ATP consumption to substrate transfer (8). We have found that the same TrwB residues involved in interaction with TrwE are also involved in TrwB-TrwB interactions (Fig. 5 right, lower panel). It is tempting to speculate that the transmembranal helices from TrwB and TrwE intertwine in the membrane; in this way, the ICH of the TrwB hexamer would contact directly with the transmembranal channel formed by the T4SS core elements, and especially with TrwE, which could transmit the mating signal to the relaxosome through the T4CP.

Acknowledgements

This work was supported by grants BIO2008-00133 from the Spanish Ministry of Science and Innovation and API 07/01 from the Fundación Marqués de Valdecilla to ML; and grants LSHM-CT-2005_019023 from the European Commission, BFU2008-00995/BMC from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and RETICS research network RD06/0008/1012, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Health, to FC. HP and DL were the recipients of predoctoral fellowships from the University of Cantabria and JAE-predoc (CSIC), respectively. We are grateful to Dr. Gabriel Moncalián for providing TrwA and TrwB antisera, and to Elena Cabezón and Ignacio Aréchaga for helpful discussions.

References

1. **Atmakuri, K., Z. Ding, and P. J. Christie.** 2003. VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **49**:1699-713.
2. **Bartolomé, B., Y. Jubete, E. Martínez, and F. de la Cruz.** 1991. Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**:75-8.
3. **Beranek, A., M. Zettl, K. Lorenzoni, A. Schauer, M. Manhart, and G. Koraimann.** 2004. Thirty-eight C-terminal amino acids of the coupling protein TraD of the F-like conjugative resistance plasmid R1 are required and sufficient to confer binding to the substrate selector protein TraM. *J Bacteriol* **186**:6999-7006.
4. **Cabezón, E., and F. de la Cruz.** 2006. TrwB: an F(1)-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Res Microbiol* **157**:299-305.
5. **Cabezón, E., E. Lanka, and F. de la Cruz.** 1994. Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: *trwB* and RP4 *traG* are interchangeable. *J Bacteriol* **176**:4455-8.
6. **Cabezón, E., J. I. Sastre, and F. de la Cruz.** 1997. Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet* **254**:400-6.
7. **Campbell, J. L., C. C. Richardson, and F. W. Studier.** 1978. Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:2276-80.
8. **Cascales, E., and P. J. Christie.** 2004. *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17228-33.
9. **Chen, Y., X. Zhang, D. Manias, H. J. Yeo, G. M. Dunny, and P. J. Christie.** 2008. *Enterococcus faecalis* PcfC, a Spatially-Localized Substrate Receptor for Type IV Secretion of the pCF10 Transfer Intermediate. *J Bacteriol*.
10. **de la Cruz, F., and J. Grinsted.** 1982. Genetic and molecular characterization of Tn21, a multiple resistance transposon from R100.1. *J Bacteriol* **151**:222-28.
11. **de Paz, H. D., F. J. Sangari, S. Bolland, J. M. Garcia-Lobo, C. Dehio, F. de la Cruz, and M. Llosa.** 2005. Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151**:3505-16.
12. **Disque-Kochem, C., and B. Dreiseikelmann.** 1997. The cytoplasmic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD in vitro. *J Bacteriol* **179**:6133-7.
13. **Draper, O., C. E. César, C. Machón, F. de la Cruz, and M. Llosa.** 2005. Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16385-90.
14. **Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia, and F. de la Cruz.** 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**:657-87.
15. **Gilmour, M. W., J. E. Gunton, T. D. Lawley, and D. E. Taylor.** 2003. Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol Microbiol* **49**:105-16.
16. **Gomis-Rüth, F. X., G. Moncalián, F. de la Cruz, and M. Coll.** 2002. Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol Chem* **277**:7556-66.
17. **Gomis-Rüth, F. X., G. Moncalián, R. Pérez-Luque, A. González, E. Cabezón, F. de la Cruz, and M. Coll.** 2001. The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**:637-41.
18. **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**:1564-74.
19. **Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4645-9.
20. **Gunton, J. E., M. W. Gilmour, G. Alonso, and D. E. Taylor.** 2005. Subcellular localization and functional domains of the coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology* **151**:3549-61.

21. **Haft, R. J., E. G. Gachelet, T. Nguyen, L. Toussaint, D. Chivian, and B. Traxler.** 2007. In vivo oligomerization of the F conjugative coupling protein TraD. *J Bacteriol.*
22. **Hormaeche, I., I. Alkorta, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goñi, 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.
23. **Hormaeche, I., I. Iloro, J. L. Arrondo, F. M. Goni, F. de la Cruz, and I. Alkorta.** 2004. Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *J Biol Chem* **279**:10955-61.
24. **Hormaeche, I., R. L. Segura, A. J. Vecino, F. M. Goni, F. de la Cruz, and I. Alkorta.** 2006. The transmembrane domain provides nucleotide binding specificity to the bacterial conjugation protein TrwB. *FEBS Lett* **580**:3075-82.
25. **Karimova, G., N. Dautin, and D. Ladant.** 2005. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**:2233-43.
26. **Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann, and D. Ladant.** 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5752-6.
27. **Karimova, G., A. Ullmann, and D. Ladant.** 2001. Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:73-82.
28. **Kumar, R. B., and A. Das.** 2002. Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol Microbiol* **43**:1523-32.
29. **Lee, E. C., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tessarollo, D. A. Swing, D. L. Court, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland.** 2001. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**:56-65.
30. **Llosa, M., S. Bolland, and F. de la Cruz.** 1991. Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Mol Gen Genet* **226**:473-83.
31. **Llosa, M., S. Bolland, G. Grandoso, and F. de la Cruz.** 1994. Conjugation-independent, site-specific recombination at the *oriT* of the IncW plasmid R388 mediated by TrwC [published erratum appears in *J Bacteriol* 1994 Oct;176(20):6414]. *J Bacteriol* **176**:3210-7.
32. **Llosa, M., and F. de la Cruz.** 2005. Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res Microbiol* **156**:1-6.
33. **Llosa, M., F.-X. Gomis-Rüth, M. Coll, and F. de la Cruz.** 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**:1-8.
34. **Llosa, M., S. Zunzunegui, and F. de la Cruz.** 2003. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10465-70.
35. **Lu, J., and L. S. Frost.** 2005. Mutations in the C-terminal region of TraM provide evidence for in vivo TraM-TraD interactions during F-plasmid conjugation. *J Bacteriol* **187**:4767-73.
36. **Lu, J., J. J. Wong, R. A. Edwards, J. Manchak, L. S. Frost, and J. N. Glover.** 2008. Structural basis of specific TraD-TraM recognition during F plasmid-mediated bacterial conjugation. *Mol Microbiol* **70**:89-99.
37. **Martínez, E., and F. de la Cruz.** 1988. Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol Gen Genet* **211**:320-5.
38. **Mihajlovic, S., S. Lang, M. V. Sut, H. Strohmaier, C. J. Gruber, G. Koraimann, E. Cabezón, G. Moncalián, F. de la Cruz, and E. L. Zechner.** 2009. Plasmid r1 conjugative DNA processing is regulated at the coupling protein interface. *J Bacteriol* **191**:6877-87.
39. **Moncalián, G., E. Cabezón, I. Alkorta, M. Valle, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goñi, 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**:36117-24.
40. **Moncalián, G., G. Grandoso, M. Llosa, and F. de la Cruz.** 1997. *oriT*-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol* **270**:188-200.
41. **Sadler, J. R., M. Tecklenburg, and J. L. Betz.** 1980. Plasmids containing many tandem copies of a synthetic lactose operator. *Gene* **8**:279-300.
42. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

43. **Sansom, M. S., and H. Weinstein.** 2000. Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol Sci* **21**:445-51.
44. **Sarkar, G., and S. S. Sommer.** 1990. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8**:404-7.
45. **Sastre, J. I., E. Cabezón, and F. de la Cruz.** 1998. The carboxyl terminus of protein TraD adds specificity and efficiency to F-plasmid conjugative transfer. *J Bacteriol* **180**:6039-42.
46. **Schröder, G., S. Krause, E. L. Zechner, B. Traxler, H. J. Yeo, R. Lurz, G. Waksman, and E. Lanka.** 2002. TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *J Bacteriol* **184**:2767-79.
47. **Steen, J. A., T. L. Bannam, W. L. Teng, R. J. Devenish, and J. I. Rood.** 2009. The putative coupling protein TcpA interacts with other pCW3-encoded proteins to form an essential part of the conjugation complex. *J Bacteriol* **191**:2926-33.
48. **Sut, M. V., S. Mihajlovic, S. Lang, C. J. Gruber, and E. L. Zechner.** 2009. Protein and DNA effectors control the TraI conjugative helicase of plasmid R1. *J Bacteriol* **191**:6888-99.
49. **Tato, I., I. Matilla, I. Arechaga, S. Zunzunegui, F. de la Cruz, and E. Cabezón.** 2007. The ATPase activity of the DNA transporter TrwB is modulated by protein TrwA: implications for a common assembly mechanism of DNA translocating motors. *J Biol Chem*.
50. **Tato, I., I. Matilla, I. Arechaga, S. Zunzunegui, F. de la Cruz, and E. Cabezón.** 2007. The ATPase activity of the DNA transporter TrwB is modulated by protein TrwA: implications for a common assembly mechanism of DNA translocating motors. *J Biol Chem* **282**:25569-76.
51. **Tato, I., S. Zunzunegui, F. de la Cruz, and E. Cabezón.** 2005. TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8156-61.
52. **Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay.** 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**:945-51.

Figures

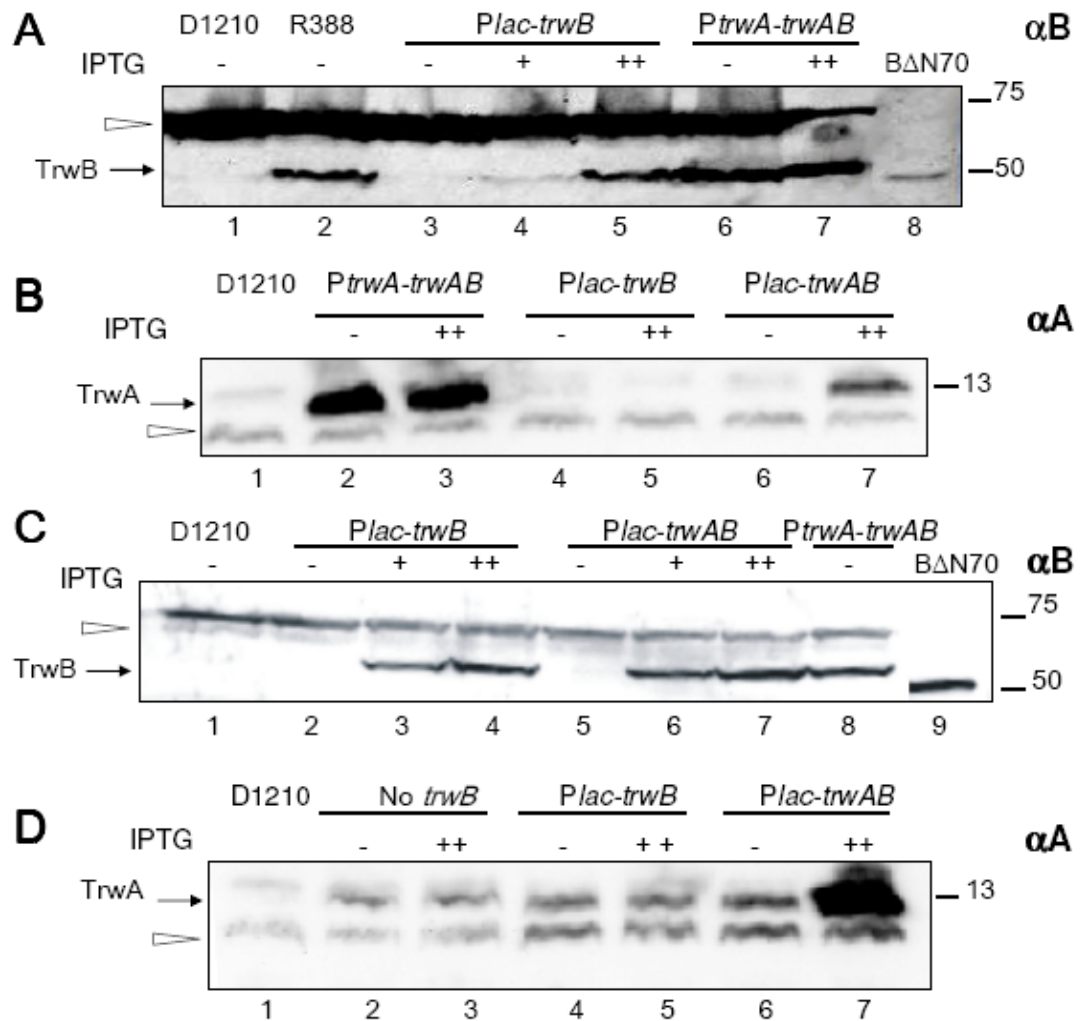


Figure 1. Western blots showing TrwB (α B) and TrwA (α A) amounts under different expression conditions. Total extracts from *E. coli* D1210 containing the *trwB*-expressing plasmid indicated at the top were processed as described in Methods, samples run on SDS-PAGE and TrwB levels detected with anti-TrwB (**A**, **C**) or anti-TrwA (**B**, **D**) serum. **A** and **B**, SDS-PAGE with samples from D1210 cells harbouring the *trwB* expressing plasmids alone. **C** and **D**, SDS-PAGE with samples from cells containing additional plasmids pKM101 Δ *mob* and pHP138, as in conjugation assay types DEF (Fig. 2). The position of TrwA and TrwB is indicated to the left. The white arrowhead points to unspecific bands visible in the strain with no plasmids. Molecular size markers are indicated to the right (in kDa). Purified TrwB Δ N70 is included in the last lane in **A**, **C**. The induction conditions (IPTG during 0, 1 or 3h) are indicated as -, + or ++, respectively.

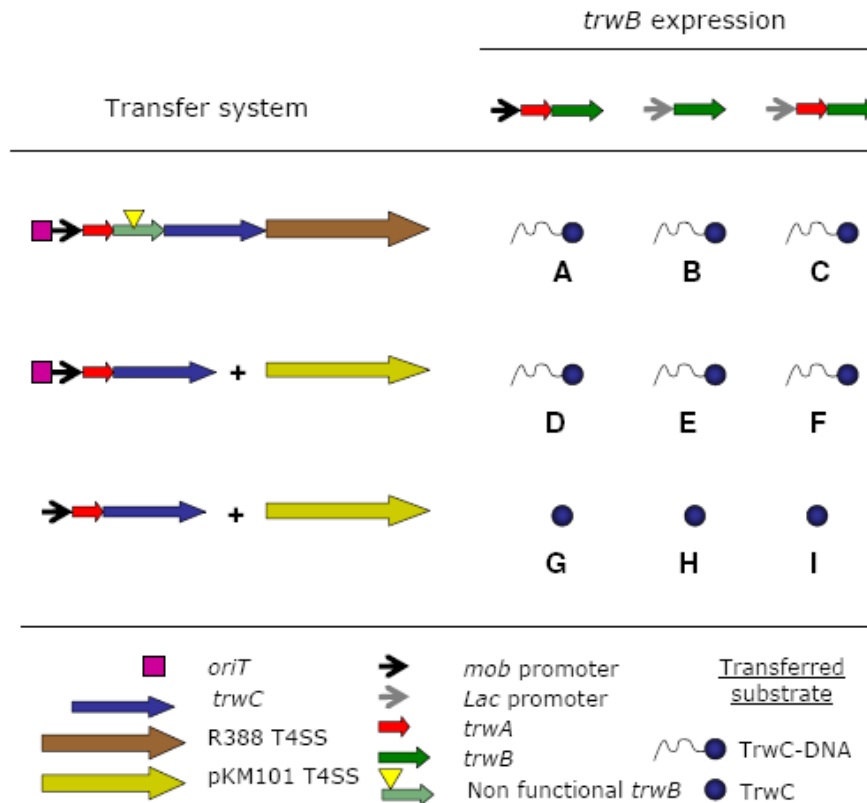


Figure 2. Scheme of the different conjugation assays used in this work. The elements of the transfer machinery present in each assay type (A to I) are represented as indicated in the lower part of the Figure. The different plasmids (separated by “+” symbols) present in the donor strains are the sum of those in the lane and column matching for each assay type. The transferred product (either TrwC alone or with covalently attached DNA) is indicated with each assay type.

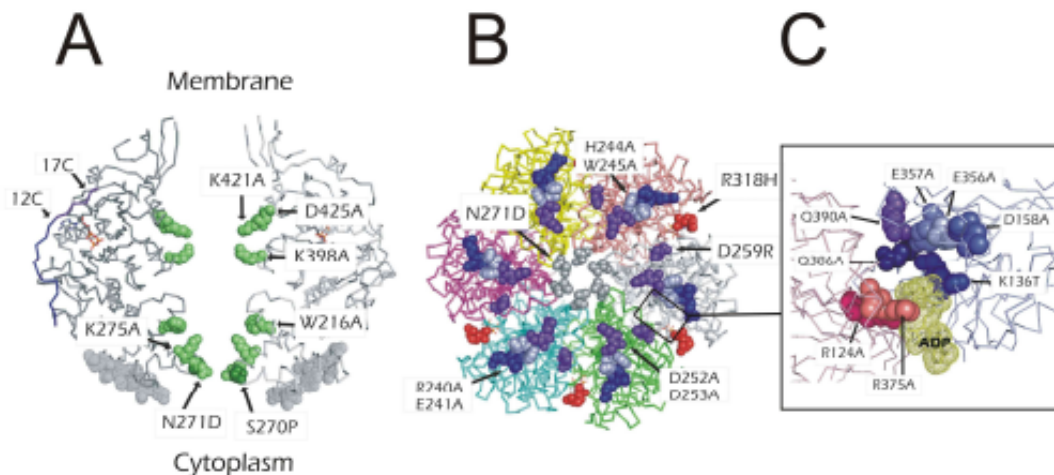


Figure 3. Representations of the 3D structure of TrwB Δ N70 bound to ADP (pdb accession number 1GKI), where the mutated residues are highlighted spacefilled. **A**, side view of two opposing monomers, showing in green the mutated residues which protrude into the ICH of the hexamer. The extent of the 12 and 17 C-terminal residues of the protein is indicated with arrows (12C and 17C, respectively). Mutated AAD residues are also indicated (spacefilled, gray colour). **B**, the TrwB Δ N70 hexamer seen from the cytoplasmic side, with the selected residues from the AAD domain showed spacefilled. Residue R318, located in the interface between monomers, is also highlighted (in red colour). The region included in the quadrangle is amplified in **C** for better resolution of the mutated residues in the proximity of the nucleotide molecule.

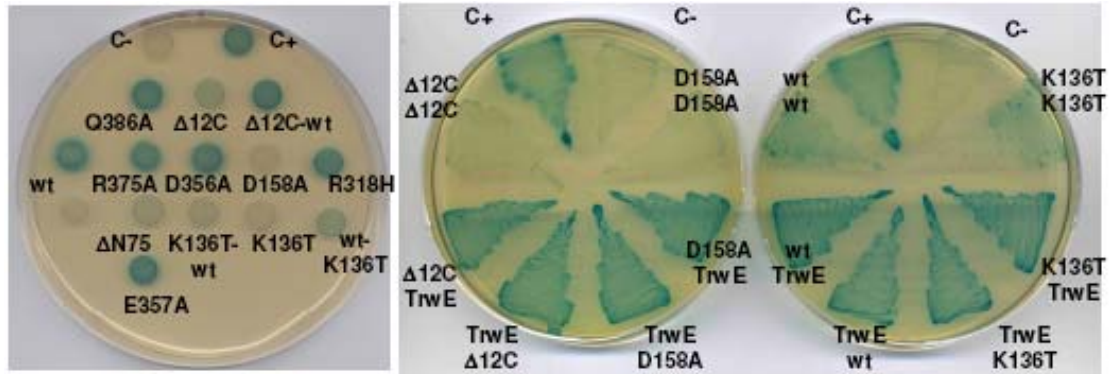


Figure 4. Bacterial two-hybrid assay showing the effect of TrwB mutations in protein-protein interactions. DHM1 cells containing pairs of plasmids coding for T18 or T25 fusions with the indicated TrwB mutants were grown in plates supplemented with X-gal. Wt, wild-type TrwB. - and +, negative (pUT18 + pT25zip) and positive (pUT18zip + pT25zip) controls. **Left**, effect of NBD mutations on TrwB-TrwB interactions. **Right**, mutations shown to affect TrwB oligomerization were checked for their interaction with TrwE.

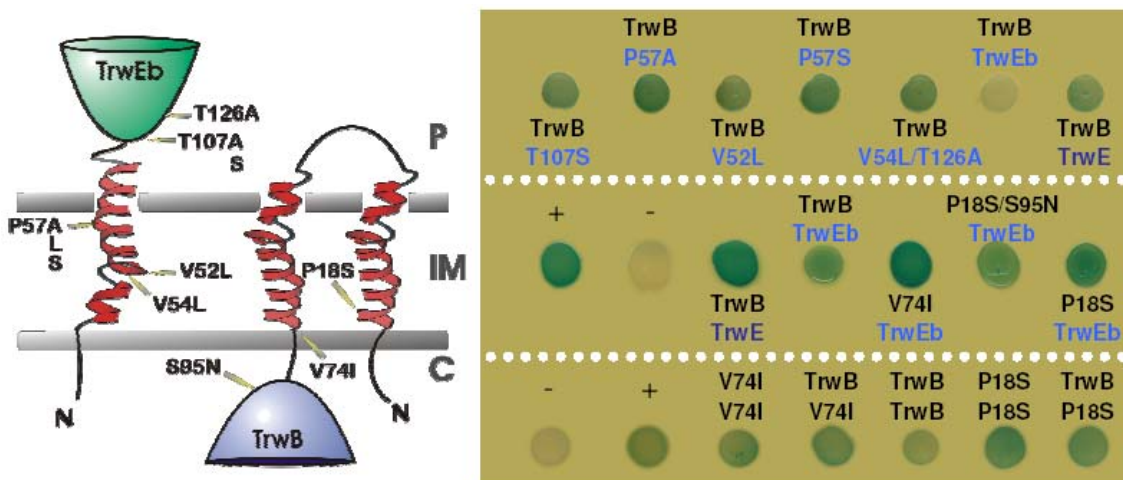


Figure 5. Mutations affecting the TrwB-TrwE interaction. **Left**, scheme of the transmembrane regions of TrwEBt and TrwB. Predicted transmembrane segments are represented by helices imbedded in the inner membrane (IM). C, cytoplasm; P, periplasm. N, N-terminus of the proteins. The location of the residues shown to be involved in the interaction is indicated with arrows. **Right**, protein-protein interactions tested by the two-hybrid assay as shown in Fig. 2. For each spot, the pairs of proteins produced as T25 and T18 fusions are indicated. The top panel shows the TrwEBt mutants tested against TrwB; the middle panel, TrwB mutants tested against TrwEBt; and the bottom panel, TrwB mutants tested against TrwB or themselves.

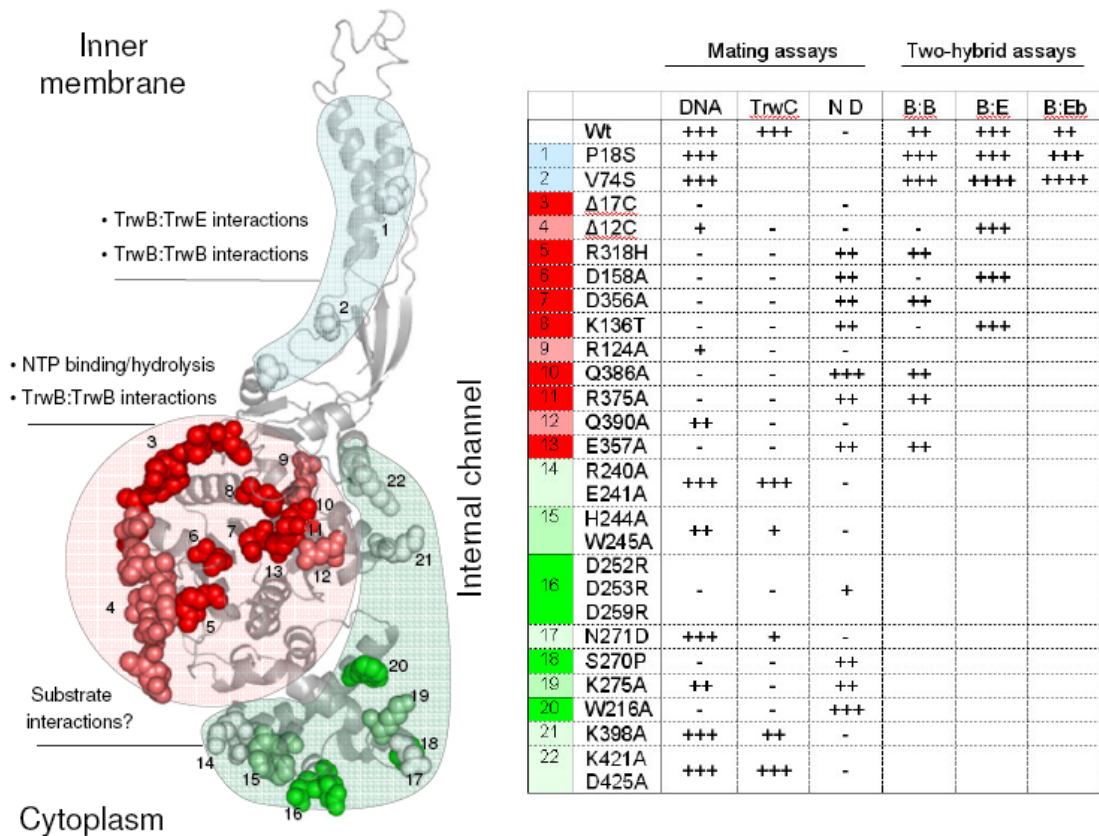


Figure 6. *Left*, representation of a TrwB protomer with the mutated residues shown spacefilled and their proposed function indicated in a colour code. Within each proposed functional domain, the spacefilled residues show brighter colours when their mutation affects the transfer efficiency. The 3D structure of the N-terminal TMD has been modelled as in (17). Each mutated residue is marked with a number. *Right*, the Table summarizes the results obtained from the in vivo assays for each mutant. Mating assays: DNA transfer efficiency (DNA), TrwC transport efficiency (TrwC), and negative dominance (ND). Two-hybrid assays: TrwB-TrwB interactions (B:B), TrwB-TrwE interactions (B:E), and TrwB-TrwEBt interactions (B:Eb).

Table 1. Published plasmids used in this work.

Plasmid	Description	Phenotype	Reference
pET29: <i>trwAC</i>	pET29c: <i>P_{trwA}-trwA-trwC</i>	Km TrwA TrwC	(13)
pHP100	pSU24: <i>trwE</i> <i>Bartonella</i>	Cm TrwE- <i>Bartonella</i>	(11)
pHP102	pSU24: <i>trwE</i>	Cm TrwE	(11)
pKM101 Δ <i>mob</i>	pKM101 SmaI deletion	Ap IncN Tra- T4SS+	(13)
pMTX502	pT25:: <i>trwB</i> Δ N75	Cm T25:TrwB Δ N75	(34)
pMTX503	pT18:: <i>trwB</i> Δ N75	Ap TrwB Δ N75:T18	(34)
pMTX513	pUT18C:: <i>trwB</i>	Ap T18:TrwB	(34)
pMTX514	pT25:: <i>trwB</i>	Cm T25:TrwB	(34)
pMTX611	pSU4633 (<i>trwB</i> -W216A)	Cm TrwA TrwB-W216A	(51)
pMTX631	pUT18C:: <i>trwE</i>	Ap T18:TrwE	(34)
pMTX632	pT25:: <i>trwE</i>	Cm T25:TrwE	(34)
pMTX697	pUT18C:: <i>trwE</i> (<i>Bartonella</i>)	Ap T18:TrwE- <i>Bartonella</i>	(11)
pMTX698	pT25:: <i>trwE</i> (<i>Bartonella</i>)	Cm T25:TrwE- <i>Bartonella</i>	(11)
pSU19	Cloning vector	Cm Rep(p15A)	(2)
pSU1443	R388:Tn5 <i>tac1</i> in <i>trwB</i>	Tp Km Tra- IncW	(31)
pSU1445	R388:Tn5 <i>tac1</i> in <i>trwC</i>	Tp Km Tra- IncW	(31)
pSU2007	R388 Km ^R	All TRAW proteins	(37)
pSU4134	R388:Tn5 <i>tac1</i> in <i>trwE</i>	Tp Km Tra- IncW	(34)
pSU4622	pSU24:: <i>P_{trwA}-trwA-trwB</i>	Cm TrwA TrwB	(39)
pSU4623	pSU4622 (<i>trwB</i> -KpnI)	Cm TrwA TrwB-KpnI	(39)
pSU4632	pSU4622 (<i>trwB</i> -K136T)	Cm TrwA TrwB-K136T	(39)
pSU4633	pSU4622 (<i>trwB</i> -KpnI/NdeI)	Cm TrwA TrwB-KpnI/NdeI	(39)
pT25	2-hybrid cloning vector	Cm T25	(26)
pT25zip	2-hybrid positive control	Cm T25-leuzipper	(26)
pUT18	2-hybrid cloning vector	Ap T18	(27)
pUT18C	2-hybrid cloning vector	Ap T18	(27)
pUT18zip	2-hybrid positive control	Ap T18-leuzipper	(27)

Table 2. Bacterial plasmids constructed in this work.

Plasmid	Description	Construction ¹		
		Vector	Insert	Digestion/oligonucleotides (5' - 3')
<i>Plasmids expressing PtrwA-trwA-trwB</i>				
pMTX520	<i>trwB-D158A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	CCGCATGGTAATTGTGGCGCCGAATGGCGATATG CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX521	<i>trwB-D356A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	GGCTGTTTCATCGCCGAGCTCGCTTCGCTGGAAAAG CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX524	<i>trwB-Q386A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	GTGGCGGGCCTGGCGTCCGACCTCGCAG CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX525	<i>trwB-Q390A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	CTGCAATCGACCTCAGCGCTTGATGACGTGT CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX527	<i>trwB-R240A E241A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	ACGCCTTCCATGGCAGCGCTGTTCCACTGGA CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX528	<i>trwB-H244A W245A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	ATGCGCGAATTGTTCCGCGGACAACGATCGCCAC CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX530	<i>trwB-R375A</i>	pSU4633	pMTX517	KpnI + EcoRI
pMTX533	<i>trwB-D252A D253A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	TCGCCACGTTTGCAGCGCTGCGGGGGTTTC CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX546 ²	<i>trwB-D252R D253R E259R</i>	pSU4633	PCR on pSU1443	CATGCGCGAATTGTTCCACTGGACAACCATCGCCACGTTTCGTC GACCCCGGATGAATGTCA // CCAGCAAACAAGATTCCGGCCAA AGTTCCTCGCAGAAACCCCGCAGTCGACGGATTTGCACTGCC
pMTX549	<i>trwB-N271D</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	TGCTGGGTCCGATGAAGCGAG CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCTGGATCCGATGCATCCAGACGATCA
pMTX550	<i>trwB-K275A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	TGA AGC GAG CGC GGC GCT GAC CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCTGGATCCGATGCATCCAGACGATCA

Construction ¹

Plasmid	Description	Vector	Insert	Digestion/oligonucleotides (5' - 3')
pMTX552	<i>trwB-K421A D425A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	CCGACCCGGCAACCAATGAGGCCATGAGTTTGA CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCTGGATCCGATGCATCCAGACGATCA
pMTX553 ³	<i>trwB-K398A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	ACGGCGTGGCAGAGGCGCAG CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCTGGATCCGATGCATCCAGACGATCA
pMTX554	<i>trwB-Δ17C</i>	pSU4633	pMTX555	KpnI + EcoRI
pMTX558	<i>trwB-R124A</i>	pSU4633	PCR on pMTX518	CCACATATGAATAGCGTCGGACAAGG CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA
pMTX559	<i>trwB-E357A</i>	pSU4633	PCR on pSU4633	CTGTTTCATCGACGCGTTGGCTTCGCTG CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA CCAGGATCCTCGGACAAGGCGAATTTG
pMTX560	<i>trwB-Δ12C</i>	pSU4633	pMTX557	KpnI + EcoRI
pMTX590	<i>trwB-S270P</i>	pSU4633	none	None (random mutagenesis)
pMTX593	<i>trwB-R318H</i>	pSU4633	none	None (random mutagenesis)
Plasmids expressing <i>trwB</i> under the control of the lactose promoter				
pDEL003	pSU19: <i>trwA-trwB</i>	pHP139	PCR on pSU4622	TGACATATGGCACTAGGCGAC CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA
pHP138 ⁴	pET29c: <i>oriT-trwA-trwC</i>	pET29: <i>trwAC</i>	PCR on pSU2007	TTACTCTAGACTCATTCTGCATCATTGT TTACTCTAGATTGTAGTGGCATAACACTA
pHP139	pSU19: <i>trwB</i>	pSU19	PCR on pMTX601	TTACAAGCTTAGGAGGATCCATATGCATCCAGACGATCAAA ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP140	pSU19: <i>trwB-Q390A</i>	pHP139	pMTX525	KpnI + EcoRI
pHP141	pSU19: <i>trwB-R240A E241A</i>	pHP139	pMTX527	KpnI + EcoRI
pHP142	pSU19: <i>trwB-H244A W245A</i>	pHP139	pMTX528	KpnI + EcoRI
pHP143	pSU19: <i>trwB-D252A D253A</i>	pHP139	pMTX533	KpnI + EcoRI
pHP145	pSU19: <i>trwB-N271D</i>	pHP139	pMTX549	KpnI + EcoRI
pHP146	pSU19: <i>trwB-K275A</i>	pHP139	pMTX550	KpnI + EcoRI
pHP149	pSU19: <i>trwB-V74I</i>	pHP139	pHP106	BamHI + KpnI
pHP150	pSU19: <i>trwB-P18S S95N</i>	pHP139	pHP107	BamHI + KpnI
pHP169	pSU19: <i>trwB-K421A D425A</i>	pHP139	pMTX552	KpnI + EcoRI
pHP170	pSU19: <i>trwB-K398A</i>	pHP139	pMTX553	KpnI + EcoRI
Construction¹				

Plasmid	Description	Vector	Insert	Digestion/oligonucleotides (5´-3´)
Constructs in vectors for bacterial two-hybrid assay				
pHP106	pUT18C:: <i>trwB-V74I</i>	pMTX601	PCR ⁵ on pMTX601 BamHI + KpnI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP107	pUT18C:: <i>trwB-P18S S95N</i>	pMTX601	PCR ⁵ on pMTX601 BamHI + KpnI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP108	pUT18C:: <i>trwB-P18S</i>	pMTX601	PCR ⁵ on pMTX601 BamHI + KpnI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP119	pUT18C:: <i>trwEBt-T107S</i>	pMTX697	PCR ⁵ on pMTX697 BamHI + NdeI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP120	pUT18C:: <i>trwEBt-P57A</i>	pMTX697	PCR ⁵ on pMTX697 BamHI + NdeI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP121	pUT18C:: <i>trwEBt-P57L T107A</i>	pMTX697	PCR ⁵ on pMTX697 BamHI + NdeI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP122	pUT18C:: <i>trwEBt-P57S</i>	pMTX697	PCR ⁵ on pMTX697 BamHI + NdeI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP123	pUT18C:: <i>trwEBt-V54L T126A</i>	pMTX697	PCR ⁵ on pMTX697 BamHI + NdeI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP124	pUT18C:: <i>trwEBt-V52L</i>	pMTX697	PCR ⁵ on pMTX697 BamHI + NdeI	GAAGTTCTCGCCGGATGT ATGCGGCATCAGAGCAGATTG
pHP126	pT25:: <i>trwB-V74I</i>	pT25	pHP106	BamHI+ EcoRI
pHP127	pT25:: <i>trwB-P18S</i>	pT25	pHP108	BamHI+ EcoRI
pMTX544	pT25:: <i>trwB-K136T</i>	pT25	PCR on pSU4632	CCTGGATCCGATGCATCCAGACGATCA CCAGGATCCTAGATAGTCCCCTCAACAA
pMTX545	pUT18C:: <i>trwB-K136T</i>	pUT18C	PCR on pSU4632	CCTGGATCCGATGCATCCAGACGATCA CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA
pMTX601	pUT18C:: <i>trwB</i> with <i>KpnI</i>	pUT18C	PCR on pSU4623	CCTGGATCCGATGCATCCAGACGATCA CCAGAATTCTAGATAGTCCCCTCAACAA
pMTX615	pUT18C:: <i>trwB-Δ12C</i>	pMTX513	pMTX560	BsmI + EcoRI
pMTX616	pUT18C:: <i>trwB-R375A</i>	pMTX513	pMTX530	BsmI + StyI
pMTX617	pUT18C:: <i>trwB-D356A</i>	pMTX513	pMTX521	BsmI + StyI
pMTX625	pUT18C:: <i>trwB-R318H</i>	pMTX513	pMTX593	BsmI + EcoRI
pMTX627	pT25:: <i>trwB-R375A</i>	pT25	pMTX616	BamHI + KpnI
pMTX628	pT25:: <i>trwB-D356A</i>	pT25	pMTX617	BamHI + KpnI

pMTX629	pUT18C:: <i>trwB-Q386A</i>	pMTX601	pMTX524	BsmI + StyI
pMTX630	pT25:: <i>trwB-R318H</i>	pT25	pMTX625	BamHI
pMTX633	pUT18C:: <i>trwB-D158A</i>	pMTX601	pMTX520	KpnI + StyI
pMTX645	pUT18C:: <i>trwB-E357A</i>	pMTX601	pMTX559	KpnI/ + StyI
pMTX647	pT25:: <i>trwB-Δ12C</i>	pT25	pMTX615	BamHI + EcoRI
pMTX648	pT25:: <i>trwB-D158A</i>	pT25	pMTX633	BamHI + EcoRI
pMTX652	pT25:: <i>trwB-Q386A</i>	pT25	pMTX629	BamHI + EcoRI
pMTX656	pT25:: <i>trwB-E357A</i>	pT25	pMTX645	BamHI + EcoRI

¹ First column lists the vector plasmids; second column lists the plasmids from which the inserts were obtained and the method, and third column indicates either the restriction enzymes used for cloning, or the oligonucleotides used for PCR amplification of the desired fragment, with the restriction sites underlined. When three oligonucleotides are shown, the mutant was done by the megaprimer method: the first two oligonucleotides were used for the first PCR reaction (the first oligonucleotide codes for the mutation; if a restriction site was introduced it is underlined), and this PCR was used as a megaprimer together with the third oligonucleotide in a second PCR reaction. The final PCR products were cloned either as a KpnI-EcoRI fragment in pSU4633 (except in pMTX558, which was digested with NdeI+EcoRI), or as a BamHI-EcoRI fragment in pGEX-3X or pMTX501.

² This plasmid was obtained by Red mutagenesis as described in Methods.

³ This mutant was found to contain the additional mutation R417S, which will be omitted for clarity.

⁴ The *oriT* fragment from plasmid pSU2007 was PCR-amplified and inserted into the XbaI site of plasmid pET29c::*trwAC*, lying 5' to the start of *trwA*; the orientation was selected to reconstruct the same *oriT-trwA* arrangement as in R388.

⁵ PCR reactions were performed with the GeneMorph system to introduce random mutations (see Methods). The oligonucleotides flank the inserts in vector pUT18C. After the mutagenic PCR, the fragment with the desired mutated region was obtained with the indicated restriction endonucleases.

Table 3. Mating assays under different *trwB* expression conditions

Assay type ¹	T4SS	<i>trwB</i> expression	Transfer frequency		
			IPTG induction		
			-	+	++
<i>a) DNA transfer assays</i>					
-	R388	--	< 10 ⁻⁷	< 10 ⁻⁷	< 10 ⁻⁷
A	R388	<i>PtrwA-trwAB</i>	3x10 ⁻³	2x10 ⁻³	3x10 ⁻³
B	R388	<i>Plac-trwB</i>	7x10 ⁻³	6x10 ⁻³	4x10 ⁻⁴
C	R388	<i>Plac-trwAB</i>	4x10 ⁻²	3x10 ⁻²	5x10 ⁻²
D	pKM101	<i>PtrwA-trwAB</i>	3x10 ⁻²	7x10 ⁻²	2x10 ⁻¹
E	pKM101	<i>Plac-trwB</i>	5x10 ⁻⁶	3x10 ⁻³	1x10 ⁻¹
F	pKM101	<i>Plac-trwAB</i>	7x10 ⁻⁵	3x10 ⁻¹	3 x10 ⁻¹
<i>b) Protein transport assays</i>					
-	pKKM101	--	< 10 ⁻⁷	< 10 ⁻⁷	< 10 ⁻⁷
G	pKM101	<i>PtrwA-trwAB</i>	2x10 ⁻⁶	3x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁴
H	pKM101	<i>Plac-trwB</i>	1x10 ⁻⁶	3x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁵
I	pKM101	<i>Plac-trwAB</i>	4x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁴

Standard (a) or triparental (b) matings were performed as described in Methods. IPTG was added to the mating plate only (+) or preceded by an additional two-hour incubation in liquid (++), as explained in Methods. Frequencies (as number of transconjugants per donor) are the mean of 3-5 independent experiments.

¹ As depicted in Figure 2.

Table 4. Transfer frequencies in the presence of different *TrwB* mutants.

TrwB mutant	Plasmid	Compl. pSU1443 ¹		Negative dom. ²	
		Freq.	%	Freq.	%
Wild-type	pSU4622	2x10 ⁻³	100	7x10 ⁻²	100
NBD					
R124A	pMTX558	4x10 ⁻⁵	2	2x10 ⁻²	30
K136T	pSU4632	<10 ⁻⁷	<0,01	3x10 ⁻⁴	0,44
D158A	pMTX520	<10 ⁻⁷	<0,01	1x10 ⁻⁴	0,18
D356A	pMTX521	<10 ⁻⁷	<0,01	6x10 ⁻⁵	0,09
E357A	pMTX559	<10 ⁻⁷	<0,01	1x10 ⁻⁴	0,20
R375A	pMTX530	<10 ⁻⁷	<0,01	8x10 ⁻⁵	0,10
Q386A	pMTX524	<10 ⁻⁷	<0,01	1x10 ⁻⁶	0,002
Q390A	pMTX525	1x10 ⁻³	61	7x10 ⁻³	11
AAD					
R240A E241A	pMTX527	4x10 ⁻³	200	2x10 ⁻²	32
H244A W245A	pMTX528	3x10 ⁻³	150	9x10 ⁻³	13
D252A D253A	pMTX533	3x10 ⁻³	150	1x10 ⁻²	19
D252R D253R D259R	pMTX546	<10 ⁻⁷	<0,01	6x10 ⁻³	9
ICH					
W216A	pMTX611	<10 ⁻⁷	<0,01	2x10 ⁻⁷	0,0003
N271D	pMTX549	8x10 ⁻⁴	40	2x10 ⁻²	28
K275A	pMTX550	5x10 ⁻⁴	25	9x10 ⁻⁴	1,3
K398A	pMTX553	3x10 ⁻³	150	1x10 ⁻²	19
K421A D425A	pMTX552	4x10 ⁻⁴	20	9x10 ⁻³	13
C-term. deletions					
Δ17C	pMTX554	2x10 ⁻⁷	0,01	1x10 ⁻²	18
Δ12C	pMTX560	5x10 ⁻⁶	0,25	1x10 ⁻²	20
Random mutants					
S270P	pMTX590	<10 ⁻⁷	<0,01	2x10 ⁻⁴	0,30
R318H	pMTX593	<10 ⁻⁷	<0,01	1x10 ⁻⁴	0,10

Donor and recipient strains were D1210 and DH5a, respectively. Frequencies are in transconjugants per donor, and are the mean of 2-9 independent assays. Reduced frequencies are highlighted with shadows: light gray for mild effects and dark gray for stronger phenotypes.

¹ Transfer of pSU1443 (Table 1), a transfer-deficient R388 derivative with a transposon insertion in *trwB*. It was complemented by pSU4633 derivatives carrying the indicated *trwB* mutations.

² Negative dominance. Donor strains carried plasmid pSU2007 (a Km^R R388 derivative) and pSU4622 or derivatives carrying the indicated mutations in *trwB*.

Table 5. Mating assays with *trwB* mutants under different expression conditions.

Type of assay ¹	A	B	E			G
<i>trwB</i> promoter	<i>PtrwA</i>	<i>Plac</i>	<i>Plac</i>			<i>PtrwA</i>
<i>trwA</i> coexpression	YES	NO	NO			YES
T4SS	R388	R388	pKM101			pKM101
IPTG	-	-	-	+	++	-
TrwB mutant (domain)						
Wild-type	2x10 ⁻³	6x10 ⁻³	5x10 ⁻⁶	2x10 ⁻³	5x10 ⁻²	4x10 ⁻³
Q390A (NBD)	1x10 ⁻³	4x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁷	4x10 ⁻⁴	<7x10 ⁻⁷
R240A E241A (AAD)	4x10 ⁻³	2x10 ⁻³	3x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻²	6x10 ⁻⁴
H244A W245A (AAD)	3x10 ⁻³	6x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁸	7x10 ⁻⁵	2x10 ⁻²	1x10 ⁻⁶
D252A D253A (AAD)	3x10 ⁻³	2x10 ⁻³	6x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻¹	8x10 ⁻⁴
N271D (AAD/ICH)	8x10 ⁻⁴	4x10 ⁻³	4x10 ⁻⁷	4x10 ⁻⁴	4x10 ⁻²	4x10 ⁻⁶
K275A (ICH)	5x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁷	8x10 ⁻⁵	1x10 ⁻³	1x10 ⁻⁴
K398A (ICH)	3x10 ⁻³	4x10 ⁻³	1x10 ⁻⁵	2x10 ⁻²	2x10 ⁻¹	7x10 ⁻⁵
K421A (ICH)	1x10 ⁻³	7x10 ⁻²	1x10 ⁻⁷	5x10 ⁻²	1x10 ⁻¹	4x10 ⁻³

Assays type A-E test the effect of *trwB* mutants on DNA transfer, and were performed as in Table 4. Assay G tests the effect on TrwC transport in the absence of DNA transfer and was performed as explained in Methods, using DH5 α as donor strain. Numbers are the mean of 2-10 independent assays. Reduced frequencies are highlighted with shadows: light gray for mild effects (1-2 logs drop) and dark gray for stronger phenotypes (more than 3 logs drop).

¹ Assays as depicted in Fig. 2.

Table 6 - TrwB-TrwEBt mutants obtained by two-hybrid screen

<i>Plasmid</i>	<i>Protein</i>	<i>Mutation</i>		<i>Complementation*</i>	
		<i>DNA</i>	<i>Residue</i>	<i>pSU1443</i> (R388-trwB)	<i>pSU4134</i> (R388-trwE)
pUT18C	none			< 10 ⁻⁷	
pMTX601	TrwB	none	none	4,8 x10 ⁻³	
pHP106	TrwB	GTC->ATC	Val74-Ile	4,9 x10 ⁻³	
pHP107	TrwB	CCG->TCG AGT->AAT	Pro18-Ser Ser95-Asn	3,4 x10 ⁻³	
pHP108	TrwB	CCG->TCG	Pro18-Ser	3,8 x10 ⁻³	
pUT18C	none			< 10 ⁻⁷	
pMTX631	TrwE	none	none	1,9 x10 ⁻³	
pMTX697	TrwEBt	none	none	1,3 x10 ⁻⁶	
pHP119	TrwEBt	ACA->TCA	Thr107-Ser	1,5 x10 ⁻⁶	
pHP120	TrwEBt	CCA->GCA	Pro57-Ala	2,0 x10 ⁻⁶	
pHP121	TrwEBt	CCA->CTA ACA->GCA	Pro57-Leu Thr107-Ala	2,4 x10 ⁻⁷	
pHP122	TrwEBt	CCA->TCA	Pro57-Ser	2,9 x10 ⁻⁶	
pHP123	TrwEBt	GTA->TTA ACA->GCA	Val54-Leu Thr126-Ala	1,0 x10 ⁻⁶	
pHP124	TrwEBt	GTC->CTC	Val52-Leu	1,8 x10 ⁻⁶	

* Complementation: the indicated pairs of plasmids introduced into strain DH5 α were mated with strain D1210. pSU1443 and pSU4134 (Table 1) are transfer-deficient R388 derivatives with transposon insertions in *trwB* and *trwE*, respectively. Figures show transconjugants per donor and are the mean of 2-4 independent experiments.

