

Part IV

Discussió i Conclusions

Capítol 5

Discussió

5.1 Estructura del connector

El connector és una estructura troncocònica de 75 Å d'alçada rodejada de dotze lòbuls en la part més ampla amb un diàmetre total de 146 Å i de 77 Å en la part més estreta. Està format per 12 còpies de la proteïna p10 posades en forma de vòrtex al voltant d'un canal central de manera que l'extrem contrari al lòbul de cada proteïna està situat radialment sobre el lòbul de tres proteïnes p10 més enllà (fig. 3 de l'article 3, plana 95).

El domini lobular té un plegament tipus SH3, que consta de 6 làmines β en forma gairebé esfèrica i està emmarcat per dues hèlixs. La zona central del connector està formada per 3 hèlixs α per a cada proteïna i la zona distal (respecte els lòbuls) per unes nanses, unes fulles β curtes i una petita hèlix. Les hèlixs del domini central estan inclinades uns 45° respecte del radi del connector i aquesta inclinació augmenta fins a ser perpendicular al radi en el domini distal, donant l'aparença de turbina a l'estructura (fig 5.1).

El canal central té un diàmetre variable des de 35 Å en la part estreta del connector i s'eixampla en la part ampla, tot i que no podem assegurar quin és el seu diàmetre ja que la densitat no és clara en aquesta zona. Les reconstruccions de microscòpia electrònica veuen aquesta zona com uns lòbuls interns que donen al canal una forma cilíndrica de diàmetre aproximadament constant. L'interior del canal és majoritàriament negatiu excepte per uns anells paral·lels formats per lisines separats aproximadament 20 Å. Hi ha 3 d'aquests anells tot i que el tercer estaria en la zona de baixa densitat esmentada abans.

La unitat asimètrica del cristall de grup espacial I422 conté tres proteïnes p10 (cadenes A, B i C). A la cadena A s'observen 253 residus, des del 17 al 284 (de 291, fig 1 de l'article 3, plana 93), exceptuant la seqüència que va

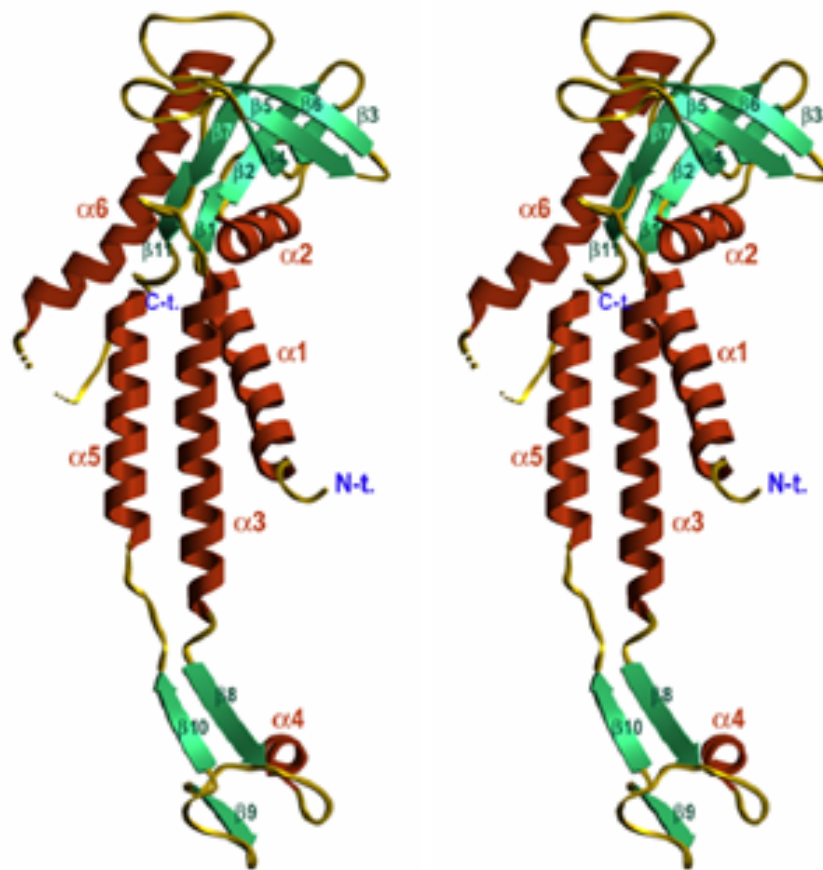


Figura 5.1: Monòmer. Representació estéreo en cintes d'un monòmer, amb la classificació dels elements d'estructura secundària.

des del 230 al 244, que correspon als lòbuls interns abans mencionats. A la cadena B se n'observen 255, des del 16 al 284, exceptuant del 231 al 244 i a la cadena C, se n'observen 251, des del 18 al 283 i exceptuant del 231 al 245 (fig. 5.2).

La unitat funcional (el connector sencer) es construeix a partir de la simetria de l'eix d'ordre 4 que el travessa longitudinalment pel centre del canal. El nombre de residus observats a la unitat funcional és de 3036, de 3492. La majoria dels residus que falten corresponen als extrems N i C-terminal, per on es va tallar la seqüència per propiciar la cristallització. El nombre total d'àtoms observats en la unitat funcional és de 24696, a més de 1976 molècules d'aigua directament lligades a l'estructura per ponts

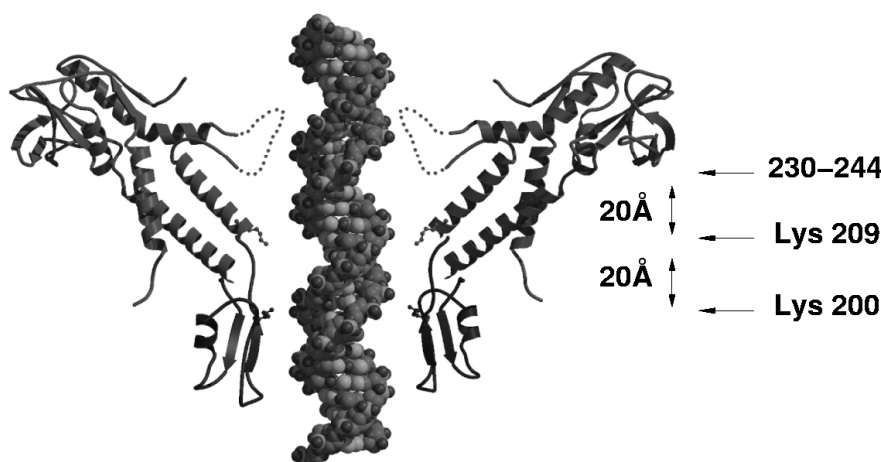


Figura 5.2: Secció lateral. Representació en cintes de dos monòmers oposats amb un DNA en esferes. Les dues lisines de cada monòmer estan representades independentment i també, amb línia discontinua l'espai que ocuparien els residus mòbils que no s'han pogut resoldre. La forma d'aquesta línia discontinua està basada en el model de microscòpia electrònica, on es veu que ha de formar un lòbul interior. La distància entre cada grup és d'uns 20 Å, que és el pas de rosca del DNA.

d'hidrogen i 16 molècules d'MPD situades en la part central de l'estructura (fig. 3.10, plana 55).

Comparant amb l'altra estructura del connector ja publicada [48, 47], no s'observen grans diferències en la forma global del connector. També coincideixen les zones desordenades dels lòbuls interns. De totes maneres, segurament a causa de la menor resolució d'aquesta estructura (3.2 Å), no han observat dues característiques molt importants pel model del mecanisme del connector.

La primera característica correspon a la forma de domini SH3 dels lòbuls externs. Tal com manifesten en la seva discussió, creuen que aquesta zona és flexible, ja que observen desviacions a la simetria 12 en aquesta zona. En el nostre cas la simetria és perfecta, i la zona està a més molt ben definida. Per això varem poder-la traçar correctament i determinar que tenia estructura tipus SH3, altament hidrofòbica, que és la propietat ideal per a que el connector roti lliurement dins de la càpsida (fig. 5.2).

L'altra característica es troba en el canal central. Probablement pels mateixos motius que abans, no han observat els anells de càrrega positiva

situats cada 20 Å. Si bé la situació de les lisines que formen els anells és la mateixa en la seva estructura, no tenien bona densitat en les cadenes laterals, per la qual cosa no es devien tenir en compte en calcular la càrrega de la molècula. Aquesta característica provoca una diferència radical en el seu model del mecanisme del connector.

5.2 Mecanisme del connector

Hi ha dos aspectes principals en el procés de l'empaquetament del DNA dins de la càpsida dels bacteriòfags. Un és el pas del DNA a través de la maquinària empaquetadora i l'altre l'alta concentració que ha d'assolir el DNA dins d'aquesta càpsida. Aquesta alta concentració genera una pressió molt alta i també una gran densitat de càrrega. Per tant, la maquinària empaquetadora ha d'ajuntar característiques d'altres proteïnes processives del DNA [29] amb un sistema capaç alhora d'alliberar les tensions que es poguessin acumular en un DNA que s'ha d'empaquetar en un espai molt limitat.

El diàmetre del canal del connector té la mida justa per tal que passi una cadena doble de DNA. En algunes zones una mica més amples del canal hi ha l'espai just per què hi càpiga també una capa de molècules d'aigua.

La paret interior és majoritàriament negativa, a l'igual que ho és la superfície exterior d'una cadena de DNA. La repulsió de càrregues evita que el DNA quedi lligat a l'interior del connector, ajudant-lo també que travessi suaument el connector i el manté centrat al llarg de l'eix de simetria.

L'excepció a aquesta paret negativa són unes lisines que formen dos anells de densitat positiva (i potser un tercer) separats 20 Å, que és el pas de rosca del DNA (figura 5b del tercer article, plana 97). Si orientem un dels fosfats del DNA davant d'una de les lisines, es pot formar un pont d'hidrogen entre aquest parell. A més es pot formar, en el mateix anell, un altre pont entre àtoms equivalents de la segona cadena del DNA. No diametralment, sinó a 5 monòmers de distància. A la vegada s'observa una situació idèntica en el segon anell.

Si el connector està girant respecte al DNA, en qualsevol moment hi haurà aquestes quatre interaccions entre connector i DNA. És possible que també n'hi hagi dues més al tercer anell de lisines no ordenades que també es troba a uns 20 Å del segon anell.

L'interior del canal conté dotze hèlixs inclinades de tal manera que quedarien perpendiculars a l'esquelet de sucres i fosfats del DNA que travessaria el canal. Es creu que aquesta qualitat evita que la proteïna penetri dins del solc major del DNA i facilita així que pugui lliscar al llarg de la proteïna. A

part d'aquesta coincidència, el connector té una estructura molt diferent que altres proteïnes processives, per la qual cosa el seu mecanisme ha de ser d'un tipus nou.

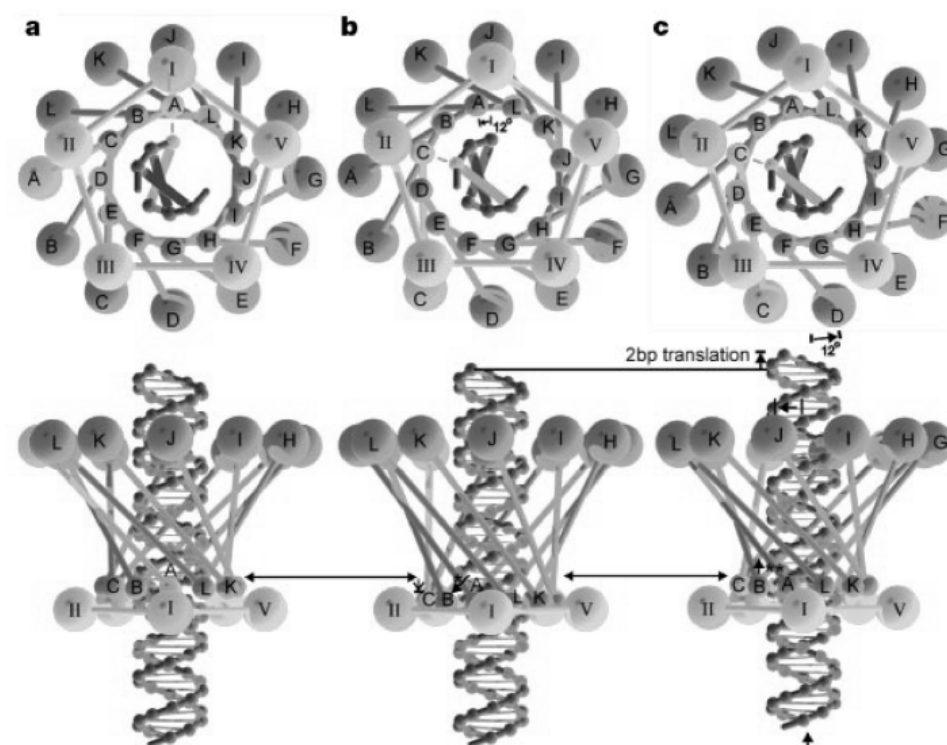


Figura 5.3: Un model per a l'empaquetament. Model proposat a [48] per l'acció del connector. El pRNA i l'ATPasa estan formats per 5 subunitats (pentàgon). Les 12 esferes grans exteriors i les interiors petites representen, respectivament, els dominis amples i estret del connector. (Veure text, plana 111)

A partir de l'estructura cristal·logràfica ja s'ha proposat un model de l'empaquetament del DNA [48]. La falta de simetria 12 perfecta de l'estructura del connector que presenten fa creure que el processament del DNA es basa en la flexibilitat del connector.

En contrast al que han proposat altres autors (plana 14), han observat per microscòpia electrònica que el pRNA té simetria 5, enlloc de 6. L'ATPasa p16 que estaria unida al pRNA també estaria composta de 5 unitats. Aquest conjunt podria estar unit al vèrtex de la càpsida del $\Phi 29$, formant un tap

inferior que evitaria que el connector s'escapés de la càpsida. L'element giratori seria únicament el connector. L'asimetria entre el conjunt pRNA-p16 i el connector permetria que aquest girés amb poca energia aportada per la hidròlisi de l'ATP. Aquesta hidròlisi actuaria seqüencialment en cada subunitat de la p16, cada cop que un dels 12 monòmers del connector estigués enfront. La part interactuant entre el connector i la p16 està en el domini estret del connector. L'energia empenyeria el connector fent-lo rodar en dues etapes. En la primera només giraria 12° el domini estret del connector. En la segona, el seguiria el domini ample i acompanyaria alhora en DNA, que avançaria dos parells de bases (fig. 5.3).

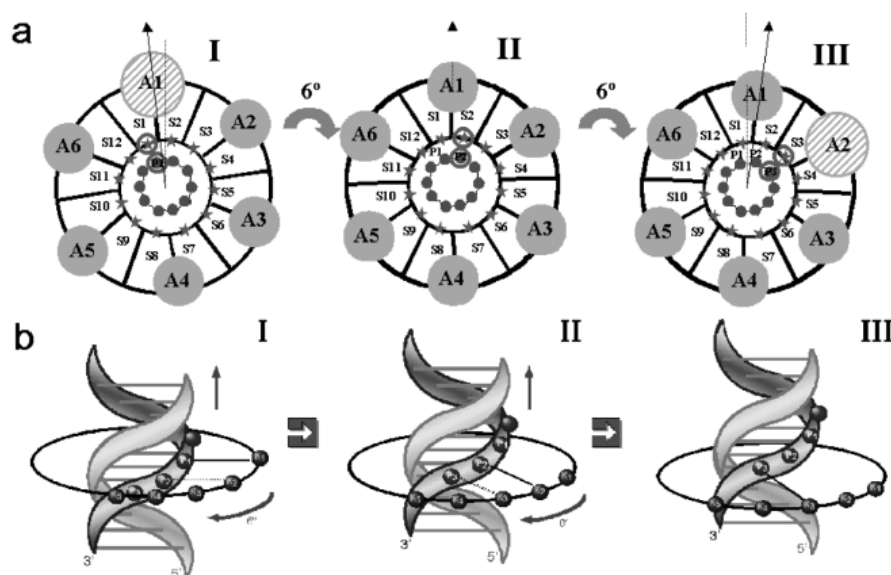


Figura 5.4: El nostre model per a l'empaquetament. Model proposat en aquest treball per a l'empaquetament del DNA. El pRNA i l'ATPasa estan formats per 6 subunitats (cercles grans). El connector està representat pels 12 sectors circulars i les lisines són les 12 estrelles. Els 10 cercles interns representen els fosfats del DNA que entra pel canal del connector. Per a una explicació, veure el text (plana 112) i la figura 6 de l'article 3 (plana 100)

En el nostre model, considerem que el pRNA i la p16 tenen ambdós

simetria 6, tal com prediuen estudis de microscòpia electrònica, bioquímics, funcionals i la longitud de la seva seqüència (plana 14). Com que el pRNA i la p16 han de desaparèixer en finalitzar l'empaquetament del DNA (plana 15), seria més senzill si el complex no estigués unit a la càpsida. Podria ser que la p11 els desplaçés en el moment d'unió de la cua del fag. El connector, el pRNA i la p16 formarien el conjunt rotatori (fig. 5.4).

El DNA té els fosfats repartits circularment cada 36° (simetria 10_1), i el connector té les lisines cada 30° (simetria 12). La rotació necessària del connector per a que passi d'un grup d'interaccions a les següents és de només 6° . Després d'aquesta rotació es tornarà a repetir la situació inicial, però ara els enllaços seran amb fosfats del següent nivell, 3.6 Å per sota. L'atracció per ponts d'hidrogen és prou propera com per a que durant la rotació de 6° es puguin començar a formar enllaços amb els fosfats que estan pujant. A la vegada, els fosfats que s'allunyen aniran perdent aquesta interacció.

Una volta de 360° del connector representaria la translació de 60 parells de bases. S'ha mesurat que el DNA travessa el connector a una velocitat d'uns 140 parells de bases per segon [49], enlentint-se a mesura que queda més comprimit dins de la càpsida. El connector rotaria així a una mica més de dues revolucions per segon, encapsulant els 19000 parells de bases del genoma del $\Phi 29$ en menys de 3 minuts.

El connector encaixa bé en el vèrtex de la càpsida (fig 3c del tercer article, plana 95). El tronc central del connector té una estructura hidrofòbica que permetria que rotés lliurement, aprofitant la diferència de simetries entre aquest i el vèrtex de la càpsida. El disc ample, amb els dotze lòbuls formant estructures tipus SH3, seria qui mantindria el connector en el seu lloc, evitant que pogués desplaçar-se longitudinalment.

L'avantatge d'aquest model és que no cal cap variació en l'estructura del connector. No són necessaris ni canvis en cadenes laterals, ni moviments dels dominis. Un connector rígid pot complir la seva funció molt més ràpid, com una turbina. L'estructura observada és molt compacte i no sembla quedar lloc per canvis relatius entre monòmers. Aquesta afirmació està reforçada pel fet que el connector ha empaquetat en un grup espacial amb alta simetria, amb l'eix 12 situat al llarg d'un de quaternari. Si el connector fos flexible, les diferències entre monòmers no haguessin produït un grup espacial d'aquesta mena. Els monòmers estan separats per un angle de 30 graus exactes.

Reconstruccions de microscòpia electrònica prediuen que el pRNA podria estar localitzat a l'extrem estret del connector. En l'estructura obtinguda, observem que aquest extrem està coronat per una curta hèlix α rica en glutamines i asparagines exposades. Aquesta configuració li dota de potencials ponts d'hidrogen que podrien lligar-se amb el pRNA. El pRNA té simetria 6 i, lligat a l'extrem distal, formaria amb el connector una estructura rígida

on el pRNA seria qui reconeix i condueix el DNA cap a l'entrada del connector. Alhora, el pRNA faria el paper equivalent dels lòbuls del connector i n'evitaria moviments longitudinals d'aquest. L'encaixaria, però no el fixaria en el vèrtex de simetria cinc de la càpsida.

La proteïna ATPasa p16 és l'últim component necessari en el mecanisme d'empaquetament del DNA. Aquesta proteïna intervé en l'empaquetament del DNA dins de la càpsida, subministrant energia, però desapareix en el virus format, ja que per a la infecció és suficient l'energia adquirida pel DNA en comprimir-se en la càpsida.

Es coneix que connectors sense els primers 13 residus de l'extrem N-terminal no es lliguen amb p16. Aquest extrem està situat en la zona central del connector, per la qual cosa aquesta proteïna estaria formant un anell al voltant del tronc del connector i establiria alhora contacte amb el pRNA, situat immediatament a sota. El bloc giratori estaria llavors format pel connector, el pRNA i la p16. L'energia subministrada per la p16 faria girar tot el bloc gràcies a l'impuls proveït per la p16 interaccionant amb la càpsida.

Considerant que la p16 és un hexàmer, són necessàries dues rotacions de 6° per deixar el sistema en un estat igual a l'inicial, respecte de la cadena de DNA que està travessant el connector. Llavors, per a cada hidròlisi d'ATP el DNA avançaria dos parells de bases i coincidiria amb les dades experimentals.

Ambdós models prediuen un avanç de dos parells de bases de DNA cada 12° de rotació del connector, per la qual cosa l'eficiència i el consum d'ATP dels dos models és similar.

El fet que el conjunt rotatori estigui format només pel connector, o bé pel conjunt de connector, pRNA i p16, dependrà de si futurs estudis confirmen la simetria d'aquests dos últims. De totes maneres ja està establert que es tracta d'un sistema motor a base de peces concèntriques i asimètriques que li permeten superar la gran pressió de l'empaquetament del DNA amb un consum reduït d'energia.

El paper dels anells de lisines com a guies del DNA també s'haurà de demostrar en futurs experiments. L'avanç del DNA en aquest model proposat per nosaltres resultaria també producte d'un conjunt d'asimetries que s'anirien ajustant seqüencialment i permetrien l'aparició i desaparició de ponts d'hidrogen donant una aparença que s'estan movent circularment.

Capítol 6

Conclusions

6.1 Conclusions globals

Sobre l'estructura del connector:

- L'estructura del connector s'ha resolt i afinat a 2.1Å a partir d'uns cristalls amb simetria I422 i mostra una estructura amb una forma global similar a les reconstruccions de microscòpia electrònica, però amb detalls a nivell atòmic: Un grau més alt de vorticitat de les 12 còpies de la proteïna p10, un canal interior majoritàriament de càrrega negativa, però amb uns anells de càrrega positiva separats una distància igual al pas de rosca del DNA, i una zona externa amb afinitat al pRNA i a l'ATPasa.

Sobre l'extensió de fases:

- L'extensió de fases a partir d'un model de microscòpia té el problema de la baixa resolució d'aquest model. A aquesta resolució, els efectes del solvent podrien ser prou grans com per impedir un bon ajust de les reflexions. Caldria estudiar una manera d'afegir aquesta contribució, sense haver de fer servir un model d'alta resolució.

Sobre la derivació dels cristalls:

- L'estructura del connector ha mostrat un canal de càrrega negativa i molt uniforme de grans dimensions. Si bé els ions pesants podien entrar per aquest canal, no tenien un lloc únic on fixar-se, per la qual cosa quedaven desordenats dins del cristall.

Sobre el mecanisme d'empaquetament del DNA:

- L'estructura del canal interior del connector forçaria a que el DNA avanci centrat al llarg del seu eix, i sigui impulsat en la direcció correcta gràcies a uns anells de càrrega positiva que establirien en seqüència ponts d'hidrogen entre aquest i el DNA.

6.2 Conclusions dels articles

- Article 1

- Els cristalls de la proteïna p10 difractaven a molt baixa resolució, eren molt inestables i aguantaven molt poc temps el feix de raigs X a temperatura ambient. La congelació ràpida en propà líquid i la difracció sota un flux de nitrogen va permetre superar aquests problemes, incrementant la resolució fins al voltant dels 3 Å.
- Els cristalls eren de dos tipus. Uns de grans dimensions, amb 4 connectors per unitat asimètrica, i uns altres amb mig connector per unitat asimètrica. Aquesta segona forma va difractar a major resolució, i en ella s’hi van introduir àtoms pesants per intentar difracció anòmala.

- Article 2

- Els cristalls de la segona forma van permetre determinar, amb la funció d’autorotació, que la simetria del connector és 12, és a dir, el connector està format per 12 còpies de la proteïna p10. Es tracta del primer anàlisi estructural d’un connector de bacteriòfag, per cristal·lografia de raigs X. Tots els estudis previs s’havien fet per microscòpia electrònica.
- La funció d’autorotació va determinar, a més, que el connector estava orientat amb el seu canal paral·lel a l’eix c dels cristalls del tipus II, del grup espacial $P4_22_12$.

- Article 3

- Els cristalls del tipus II van resultar ser macles formades per dos conjunts de cel·les rotades 90°. Amb un model de microscòpia electrònica es va intentar el desmaclat de les dades, obtenint només resultats de l’estructura a baixa resolució.
- Una nova forma cristal·lina, en el grup espacial $I422$ va difractar a major resolució (2.1 Å), i amb ella es van intentar diverses derivacions.
- No es va poder localitzar cap del àtoms pesants introduïts en els cristalls, probablement a causa de que no tenen un lloc específic d’unió. Per això es va continuar intentant resoldre l’estructura per extensió de fases a partir d’un model de microscòpia electrònica a baixa resolució.

- A causa de l'empaquetament del connector en el cristall, l'extensió de fases només es podia fer aprofitant un eix de simetria no cristal·logràfica d'ordre 3, resultant en un avanç molt lent de l'extensió de fases. Amb aquest sistema es van poder començar a definir les zones helicoidals del tronc central del connector.
- Paral·lelament, un model sense afinar, a menor resolució va ser publicat i, amb ell, es va poder acabar de resoldre l'estructura a alta resolució.
- L'estructura del connector del fag $\Phi 29$, té una forma general tronco-cònica, rodejada per uns lòbuls en la part més ampla, i travessada per un canal longitudinal d'un diàmetre suficient per al pas d'una cadena doble de DNA.
- L'interior del canal està molt carregat negativament, a l'igual que la superfície exterior del DNA. Únicament uns anells de lisines, separats igual que una volta de DNA, donen càrrega positiva al canal.
- Aquests anells de lisina probablement guien el DNA al llarg del seu pas, interaccionant amb els àtoms d'oxigen que estan units als de fòsfor del DNA. En rotar el connector, aquestes interaccions profereixen un moviment lineal al DNA al llarg del canal, sense necessitat de tòrcer-lo. Molt semblant a la manera com avança linealment un cargol sota l'acció d'una rosca giratòria.

Referències

- [1] The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D*, 50:760–763, 1994.
- [2] J.P. Abrahams. Bias reduction in phase refinement by modified interference functions: introducing the γ correction. *Acta Cryst D.*, 53:371–376, 1997.
- [3] M. O. Badasso, P. G. Leiman, Y. Tao, Y. He, D. H. Ohlendorf, M. G. Rossmann, and D. Anderson. Purification, crystallization and initial x-ray analysis of the head-tail connector of bacteriophage $\phi 29$. *Acta Crystallogr D*, 56:1187–90, 2000.
- [4] R.A. Bosacoma, A.G. Blanco, M. Solà, B.L. Wanner, F.X. Gomis-Rüth, and M. Coll. Structural and functional analysis of a constitutively-active PhoB receiver domain provides further insights into the activation mechanism. *J. Mol. Biol.*, *in press*.
- [5] A.T. Brunger. Free r value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355:472–475, 1992.
- [6] Buerger. The patterson function and image theory. pages 276–316.
- [7] A.M. Campbell. *Bacteriophages*, chapter 15. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
- [8] J. M. Carazo, N. Garcia, A. Santisteban, and J. L. Carrascosa. Structural study of tetragonal-ordered aggregates of phage $\phi 29$ necks. *J Ultrastruct Res*, 89:79–88, 1984.
- [9] J. M. Carazo, A. Santisteban, and J. L. Carrascosa. Three-dimensional reconstruction of bacteriophage $\phi 29$ neck particles at 2·2 nm resolution. *J Mol Biol*, 183:79–88, 1985.

- [10] J. L. Carrascosa and J.M. Valpuesta. Bacteriophage connectors: Structural features of a DNA translocating motor. *Recent Res. Devel. Virol.*, 1:449–465, 1999.
- [11] L. Carrascosa, J. E. Viñuela, N. García, and A. Santiesteban. Structure of the head to tail connector of bacteriophage $\phi 29$. *J. Mol. Biol.*, 154:311–324, 1982.
- [12] C. Chen and P. Guo. Sequential action of six virus-encoded DNA-packaging RNAs during phage $\phi 29$ genomic DNA translocation. *Journal of virology*, 71:3864–3871, 1997.
- [13] Area Detector Systems Corporation. Quantum CCD X-ray detectors. *Manual*.
- [14] L. E. Donate, H. Murialdo, and J. L. Carrascosa. Production of $\lambda - \phi 29$ phage chimeras. *Virology*, 179:936–40, 1990.
- [15] L.E. Donate, J.M. Valpuesta, C. Mier, F. Rojo, and J.L. Carrascosa. Characterization of a RNA-binding domain in the bacteriophage $\phi 29$ connector. *J.Biol.Chem.*, 268:20198–20204, 1993.
- [16] L.E. Donate, J.M. Valpuesta, A. Rocher, E. Méndez, F. Rojo, M. Salas, and J.L. Carrascosa. Role of the amino-terminal domain of bacteriophage $\phi 29$ connector in DNA binding and packaging. *J.Biol.Chem.*, 267:10919–10924, 1992.
- [17] P. Dube, P. Tavares, R. Lurz, and M. van Heel. The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry. *EMBO J.*, 12:1303–1309, 1993.
- [18] R.G. Fisher and R.M. Sweet. Treatment of diffraction data from protein crystals twinned by merohedry. *Acta Cryst A*, 36:755–760, 1980.
- [19] E.F. Garman and T.R. Schneider. Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.*, 30:211–237, 1997.
- [20] C. Giacovazzo, H.L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti, and M. Catti. *Fundamentals of Crystallography*. International Union of Cristallography, Oxford University press, 1992.
- [21] F.X. Gomis-Rüth, I. Fita, R. Kiefersauser, R. Huber, F.X. Avilés, and J. Navaza. Determination of hemihedral twinning and initial structural analysis of crystals of the procarboxipeptidase a ternary complex. *Acta Cryst D*, 51:819–823, 1995.

- [22] F.X. Gomis-Rüth, G. Moncalián, R. Pérez-Luque, A. González, E. Cabezón, F. de la Cruz, , and M. Coll. The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature*, 409:637–41, 2001.
- [23] S. Grimes and D. Anderson. RNA dependence of the bacteriophage $\phi 29$ DNA packaging ATPase. *J. Mol. Biol*, 215:559–566, 1990.
- [24] A. Guasch, A. Párraga, J. Pous, J.M. Valpuesta, J.L. Carrascosa, and M. Coll. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage $\phi 29$ connector particle. *FEBS Lett*, 430:283–287, 1998.
- [25] A. Guasch, J. Pous, A. Párraga, J.M. Valpuesta, J.L. Carrascosa, and M. Coll. Crystallographic analysis reveals the 12-fold symmetry of the bacteriophage $\phi 29$ connector particle. *J Mol Biol*, 281(2):219–225, 1998.
- [26] P. Guo, C. Zhang, C. Chen, K. Garver, and C. Trottier. Inter-RNA interaction of phage $\phi 29$ pRNA to form a hexameric complex for virial DNA transportation. *Molecular Cell*, 2:149–155, 1998.
- [27] R. W. Hendrix. Bacteriophage DNA packaging: RNA gears in a DNA transport machine. *Cell*, 94:147–150, 1998.
- [28] R.W. Hendrix. Symmetry mismatch and DNA packaging in large bacteriophages. *PNAS*, 75:4779–4783, 1978.
- [29] M.M. Hingorani and M. O'Donnell. Toroidal proteins: running rings around DNA. *Curr. Biol.*, 8(3):R83–86, 1998.
- [30] C Ibáñez, J.A. García, J.L. Carrascosa, and M. Salas. Overproduction and purification of the connector protein *Bacillus subtilis* phage $\phi 29$. *Nucleic Acids Res.*, 12:2351–2356, 1984.
- [31] P. Jardine, M. C. McCormick, C. Lutze-Wallace, and D.H. Coombs. The bacteriophage T4 DNA packaging apparatus targets the unexpanded prohead. *J. Mol. Biol.*, 284:647–659, 1998.
- [32] P. J. Jardine and D.H. Coombs. Capside expansion follows the initiation of DNA packaging in bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 284:661–672, 1998.
- [33] P. Jekow, S. Schaper, D. Günter, P. Tavares, and W. Hinrichs. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the 13-fold

- symmetric portal protein of bacteriophage SPP1. *Acta Cryst D*, 54:1008–1011, 1998.
- [34] L.N. Johnson and D. Turk. Erice 2000: Methods for macromolecular crystallography. *IUCR Newsletter*, 9(2):11–12, 2001.
- [35] G.J. Kleywegt and A.T. Brünger. Checking your imagination: applications of the free R value. *Structure*, 4:897–904, 1996.
- [36] G.J. Kleywegt and T.A. Jones. xdlMAPMAN and xdlDATAMAN, programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. *Acta Cryst D*, 52:826–828, 1996.
- [37] A.L. Lehninger. *Bioquímica*. Ed. Omega, 1990.
- [38] M. F. Moody. Geometry of phage head construction. *J. Mol. Biol.*, 293:401–433, 1999.
- [39] D.J. Müller, A. Engel, J.L. Carrascosa, and M. Vélez. The bacteriophage ϕ 29 head-tail connector imaged at high resolution with the atomic force microscope in buffer solution. *EMBO J.*, 16:2547–2553, 1997.
- [40] M. Newville and J.O. Cross. Diffk manual.
- [41] M. Perutz. *Early days of protein crystallography*, volume 114, chapter 1. Academic Press, 1985.
- [42] J. Pous, A. Guasch, B. Ibarra, F.X. Gomis-Rüth, J.M. Valpuesta, N. Sousa, J.L. Carrascosa, and M. Coll. Detailed architecture of a DNA translocating machine: The high-resolution structure of the bacteriophage ϕ 29 connector particle. *J.Mol.Biol.*, 315:663–676, 2002. (AG and JP share first authorship).
- [43] E. Prince. *Mathematical Techniques in Crystallography and Materials Science*. Springer-Verlag, 1994.
- [44] R.J. Read. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Cryst D*, 57:1373–1382, 2001.
- [45] D.C. Rees. The influence of twinning by merohedry on intensity statistics. *Acta Cryst A*, 36:578–581, 1980.

- [46] V.R. Samygina, S.V. Antonyuk, V.S. Lamzin, and A.N. Popov. Improving the x-ray resolution by reversible flash cooling combined with concentration screening, as exemplified with PPase. *Acta Crystallographica D.*, 56:595–603, 2000.
- [47] A. A. Simpson, P. G. Leiman, Y. Tao, Y. He, M. O. Badasso, P. J. Jardine, D. L. Anderson, and M. G. Rossmann. Structure determination of the head-tail connector of bacteriophage $\phi 29$. *Acta Cryst. D*, 57:1260–1269, 2001.
- [48] A. A. Simpson, Y. Tao, P. G. Leiman, M. O. Badasso, Y. He, P. J. Jardine, N. H. Olson, M. C. Morais, S. Grimes, D. L. Anderson, T. S. Baker, and M. G. Rossmann. Structure of the bacteriophage $\phi 29$ DNA packaging motor. *Nature*, 408:745–50, 2000.
- [49] D.E. Smith, S.J. Tans, S.B. Smith, S. Grimes, D.L. Anderson, and C. Bustamante. The bacteriophage $\Phi 29$ portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, 413:748–752, 2001.
- [50] E. Stanley. The identification of twins from intensity statistics. *J. Appl Cryst.*, 5:191–194, 1972.
- [51] S. Turnquist, M. Simon, E. Egelman, and D. Anderson. Supercoiled dna wraps around the bacteriophage $\phi - 29$ head-tail connector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10479–10483, 1992.
- [52] M. Valle, L. Kremer, F. Martinez, A. C. and Roncal, J. M. Valpuesta, J. P. Albar, and J. L. Carrascosa. Domain architecture of the bacteriophage $\phi 29$ connector protein. *J Mol Biol*, 288:899–909, 1999.
- [53] J. M. Valpuesta, J. J. Fernandez, J. M. Carazo, and J. L. Carrascosa. The three-dimensional structure of a DNA translocating machine at 10 Å resolution. *Structure*, 7:289–96, 1999.
- [54] J.M. Valpuesta, L. Carrascosa, J, and R. Henderson. Analysis of electron microscope images and electron diffraction patterns of thin crystals of $\phi 29$ connectors in ice. *J. Mol. Biol*, 240:281–287, 1994.
- [55] J.M. Valpuesta, H. Fujisawa, S. Marco, J.M. Carazo, and L. Carrascosa, J. Three-dimensional structure of T3 connector purified from overexpressing bacteria. *J.Mol.Biol.*, 224:103–112, 1992.
- [56] N. Verdager, B. Blaas, and I. Fita. Structure of Human Rhinovirus Serotype 2 (HRV2). *J. Mol. Biol.*, 300:1179–1194, 2000.

- [57] J.D. Watson. *The Double Helix, a personal account of the discovery of the structure of DNA*. W.W.Norton & Company, 1968.
- [58] H. Wiedemann. Synchrotron radiation primer. Technical report, Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, 1998.
- [59] A.J.C. Wilson. The probability distribution of X-ray intensities. *Acta Cryst*, 2:318–321, 1949.
- [60] W.B. Wood. Assembly of a complex bacteriophage *in vitro*. *BioEssays*, 14:635–639, 1992.
- [61] M. Wurtz. Bacteriophage structure. *Electron Microsc. Rev.*, 5:283–390, 1992.