

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE FÍSICA

Estructura Tridimensional del Connector del Bacteriòfag $\Phi 29$

Joan Pous i Ramos
IBMB-CSIC Barcelona

MEMÒRIA PRESENTADA PER OPTAR AL
TÍTOL DE DOCTOR EN CIÈNCIES FÍSiques

8 de febrer de 2002

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE FÍSICA

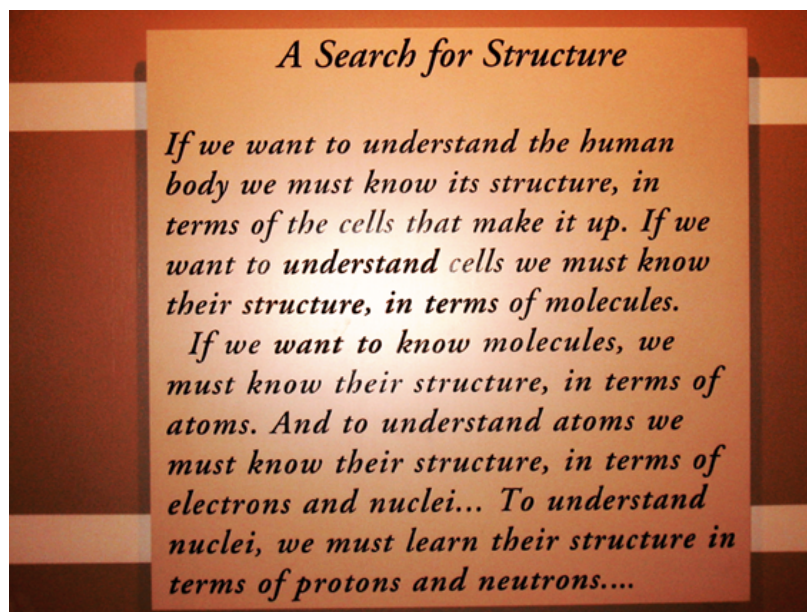
Estructura Tridimensional del Connector del Bacteriòfag $\Phi 29$

MEMÒRIA PRESENTADA PER
JOAN POUS I RAMOS,
IBMB-CSIC BARCELONA
PER OPTAR AL TÍTOL DE
DOCTOR EN CIÈNCIES FÍSiques

DIRECTOR
Dr. Miquel Coll Capella

TUTOR
Dr. Fernando López Aguilar

8 de febrer de 2002



Linus Pauling

Presentació

En aquest treball es descriu l'estructura afinada del connector del bacteriòfag $\Phi 29$, resolta per cristal·lografia de raigs X i es proposa un mecanisme de funcionament d'aquesta proteïna.

Els bacteriòfags són virus que ataquen els bacteris i el connector és una proteïna de grans dimensions situada en un vèrtex de la càpsida d'aquests virus que juga un paper central en la formació del bacteriòfag, en l'empaquetament del seu DNA i en la infecció dels bacteris.

El connector és part d'una bomba que transporta DNA. Té un mecanisme basat en asimetries dels components d'aquesta bomba que faciliten la rotació del connector amb un consum molt baix d'energia, i a la vegada una gran eficiència en el seu propòsit. La seva estructura no s'assembla a cap altra proteïna coneguda de funcions similars i, per tant en aquest treball no només es presenta una estructura important, per mida i funció, sinó que s'aporten idees noves de com s'estructuren les proteïnes per a complir les seves funcions.

Si volem entendre els virus, haurem de conèixer la seva estructura en termes dels àtoms i de les molècules que els formen.

Organització d'aquest treball

Aquest treball està dividit en les següents parts:

- **Introducció: El connector del fag $\Phi 29$** [plana 3] Descripció general dels estudis que s'han fet sobre l'estructura i mecanisme de virus bacteriòfags, enfocat al tema de la seva maduració, empaquetament del DNA i infecció de les cèl·lules, i al paper que té el connector en tots aquests processos.
- **Objectius** [plana 17] Objectius proposats alhora d'afrontar aquest treball.
- **Materials i Mètodes: La Cristal·lografia de proteïnes** [plana 21] Descripció dels mètodes utilitzats per a resoldre l'estructura. En aquest treball es va intentar afrontar la resolució de l'estructura de diverses maneres. No totes van resultar favorables, per la qual cosa s'ha fet una descripció de com es va intentar, junt amb els resultats que es van obtenir. Altres estan encara en desenvolupament i es descriu l'estat actual en aquest capítol.
- **Resultats:** [plana 75] Articles publicats i acceptats. Altres treballs en preparació no s'han inclòs aquí ja que es pretén continuar desenvolupant el tema en un futur. Aquests resultats preliminars estan descrits a Materials i Mètodes.

Aquesta tesi està basada en els següents treballs:

- Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage $\phi 29$ connector particle.
A. Guasch, A. Párraga, J. Pous, J.M. Valpuesta, J.L. Carrascosa, and M. Coll.
FEBS Lett, 430:283–287, 1998. [plana 77]
- Crystallographic analysis reveals the 12-fold symmetry of the bacteriophage $\phi 29$ connector particle.
A. Guasch, J. Pous, A. Párraga, J.M. Valpuesta, J.L. Carrascosa, and M. Coll.
J Mol Biol, 281(2):219–225, 1998. [plana 83]
- Detailed architecture of a DNA translocating machine: The high-resolution structure of the bacteriophage $\Phi 29$ connector particle.
J. Pous, A. Guasch, B. Ibarra, F.X. Gomis-Rüth, J.M. Valpuesta,

N. Sousa, J.L. Carrascosa and M. Coll.
J Mol Biol 315, 663–676, 2002. [plana 91]

- **Discussió** [plana 107] Resum de de l'estructura i mecanisme proposat per l'empaquetament del DNA pel connector. Discussió de les possibilitats d'aquest model de mecanisme respecte altres proposats.
- **Conclusions** [plana 115] Conclusions que responen als objectius plantejats al començar el treball i a altres que s'han anat plantejant durant el procés de resolució de l'estructura i d'interpretació del mecanisme. Conclusions independents de cada article.

Índex

Presentació	i
Organització d'aquest treball	iii
I Introducció	1
1 El connector del fag $\Phi 29$	3
1.1 El fag $\Phi 29$	3
1.2 El connector i la proteïna p10	5
1.2.1 Estructura del connector	5
1.2.2 El connector en la formació del fag	9
1.2.3 La infecció	12
1.3 Les simetries: cinc, sis, deu i dotze (o tretze)	12
2 Objectius	17
II Materials i Mètodes	19
3 La Cristal·lografia de proteïnes	21
3.1 Definicions	21
3.1.1 Els cristalls	21
3.1.2 Els cristalls de proteïna	21
3.2 Obtenció de la proteïna, dels cristalls i dels derivats	24
3.2.1 Obtenció de la proteïna p10	24
3.2.2 Els cristalls	24
3.2.3 Els derivats	25
3.3 Raigs X: generació, òptica, interacció amb els cristalls i detecció	26
3.3.1 Generació	26
3.3.2 Òptica	27
3.3.3 Interacció amb els cristalls	28
3.3.4 Detectores	30

3.4	L'experiment	31
3.4.1	Congelació i muntatge dels cristalls	31
3.4.2	Recollida i processament de les dades	33
3.5	Solució de l'estructura tridimensional	42
3.5.1	MIR i MAD	42
3.5.2	Reemplaçament Molecular	46
3.5.3	NCS	49
3.5.4	Màscares	50
3.5.5	L'extensió de fases	51
3.5.6	El traçat de l'estructura	54
3.6	Estructura final de la proteïna	55
3.6.1	L'afinament de l'estructura	55
3.6.2	Màxim de versemblança i Mínims quadrats	60
3.7	Macles	62
3.7.1	Macles hemièdriques	63
3.7.2	Procediment pràctic	66
3.8	Microscòpia electrònica	69
3.8.1	Reconstrucció de la M.E.	69
3.8.2	Ajust de la microscòpia i del model afinat	70
3.9	El PDB	72
 III Resultats		73
4 Resultats		75
Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage $\Phi 29$ connector particle.		77
Crystallographic analysis reveals the 12-fold symmetry of the bacteriophage $\Phi 29$ connector particle.		83
Detailed architecture of a DNA translocating machine: The high-resolution structure of the bacteriophage $\Phi 29$ connector particle.		91
 IV Discussió i Conclusions		105
5 Discussió		107
5.1	Estructura del connector	107
5.2	Mecanisme del connector	110

6	Conclusions	115
6.1	Conclusions globals	115
6.2	Conclusions dels articles	117
	Referències	119

Índex de figures

1.1	Primera micrografia de fags	3
1.2	Bacteriòfag T4	4
1.3	Perspectives del coll del fag $\Phi 29$	6
1.4	Cristall bidimensional	6
1.5	Representació tridimensional del connector a $9\text{\AA}$	6
1.6	Encaix del connector en la càpsida	7
1.7	El connector amb anticossos	8
1.8	DNA superenrotllat al connector	9
1.9	Connectors visualitzats amb AFM	9
1.10	Model d'AFM del cristall 2D	10
1.11	Acoblament del fag	10
1.12	Relació entre l'energia d'interacció i el nombre de subunitats .	14
1.13	Simetria del DNA	14
3.1	Simetries dels cristalls	22
3.2	El codi genètic	23
3.3	Obtenció de la proteïna	24
3.4	Efecte dels raigs X sobre els cristalls	32
3.5	Wilson Plot	35
3.6	Fluorescència TaBr	44
3.7	Factors de difusió atòmics	45
3.8	Extensió de fases I	52
3.9	Extensió de fases II	53
3.10	Molècula del criotampó	55
3.11	Angles peptídics	57
3.12	Hèlix α i fulla β	58
3.13	Ramachandran del connector	59
3.14	Difracció amb microfocus	62
3.15	Difracció d'una macla	63
3.16	Distribució acumulada	64
3.17	Mapa de Patterson	65
3.18	Eixos de la macla	67

3.19	Macla reconstruïda	68
3.20	Seccions M.E.	70
3.21	Reconstrucció de la M.E.	70
3.22	Ajust de la microscòpia i del model afinat	71
5.1	Monòmer	108
5.2	Secció lateral	109
5.3	Un model per a l'empaquetament	111
5.4	El nostre model per a l'empaquetament	112

Índex de taules

1.1	Bacteriòfags	4
3.1	Aminoàcids i Bases	23
3.2	Llista dels cristalls analitzats	26
3.3	Línies de difracció	28
3.4	Capes de reflexions	34
3.5	Recollida i processat dels cristalls de I422	36
3.6	Recollida i processat dels cristalls de I422Ag	37
3.7	Recollida i processat dels cristalls de I422Au	38
3.8	Recollida i processat dels cristalls de I422Pt	39
3.9	Recollida i processat dels cristalls de I422TaBr	40
3.10	Reemplaçament Molecular	48

Part I

Introducció

Capítol 1

El connector del fag $\Phi 29$

1.1 El fag $\Phi 29$

Bacteriòfag i fag són els noms que es donen als virus que ataquen els bacteris. Van ser descoberts a principis del segle XX quasi simultàniament per Twort (1915) i per d'Herelle (1917) [7]. La simplicitat del sistema i la seva manipulació fàcil va fer dels fags un dels primers objectius a estudiar als inicis de la Biologia Molecular, als anys 40 per Max Delbrück i Salvador Luria. Se sospitava que els fags eren una mena de *gens despallats*. Així, la millor manera de conèixer com era un gen i com es duplicava seria l'estudi de les propietats d'aquests virus [57]. Simultàniament van començar els esforços per a visualitzar la seva estructura. La primera imatge de microscòpia electrònica, obtinguda per Ernst i Helmut Ruska, va néixer amb els primers microscopis electrònics comercials el 1940 (fig. 1.1) [61].

Figura 1.1: Primera micrografia de fags. El 1940, H. Ruska va publicar la primera micrografia d'un bacteri infectat per bacteriòfags. Aquesta va ser presa a una magnificació de $15000\times$ amb el *Siemens-Halske Übermikroskop*, construït per E. Ruska i col·laboradors (magnificació màxima de $30000\times$ i 13 nm de resolució) instal·lat en el laboratori de la fàbrica a Berlín. L'autor menciona que les partícules esfèriques observades al voltant del bacteri es destrueixen després d'una exposició allargada al feix d'electrons [61].



Com que els bacteris no tenen una membrana citoesquelètica tan sofisticada com la dels eucariotes, els seus virus no poden entrar per endocitosi.

Necessiten un sistema més complex per introduir-hi el DNA [38]. A grans trets, un fag està format de dues grans parts: una càpsida que conté els seus gens i un gran apèndix de forma més o menys tubular que s’encarrega de conduir el DNA dins la cèl·lula en la infecció (fig. 1.2).

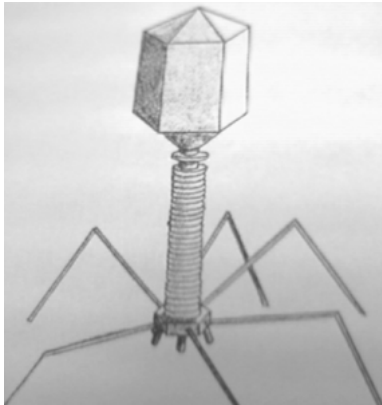


Figura 1.2: Bacteriòfag T4. Esquema del bacteriòfag T4, semblant al Φ 29. Es poden veure les parts principals: la càpsida, la cua, la base i les fibres de la base

El fag Φ 29 és un virus de DNA de doble cadena que infecta *Bacillus subtilis*. Conté uns 20 gens en una càpsida de forma icosaèdrica allargada (*prolate*) al voltant d’un eix 5 [61]. Aquesta càpsida té uns 540Å de llargada i uns 420Å d’amplada. En un dels extrems d’aquest eix es troba el connector (o portal), d’uns 80Å de llargada, a continuació la cua, d’uns 500Å, i la resta del mecanisme d’infecció. Tot i ser un virus relativament petit, té la mateixa estructura que altres de més grans, com el λ i el T4. Les diferències estan principalment en el nombre de proteïnes que formen la càpsida i la cua, però la forma global es conserva. Aquestes proteïnes s’ordenen idènticament, simplement formant cossos de mida diferent [38], per repetició. El Φ 29 és, per tant, un bon model per conèixer l’estructura i mecanisme d’una família de virus similars molt extensa (taula 1.1).

Nom	bacteri	Bases (Kpb)
T2, T4, T6	<i>Escherichia coli</i>	170
T7	<i>Escherichia coli</i>	40
λ	<i>Escherichia coli</i>	48.5
Φ 29	<i>Bacillus subtilis</i>	19
P22	<i>Salmonella typhimurium</i>	43.5
T3	<i>Escherichia coli</i>	40
SPP1	<i>Bacillus subtilis</i>	46
μ	<i>Escherichia coli</i>	39

Taula 1.1: Bacteriòfags. Alguns dels bacteriòfags similars al Φ 29 [37, 38, 61, 55, 17].

1.2 El connector i la proteïna p10

El bacteriòfag $\Phi 29$ està compost de només 6 proteïnes estructurals. Dues d'aquestes proteïnes formen el coll, la p10 i la p11 [8]. La proteïna p12 forma uns apèndixs al coll, i la p9 la cua [30].

El connector del fag $\Phi 29$ (*portal protein*, *head-tail connector*, *upper collar*) està format per 12 còpies de la proteïna p10 de 36 kDa cadascuna [25, 3]. Està situat en un dels dos vèrtexs d'ordre 5 que hi ha als extrems allargats de la càpsida. Forma part d'un motor rotatiu que empaqueta el DNA genòmic, de doble cadena.

Aquest motor està format pel connector, un RNA de 174 bases i una altra proteïna (p11), aquests dos últims amb simetria 6 segons les reconstruccions de criomicroscòpia [47].

Les 12 proteïnes es disposen en forma troncocònica amb un canal d'un diàmetre suficient per tal que passi DNA de doble cadena, que el travessa al llarg del seu eix.

Tots els bacteriòfags disposen de connector, amb simetries no totalment determinades, però sempre 12 o 13 [17, 10]. Pel que se sap fins ara, usant criomicroscòpia, tots tenen unes dimensions globals similars, fet consistent amb que tots tenen la mateixa funció de conduir el DNA.

1.2.1 Estructura del connector

Els estudis de l'estructura tridimensional del connector es van començar amb difracció d'electrons de cristalls bidimensionals [11]. En aquests estudis del coll sencer (proteïnes p10 i p11) s'observava ja la seva forma de tronc de con amb un canal central. La part més ampla estava composta de 12 lòbuls. A partir d'aquests lòbuls l'estructura de cada subunitat s'estretava, com un con, aparellant-se cadascuna amb la veïna, alhora que es recargolava cap al cim de la següent subunitat. A la part estreta, doncs, s'observaven només 6 subunitats, probablement en la zona corresponent a la proteïna p11 (fig. 1.3) [9].

Els millors estudis de l'estructura del connector s'han fet a partir de cristalls bidimensionals [54]. Les tècniques usades eren la criomicroscòpia [54, 53] o bé la microscòpia de força atòmica [39].

La resolució útil en criomicroscòpia era d'uns 9 Å. Els cristalls bidimensionals tenien una cel·la de 165 Å × 165 Å en el grup espacial $P4_21_2$ (fig. 1.4), on els connectors es disposen amb l'eix 12 al llarg del quaternari, i alternats, un cap amunt, un altre cap envall, segons obliga l'eix helicoidal. Es continua veient la vorticitat de la seva estructura, però la gran diferència és que les 12 subunitats estan separades perfectament i ja no hi ha una transició de

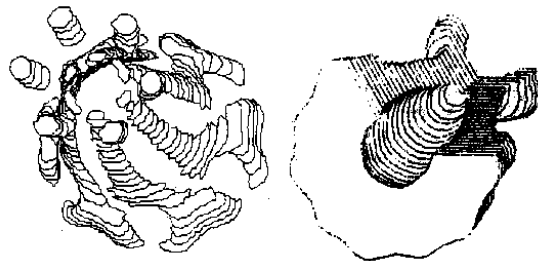


Figura 1.3: Perspectives del coll del fag $\Phi 29$. A la dreta, vista d'un tall de l'estructura des de la part més ampla, la corresponent a la proteïna p10. A l'esquerra, reconstrucció a partir dels valors més alts de la densitat, i en direcció contrària. La forta vorticitat de l'estructura és apreciable, així com el canvi de simetria 12 en la part ampla, a 6 en la més estreta. [9].

simetria 12 a 6. Aquests estudis estan fets només amb el connector, sense la proteïna p11, per la qual cosa és molt possible que allò observat amb simetria 6 representés aquesta part. (Comparar fig. 1.3 i fig. 1.5)

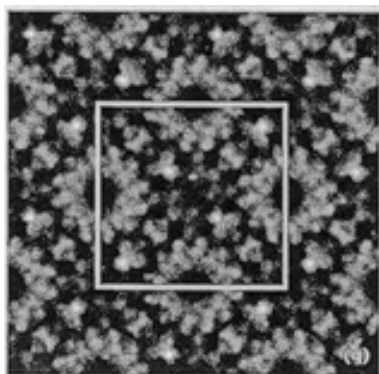


Figura 1.4: Cristall bidimensional. Promitjat de 5 imatges, amb la simetria $P42_12$ imposada. La cel·la de $165\text{\AA} \times 165\text{\AA}$ està indicada en blanc. [53].

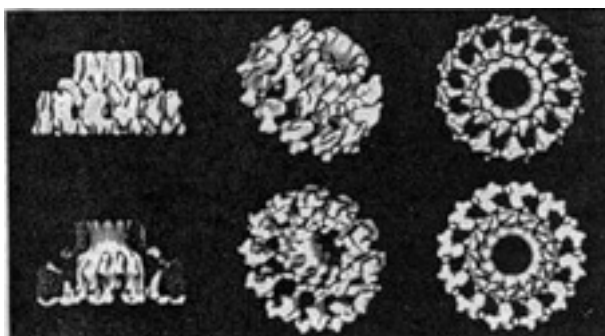


Figura 1.5: Representació tridimensional del connector a $9\text{\AA}$. Representació tridimensional del connector a $9\text{\AA}$, en vàries vistes.

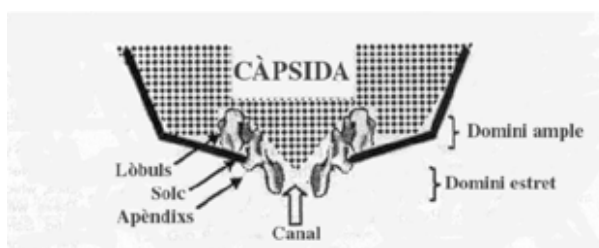
Tot i que la resolució en el pla perpendicular a l'eix 12 és prou alta, no és així en profunditat, ja que en inclinar les mostres per obtenir dades en

aquesta direcció es perd resolució. Les resolucions finals es redueixen a uns 10Å en el pla horitzontal i a uns 17Å en el vertical.

El connector té una alçada de 75Å i conté dos dominis: un d'ample (135Å d'amplada i 40 d'alçada) que s'inserta a dins de la procàpsida, i un de d'estret (62Å d'amplada per 24 d'alçada) que interacciona amb les altres proteïnes que formen el coll i que connecta amb la cua. El domini ample té forma d'anell de 80Å de diàmetre i està envoltat de 12 lòbuls de 27Å cadascun. A l'interior també hi ha 12 petits lòbuls de 15Å que connecten amb els anteriors. El domini estret conté, per la part de fora i a mitja alçada, 12 petits apèndixs. Se suposa que la vall que es forma entre aquests apèndixs i els lòbuls formen un encaix on s'hi posen les proteïnes que formen un dels vèrtexs de simetria 5 de la càpsida, impedit d'aquesta manera moviments longitudinals del connector, però no de giratoris. Ambdues parts envolten un canal que comença amb 58Å de diàmetre en el domini ample i acaba amb 36Å en el domini estret (fig. 1.6) [53].

Figura 1.6: Encaix del connector en la càpsida.

Situació hipotètica del connector dins del vèrtex de la càpsida. Aquesta s'encaixa en el solc entre els lòbuls i els apèndixs, de manera que podria rotar, però ni entrar en la càpsida, ni sortir-ne. [53].



Connectors complexats amb anticossos específics a diferents zones de la seva seqüència d'aminoàcids van ser estudiats amb microscòpia electrònica (*immunoelctrònica*) i promitjat d'imatge [52] (fig. 1.7). Aquests anticossos, quan es lligaven als connectors, mostraven les parts de la seqüència proteïca exposades a l'exterior. Segons els autors del treball, la seqüència del connector comença en els apèndixs de la part central, per dirigir-se després a l'extrem del domini estret. D'alguna manera no especificada, a causa de que no es van poder addicionar anticossos, la seqüència continua per dins del canal fins als lòbuls del domini ample, per acabar un altre cop a prop dels apèndixs de l'inici. Aquesta disposició és coherent amb altres dades conegudes, com que la part inicial de la seqüència és un domini amb afinitat pels àcids nucleics [16, 15, 51]. En determinar l'estructura per difracció de raigs X vàrem veure que aquesta interpretació no és la correcta (fig. 5.1, plana 108). Només els anticossos relacionats amb la zona d'unió amb el pRNA i l'extrem N-terminal van determinar dominis correctes (fig. 1.7, **d** i **e**).

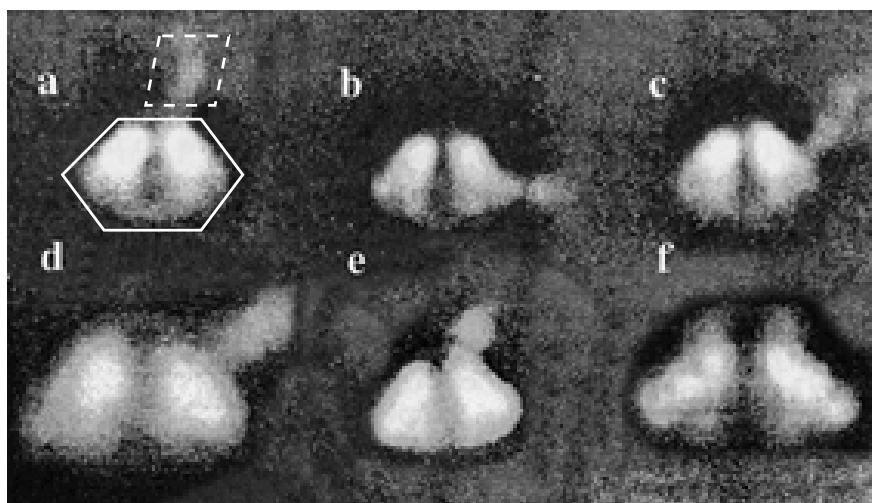
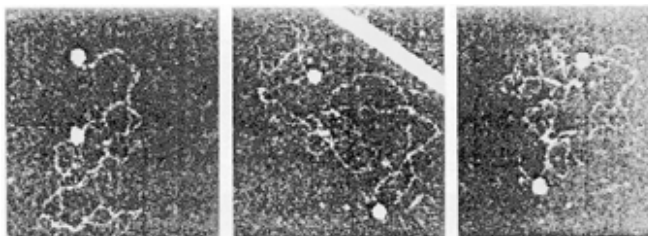


Figura 1.7: El connector amb anticossos. Microscòpia electrònica del connector complexat amb anticossos. Vistes laterals promitjades del connector amb alguns anticossos [52]. A la imatge **a** la línia contínua delimita la projecció lateral promitjada del connector, i la discontinua, la d'un anticòs. L'anticòs de la imatge **a** s'unia a la seqüència d'aminoàcids 78-92. El de la **b** a 167-190. El de la **c** a 275-292. El de la **d** a 1-14. El de l'**e** a la zona d'unió amb el pRNA. La imatge **f** és la de control. Veure el text per una discussió sobre aquests resultats.

L'afinitat pel DNA de la part externa del connector s'ha demostrat mitjançant microscòpia electrònica i electroforesi [51]. DNA de longitud coneguda es posava en presència de connectors aïllats. En observar amb microscòpia electrònica la longitud del DNA (fig. 1.8), es podia veure que aquest era més curt, però a més a més es veien petites zones amb superenrotllament. Si es mesurava la massa d'aquest DNA per electroforesi, resultava ser la del DNA més la de tants connectors com nusos o zones superenrotllades es veien en les imatges. La longitud resultant del DNA implicava que la quantitat de DNA superenrotllat era massa gran com per cabre dins del canal del connector, de manera que l'única explicació és que el DNA estigués embolicant el connector, mostrant així l'elevada afinitat que aquest té pel DNA en la seva zona externa.

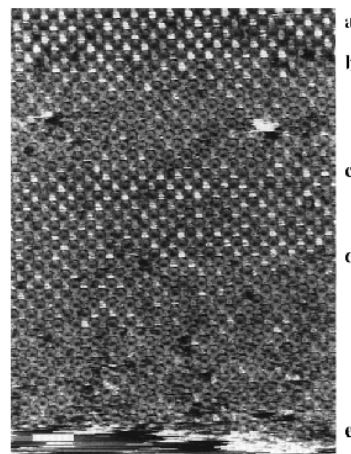
La microscòpia de força atòmica (*AFM*) dels mateixos cristalls bidimensionals havia mostrat altres característiques del connector, com la seva sensibilitat a la força aplicada (fig. 1.9). Un resultat molt espectacular d'aquest estudi és que augmentant i decreixent la força, dins d'uns certs límits, el

Figura 1.8: DNA superenrotllat al connector. Complexos de connector-DNA a una magnificació de $\times 160000$. Les boles blanques són connectors amb el DNA superenrotllat al voltant seu. [51].



connector recuperava la seva forma [39]. Tot i que l'AFM pot donar lloc a artefactes a causa d'aquesta força, també és possible que el connector sigui elàstic per ell mateix, un tema que encara està per determinar.

Figura 1.9: Connectors visualitzats amb AFM. Topografia dependent de la força dels connectors del $\Phi 29$ adquirida amb AFM. Entre **a** i **b** la força aplicada era entre 50 i 100 pN. A **b** es va incrementar a uns 150 pN. La part que estava estesa, corresponent a l'extrem estret del connector quedava enfonsada a causa de la força aplicada. Aquest procés, reversible, es repeteix en la mateixa imatge: entre **c** i **d** la força era de 50-100 pN i 150 pN entre **d** i **e**. A **e** la força es va incrementar a 300 pN i l'ordre cristal·lí es va trencar [39].



Recentment s'ha publicat un model a partir de difracció de raigs X, sense afinar les coordenades [48], i afinades [47]. En ell ja s'hi podent observar algunes de les característiques del connector a nivell atòmic. Aquests estudis han estat fets en paral·lel als nostres i han donat resultats molt similars, tot i que a una resolució menor i amb algunes diferències estructurals causades probablement per aquesta resolució menor. En la discussió es farà una comparació amb el nostre model (pàg. 107).

1.2.2 El connector en la formació del fag

Les parts que formen un fag es construeixen independentment, formant les peces principals per separat [60, 7], que després s'acoblen. A la figura 1.11 es mostra el camí típic per molts fags d'aquest acoblament.

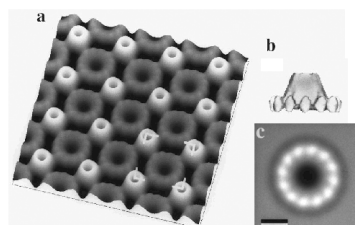


Figura 1.10: Model d'AFM del cristall 2D. **a** Perspectiva del model d'AFM promitjat per correlació i amb simetria 4 aplicada dels connectors de la figura 1.9. Les marques blanques representen la cel·la unitat. **b** Vista lateral del connector combinant dades prèvies amb les d'aquesta reconstrucció. **c** Promitjat rotacional amb simetria 12. La barra representa $50\text{\AA}$, i els grisos representen una escala de $30\text{\AA}$. Les mides del connector són $76 \pm 0.5\text{\AA}$ d'alçada, $64 \pm 4\text{\AA}$ de diàmetre en la part estreta i $133 \pm 3\text{\AA}$ en l'ampla. El canal té un diàmetre de $12 \pm 0.3\text{\AA}$ a $37 \pm 4\text{\AA}$ en les parts estreta i ampla, respectivament [39].

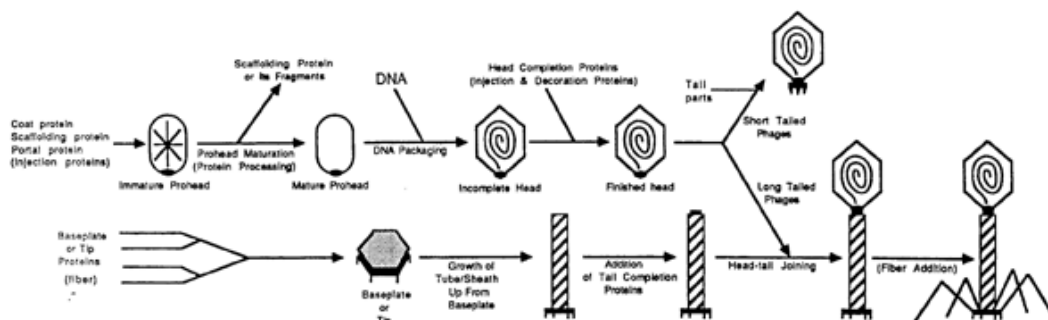


Figura 1.11: Acoblament del fag. Etapes en l'acoblament dels fags de doble cadena de DNA. El connector està representat per un cercle petit negre en la base de la càpsida. Es creu que aquesta creix a partir del connector i que el creixement s'acaba després de que s'hagi introduït el DNA. A continuació es junta amb la part inferior, que s'ha ensamblat apart. [7].

El connector té un paper central en la formació de la càpsida. La complicada geometria de la càpsida requereix d'ajuda externa per formar-se, ja que les proteïnes s'han de disposar en una simetria icosaèdrica exacte, i un petit error en la curvatura pot donar lloc a un objecte de forma diferent, que pot ser no es tancaria mai, i que no podria contenir el DNA. És molt comú obtenir ordenaments tubulars amb les proteïnes de la càpsida quan se les intenta unir sense presència del connector [38].

En el cas de les càpsides allargades (*prolate*), com la del $\Phi 29$, la forma

icosaèdrica només està present en els extrems, en les tapes, essent la part central un prisma de llargària diferent segons de quin fag es tracti. Es coneix que el virus pot suportar petits errors en l'estructura d'aquesta part central, un possible origen de la diversitat d'aquests virus, però no en les parts icosaèdriques, ja que han de contenir el mecanisme d'injecció [38]. Per això, també, el creixement de la càpsida ha de començar en el vèrtex on se situa el connector.

Es creu que la terminasa, que es troba l'inici del DNA que s'ha d'empaquetar, s'uneix al connector. La terminasa és una ATPasa i per tant, segurament la iniciadora de tot el procés energètic en el transport del DNA [27].

L'afinitat del DNA per la part exterior del connector i la seva facilitat per embolicar-se al seu voltant (plana 9 i fig. 1.8) va portar a un model [51] en que el DNA entraria a dins de la càpsida embolicant-se al voltant del connector. Aquest mecanisme s'ha deixat de suposar, ja que totes les altres evidències porten cap a un DNA passant a través del canal. El fet que el connector no estigués junt amb la càpsida segurament va ser el que va provocar aquest efecte.

El DNA entra en el fag després de la formació de la càpsida, i abans de la unió de la cua i de la base. Els models inicials apostaven per un motor unidireccional *brownià*: El connector podria girar en una sola direcció, per motius tèrmics, i quedava travat en cas d'intentar moure's en la direcció contrària. En cada moviment favorable faria avançar el DNA en el seu interior linealment cap a l'interior de la càpsida. L'entrada del DNA no costaria energia, però, en canvi, el DNA adquiriria energia en comprimir-se dins de la càpsida. Aquest motor tindria la propietat de crear energia del no res, contradient la segona llei de la termodinàmica [38].

Els estudis d'empaquetament *in vitro* han mostrat que calen entre una i dues molècules d'ATP per cada 2 parells de bases empaquetats [10]. Aquest és un consum similar a altres sistemes de *translocació* (transport). Tot i que aquests altres sistemes necessiten consumir energia, per exemple, per trencar ponts d'hidrogen, el consum es pot considerar baix, si tenim en compte la gran pressió dins la càpsida del DNA que va entrant i que empeny per sortir.

El DNA s'ha de traslladar per l'interior del connector, cap a dins de la càpsida. Moltes molècules processives se suposa que actuen avançant a través de la hèlix del DNA. El resultat és que el van voltant. Un mecanisme equivalent implicaria un connector, en relació, quiet i un DNA que aniria girant al voltant del seu propi eix. Un mecanisme així faria entrar el DNA girant dins de la càpsida. Allà dins, s'ha de plegar i embolicar, però és força difícil, a causa del poc espai que hi ha pel DNA dins de la càpsida, i a la torsió extra que es generaria, que s'hauria de compensar amb un consum molt

més elevat d'energia. Contràriament, un connector giratori permetria que el DNA avancés sense girar [28]. Un connector d'aquestes característiques, lliure, podria impedir la formació de la càpsida, però s'ha postulat que en els primers moments de la maduració de la càpsida, el connector podria estar-hi travat fins arribar a la maduració de la càpsida. En aquest moment s'alliberaria el connector i entraria en marxa el mecanisme per fer entrar el DNA, alhora que la càpsida s'aniria expandint per la pressió d'aquest a l'entrar (plana 12).

Aquesta seqüència d'acoblament ha estat demostrada, per exemple pel fag T4 [31, 32]. Una càpsida totalment madura també és capaç d'empaquetar DNA [32].

1.2.3 La infecció

Un cop formats connector i càpsida, la cua i la base s'uneixen per formar el fag complet. Les cues tenen longituds molt diverses. La del $\Phi 29$ és de les més curtes. Generalment es creu que el connector o alguna altra proteïna del coll tanca el canal, i pot ser una segona en la base també, si la cua és de les llargues [38].

En el moment de la infecció s'ha de transmetre un senyal per tal que el bloqueig desaparegui. En cues curtes, una modificació en la proteïna que bloqueja (o en el connector) pot ser possible a causa de la proximitat entre aquesta part del fag i la membrana cel·lular, però no és possible en cues llargues, ja que la distància és molt gran. Les cues poden tenir longituds més grans que la pròpia càpsida, i en aquests casos, són flexibles.

En aquest segon cas, en unir-se el connector amb la cua, se suposa que el bloqueig a l'alçada del connector s'allibera, la cua queda plena de DNA i és la base qui l'atura fins que algun canvi en el moment de penetrar la cèl·lula desbloqueja el pas.

Experimentalment s'ha vist que les càpsides dels fags λ es poden unir a cues que ja estan unides a la cèl·lula [14]. En aquest cas el DNA hauria d'estar travat per alguna proteïna del coll, fins que s'unís la cua. Aquest alliberaria el DNA, que penetraria a la cèl·lula automàticament, ja que el bloqueig de la base ja hauria estat alliberat prèviament.

1.3 Les simetries: cinc, sis, deu i dotze (o tretze)

Com ja s'ha vist, la càpsida d'un fag té forma d'icosàedre allargat. Per tant té simetria 5 en els seus vèrtexs. Tots els connectors estudiats, ja sigui per

microscòpia o bé per raigs X tenen simetria 12 o 13. Per exemple, el del $\Phi 29$ té simetria 12 [8, 25, 3], així com el del T3 [55].

L'únic que per ara s'ha demostrat que té simetria 13 és el de l'SPP1 [17, 33]. Aquest resultat sempre ha estat una mica controvertit. Hi ha indicis que la sobreexpressió dels connectors en sistemes heteròlegs podria donar lloc a ordenacions diferents. Per exemple en el fag T7 s'han observat poblacions barrejades de connectors amb simetria 12 i 13. En connectors de T3 i $\Phi 29$ extrets *in vivo* de les seves càpsides, mai no s'ha observat cap simetria diferent de la 12. No es coneix cap estudi d'aquestes característiques dels connectors de l'SPP1 [10].

De totes maneres, si l'SPP1 és una excepció en els fags, però en canvi, l'estructura del connector és idèntica a la dels altres fags, exceptuant-ne la seva simetria, voldrà dir que el mecanisme dels connectors no pot estar basat en cap lligam estructural entre ell i el DNA.

Un estudi a resolució atòmica de mostres que haguessin estat confirmades com a funcionals (no artefactes de la sobreexpressió) es feia necessari, i aquest va ser el primer pas un cop obtingudes les primeres dades de difracció dels cristalls (plana 83 i [25]).

La relació de simetries entre el connector i la càpsida és important per entendre el mecanisme de bombeig del DNA en ambdues direccions. Si la relació és un número enter, (p.e. 10:5, 15:5), podria implicar que proteïnes veïnes trobarien facilitat en lligar-se o interaccionar entre elles [28]. El resultat seria una estructura probablement massa rígida com per permetre una rotació ràpida del connector (fig. 1.12). Per tant s'hauria de suposar un mecanisme de bombeig del DNA a partir d'algun altre element que es trobés en aquella zona. Hi ha estudis que mostren la necessitat de RNA en l'acoblament del DNA dins de la càpsida, una estructura rígida seria possible en aquest cas.

Si la relació no és entera (p.e. 11:5, 12:5, 13:5), no es pot trobar cap posició relativa privilegiada entre el connector i la càpsida. Una orientació que encari un parell d'interfícies entre el connector i la càpsida, allunyarà les d'un sector llunyà. D'aquesta manera, o bé es deforma considerablement l'estructura o bé simplement queda centrada al voltant de l'eix 5 de la càpsida i el connector quedarà lliure per rotar en qualsevol direcció.

Per microscòpia electrònica s'ha observat que el canal interior del connector, per on passa el DNA, té un diàmetre adequat per tal que passi una cadena doble de DNA estirada o molt poc deformada. Una doble hèlix de DNA en la conformació típica té una simetria 10_1 que en projecció axial és de 10 (fig. 1.13). Un altre cop es pot tornar a considerar la mateixa hipòtesi: la relació entre simetries del connector i del DNA no permet una orientació estable relativa entre ells. En aquest cas també es podria considerar la idea

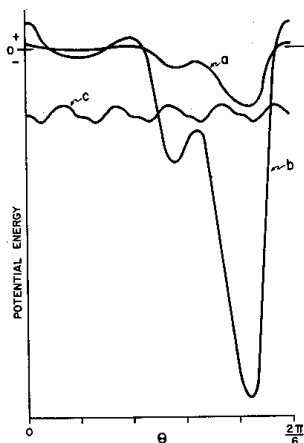


Figura 1.12: Relació entre l'energia d'interacció i el nombre de subunitats. L'energia potencial positiva significa repulsió i la negativa atracció. Situació hipotètica entre un connector situat concèntricament dins del vèrtex d'una càpsida. **a** Interacció entre un dels lòbuls i una de les proteïnes de la càpsida. **b** Interacció entre tots els lòbuls i la càpsida en un cas de simetria entera. En aquest cas, la relació de simetries és 6:6. Hi ha un mínim que podria aturar la rotació. **c** Quan la relació és 6:5, la funció és periòdica ($2\pi/30$), i de molt poca amplitud. La interacció és molt més fluïda, de manera que no hi ha barreres prou fortes com per aturar el gir. El connector pot rotar amb poca energia. [28].

que el connector no rota i és el DNA el que ho fa, però això provocaria un superenrotllament impossible a l'interior de la càpsida, ja que en anar girant, intentaria fer girar alhora tota la part ja encapsulada. De manera que la hipòtesi més simple torna a ser la d'un connector giratori i amb la nova peça d'un DNA que va avançant linealment a través d'ell.

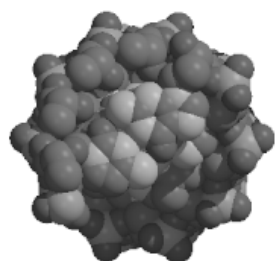


Figura 1.13: Simetria del DNA. Projecció vertical de DNA per mostrar que, en aquesta direcció, té simetria 10.

Altres parts importants en el mecanisme són el pRNA i la proteïna p16. Aquest parell es creu que formen part del sistema que fa entrar el DNA a la càpsida, però que un cop entrat se separa del virus.

El pRNA (*packaging RNA*) té 174 bases repartides en una estructura anular amb uns apèndixs interiors i tot ell amb simetria 6. Està col·locat probablement al voltant de la part més estreta del connector [12, 26]. La proteïna p16 és l'ATPasa que proveeix d'energia tot el sistema [23]. Es creu que l'ATPasa provoca canvis de forma als apèndixs del pRNA que actuen de *rems* fent girar el connector. El pRNA a més reconeix l'extrem del DNA víric que s'ha d'empaquetar i el condueix a l'entrada del connector. La relació de

simetries entre connector i el pRNA és de 12:6, una relació entera. Si l'impuls que fa girar el connector prové del apèndix del pRNA, és important que les simetries casin, ja que d'aquesta manera la força impulsora dels 6 braços se sumará. L'efecte seria similar al cas **b** de la figura 1.12.

El resultat de totes aquestes peces és, doncs, un motor on p16 proveeix d'energia al pRNA i que aquest la fa servir per fer girar el connector gràcies a un *encaix* de simetries com si es tractés d'una clau que fa girar un cargol. Per l'altre extrem, la càpsida i el connector no queden fixats gràcies al *desencaix* de simetries i es permet una rotació lliure com un coixinet. El pRNA llavors reconeix la proteïna terminasa del DNA víric i l'acosta al connector, que el conduirà cap a dins de la càpsida, ajudat per una altra asimetria entre DNA i connector que a més obligaria al DNA a avançar només en una direcció i sense recargar-se.

Un cop empaquetat tot el DNA, el pRNA i la p16 en deixar de ser útils desapareixen, i a la part estreta s'uneixen la p11 i tota la resta de la cua i la base. La unió és estable, ja que p11 té simetria 6 i pot encaixar bé amb la part estreta del connector i formar el coll del fag tal com s'ha vist en els estudis de microscòpia electrònica (fig. 1.3, plana 6).

L'estructura externa del connector és molt important per conèixer com es produeix aquest efecte de *rem* entre el pRNA i el connector, però la interna, la més desconeguda a la microscòpia electrònica, és imprescindible per entendre com el DNA pot lliscar unidireccionalment al llarg del connector cap a dins de la càpsida.