

**“Caracterización de la terminasa mayor del
bacteriófago T7”**

**Tesis Doctoral de:
María Ibarra Daudén**

Dirigida por:
José L. Carrascosa
Jaime Martín-Benito

Madrid, noviembre 2012
Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular

Abstract

DNA packaging inside preformed proheads takes place in a similar way in tailed bacteriophages as well as in some animal viruses (such as Herpesvirus and Adenovirus). The structural and functional complexity of phages accomplished by its genetic simplicity makes them a good model system to study viral packaging. The morphogenetic pathway in double stranded DNA (dsDNA) phages, except for some individual features, is highly conserved owing to their common evolutionary origin. The assembly begins with the formation of empty proheads composed of the capsid proteins, the scaffolding proteins and the connector (that links the viral head and the tail). DNA is translocated into the preformed prohead by the portal complex, located at a special prohead vertex. The portal is made up two components, the terminase and the connector. The terminase is a powerful motor that converts ATP hydrolysis into mechanical movement of the DNA. Due to its dual activity, ATPase and nuclease, and transiently interacts with the connector, the terminase is a very unstable protein. Once the DNA is packaged inside the mature head, the terminase dissociates and the tail proteins are incorporated to build the fully infective virion.

Here, we have determined the structure of the large terminase (gp19) of phage T7 by electron microscopy and image processing techniques. The pentameric terminase presents a channel wide enough to accommodate dsDNA. The three-dimensional volume of the complete portal complex is also reported, revealing the coupling between the terminase and the connector through a continuous channel. The structure of the terminase assembled into the portal complex showed a different conformation when compared with the isolated terminase pentamer. To understand at molecular level the terminase morphological change and to infer the location of its catalytic motifs, we generated the terminase atomic model based on the crystallographic structure of its phage T4 counterpart. The docking of the threaded model in both terminase conformations showed that the transition between the two states can be achieved without any intra-domain bending. The two terminase conformations may be involved in the sequential DNA translocation, showing eventually two steps of the packaging mechanism.

We also used a surface stress nanomechanical sensor to study ATP-induced conformational changes in the T7 terminase. The recording of the cantilever bending during the terminase immobilization upon its surface shows the existence of a gp19 monolayer arrangement confirmed by atomic force microscopy. This two-dimensional arrangement is characteristic of low terminase concentrations (below 40 ng/ml). The ATP hydrolysis of the terminase generates a stepped motion of the cantilever and points to a mechanical cooperative effect among gp19 oligomers. Furthermore, the effect of ATP can be counteracted by non-hydrolyzable nucleotide analogs.

Finally, the inherent aggregation tendency of the terminase was examined by raising the concentration assayed. We generate a gp19 multilayer arrangement over the cantilever surface, by immobilizing terminase concentrations up to 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The response of the 3D matrix to the binding of ATP is completely distinct compared with the monolayer of proteins. ATP interaction modifies the conformation of the proteins that build the clusters thus affecting the cohesion of the aggregates. As the gp19 clusters can bind ATP and AMP-PNP (a non hydrolyzable analog) producing a genuine deflection of the microcantilever, the competitive binding between them can be also detected in real time.

Índice

INTRODUCCIÓN

I1. Introducción a los virus	1
I2. Empaquetamiento del genoma viral	3
I3. Componentes del complejo portal	7
I3.1. El conector	8
I3.2. El complejo terminasa.....	10
I3.2.1. La terminasa mayor.....	11
I3.2.2. La terminasa menor.....	14
I4. Modelos de empaquetamiento	16
I5. Otras aproximaciones al estudio del motor empaquetador	19
I5.1. Las pinzas ópticas	19
I5.2. Micropalancas	20

OBJETIVOS	23
------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

M1. Materiales biológicos	25
M1.1. Cepas bacterianas.....	25
M1.2. Virus	25
M1.3. Plásmidos	25
M2. Métodos	26
M2.1. Amplificación y titulación del bacteriófago T7	26
M2.2. Amplificación y clonaje del gen 19	26
M2.3. Producción de la gp19	26
M2.4. Purificación de la gp19	27
M2.5. Producción y purificación de la gp8	28
M2.6. Formación y purificación del complejo gp19/gp8	28
M2.7. Detección de la actividad ATPasa de la gp19	29

M2.8. Preparación de muestras para tinción negativa	29
M2.9. Microscopía electrónica	30
M2.10. Procesamiento de imágenes	30
M2.11. Reconstrucción tridimensional	30
M2.12. Segmentación, modelado y ajuste de estructuras	32
M2.13. Producción de la gp19 para los ensayos de micropalancas	33
M2.14. Preparación de las micropalancas	33
M2.15. Medida de la deflexión de las micropalancas	33
M2.16. Procedimiento experimental	34
M2.17. Microscopio de fuerzas atómicas	34

RESULTADOS

R1. Producción de la terminasa mayor del fago T7	35
R1.1. Diseño del clonaje del gen 19	35
R1.2. Amplificación y clonaje del gen 19 a partir del genoma del fago T7 ..	36
R1.3. Producción y purificación de la terminasa con histidinas	37
R1.3.1. Sobreexpresión de la terminasa en <i>E.Coli</i>	37
R1.3.2. Purificación de la terminasa	39
R2. Detección de la actividad ATPasa de la terminasa oligomérica	42
R3. Caracterización estructural de la terminasa oligomérica	43
R3.1. Análisis bidimensional de las imágenes medias: determinación del estado pentamérico de la gp19	43
R3.2. Reconstrucción tridimensional de la terminasa pentamérica	45
R3.3. Modelado de la estructura atómica del monómero y el pentámero de gp19: localización de los dominios funcionales	47
R4. Caracterización estructural del complejo portal: terminasa/conector	51
R4.1. Purificación del complejo portal	52
R4.2. Obtención del modelo tridimensional del complejo portal	53
R4.3. Topología del complejo portal y encaje del modelo atómico de la terminasa pentamérica en el complejo	55

R4.4. Cambios en la topología de oligomerización de la terminasa por interacción con el conector	57
R5. Detección del cambio conformacional de la terminasa mediante micropalancas	59
R5.1. Sistema experimental	60
R5.2. Funcionalización de las micropalancas	61
R5.3. Inmovilización de las terminasas	62
R5.4. Interacción con nucleótidos en el régimen agregado	64
R5.4.1. Análisis de la interacción con ATP en régimen agregado	66
R5.5. Interacción con nucleótidos en el régimen de monocapa	68
R5.5.1. Análisis de la interacción con ATP en régimen monocapa ...	69

DISCUSIÓN

D1. Estructuras cuaternarias de la terminasa y el complejo portal: implicaciones funcionales	73
D1.1. Reconstrucción tridimensional de la terminasa mayor y aportaciones del modelo atómico	73
D1.2. Reconstrucción tridimensional del complejo portal y segmentación de la terminasa	76
D2. Cambio conformacional de la terminasa	79
D3. Mecanismo de traslocación del ADN	81

CONCLUSIONES	85
---------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	87
---------------------------	----

ABREVIATURAS	103
---------------------------	-----

ARTÍCULOS	105
------------------------	-----

Introducción

11. INTRODUCCIÓN A LOS VIRUS

Los bacteriófagos, o virus que infectan bacterias, son probablemente los organismos más abundantes de la tierra. Sólo el grupo de fagos con cola (Caudovirales) tiene una población estimada superior a 10^{30} (Hendrix, 2002). En biología molecular los bacteriófagos han sido ampliamente utilizados como sistemas modelo, ya que pese a su simplicidad genética poseen una complejidad estructural y funcional considerable. En la figura I1A se muestra la ubicuidad de los fagos y de los virus en general, que abarcan nichos ecológicos muy diferentes. Recientemente, el interés por los fagos se ha centrado en su aplicación para mostrar librerías de péptidos y como potenciales agentes terapéuticos contra bacterias patógenas (Cuervo y Carrascosa, 2012a).

La determinación de relaciones evolutivas entre fagos se basó inicialmente en la comparación de sus secuencias, pero dada la enorme divergencia de los genomas virales sólo permitió clasificar virus cercanos. Sin embargo, la comparación sistemática de estructuras tridimensionales fundamentales, como la proteína de la cápsida, ha revelado vínculos filogenéticos entre virus distantes. Esto sugiere que la existencia de un contenedor proteico para proteger el genoma, se ha mantenido en todos los fagos desde estadios tempranos de su historia (Baker et al., 2005).

La evolución, reflejada en la conservación de estructuras de plegamiento, sugiere que no sólo el universo de posibles plegamientos de proteínas es limitado, sino que además sólo una pequeña parte de éstos son utilizados por los virus (Bamford et al., 2005). Un ejemplo paradigmático lo encontramos en la proteína de la cápsida viral cuyo plegamiento fue descrito por primera vez en el fago HK97 (Wikoff et al., 1998) y encontrado más tarde en virus tan diferentes como T4, P22, Φ 29, HSV-1 y T7 (Agirrezabala et al., 2007; Baker et al., 2005; Fokine et al., 2005; Jiang et al., 2003; Morais et al., 2005). Aunque su estructura general varía, se conserva un armazón común (Figura I1B) con dos dominios diferenciados: el A con dos α -hélices cortas formando una V y el dominio P que contiene una larga α -hélice y tres láminas β . La conservación del plegamiento de la proteína de la cápsida validó la relación filogenética entre Caudovirales y Herpesvirus, que ya había sido sugerida por las semejanzas en su mecanismo de ensamblaje (Newcomb et al., 2001; Trus et al., 2004). Esto convierte a los fagos con cola en uno de los grupos más antiguos (Veesler y Cambillau, 2011). Estudios estructurales revelaron también el plegamiento conservado de la proteína de la cápsida de virus que infectan arqueas

(STIV), bacterias (PRD1) e incluso organismos eucariotas (PBCV-1) (Rice et al., 2004). Ambos ejemplos sustentan la presencia de un antecesor viral común que existió probablemente antes de que los organismos divergieran originando los dominios Bacteria, Arquea y Eucaria (Bamford et al., 2005).

La evolución de los fagos, debido a su condición de parásitos intracelulares obligados, ha condicionado además la evolución concomitante de las bacterias, sobre las que los fagos han ejercido una importante presión selectiva. Esta coevolución se refleja en la similitud estructural entre las colas de los virus y algunas maquinarias bacterianas de la pared celular (sistemas de secreción y bacteriocinas) que han supuesto una solución convergente para el transporte macromolecular y/o un indicador de la transferencia genética entre ambos (Veesler y Cambillau, 2011).

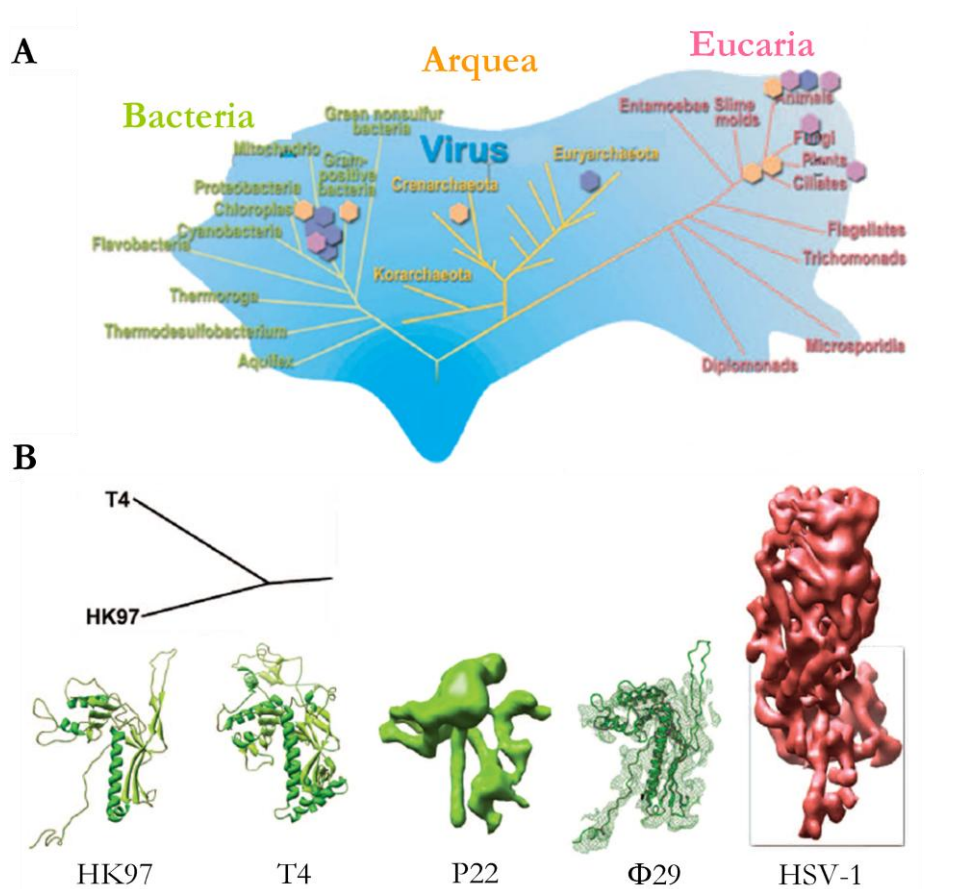


FIGURA 11. Filogenia de virus: expansión y relaciones. A. La expansión de los virus (en azul) en los tres dominios de la vida (en verde, naranja y rosa) ha permitido generar un árbol filogenético basado en secuencias de ARN ribosómico. B. Conservación estructural de la proteína de la cápsida de virus que infectan hospedadores procariotas (HK97, T4, P22 y Φ 29) y eucariotas (HSV-1). Esto sugiere relaciones filogenéticas (esquema en la parte superior) no reflejadas mediante la comparación de secuencias. Figura adaptada de (Bamford et al., 2005).

Los requerimientos para adaptarse a distintos hospedadores y ambientes han determinado la existencia una gran variedad de fagos diferentes. La tabla 1 muestra una clasificación de los bacteriófagos en función de su ácido nucleico y morfología (Aksyuk y Rossmann, 2011). Todos los presentados albergan su genoma en cápsidas icosaédricas, salvo la familia Inoviridae, que lo hace en filamentos helicoidales. El

orden Caudovirales se caracteriza por presentar, en uno de los vértices de la cápsida, una cola proteica de distinta morfología según la familia: corta y no contráctil (Podoviridae), larga contráctil (Myoviridae) y larga no contráctil (Siphoviridae). Los Tectivirales poseen una capa lipídica rodeando su genoma de ADN bicatenario, y los Cystoviridae presentan ARN bicatenario y una envuelta lipídica alrededor de la cápsida. Los Inoviridae tienen forma filamentosa, mientras que los Microviridae son icosaédricos. Por último, los Leviviridae poseen un genoma de ARN monocatenario. La presencia de cola, la formación de capas lipídicas sobre o bajo la cápsida y el tipo de ácido nucleico condicionan el mecanismo de infección de desarrollado por las distintas familias.

TABLA II. Clasificación de los bacteriófagos mencionados en el presente trabajo
Adaptada de (Kainov et al., 2006)

Bacteriófagos							
ADN				ARN			
bicatenario			Tectivirales	monocatenario		bicatenario	monocatenario
Caudovirales				Inoviridae	Microviridae	Cystoviridae	Leviviridae
Podoviridae	Myoviridae	Siphoviridae					
T7, P22, Φ29, ε15, Sf6	T4, P2/P4	λ, SPP1, HK97, SF6	PRD1	M13	ΦX174	Φ12, Φ6	MS2, R17

La optimización de recursos es una constante en el ensamblaje de los virus, y se basa en la utilización de relaciones de simetría para, partiendo de uno o varios componentes proteicos, generar estructuras tridimensionales de forma y tamaño definidos. Así, a partir del mínimo contenido genético se originan estructuras complejas, y se asegura además el mecanismo de reparación de errores, pues las subunidades proteicas (las piezas) defectuosas no se incorporarán al virus en formación. Muestra de esto es la cápsida icosaédrica, cuya estructura geométrica asegura la menor relación superficie/volumen (Cuervo y Carrascosa, 2012a). Existen distintos mecanismos tanto para la formación de la cápsida como para el confinamiento del ácido nucleico en el interior de la misma (Moody, 1999). Describiremos este último proceso, conocido como empaquetamiento, en el siguiente apartado.

12. EMPAQUETAMIENTO DEL GENOMA VIRAL

Existen dos estrategias distintas de empaquetamiento del genoma viral. Muchos virus de ARN monocatenario ensamblan sus cápsidas alrededor del genoma, es el caso de los eucariotas virus del mosaico de tabaco (TMV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y de los fagos M13 y R17. La formación de una precabeza dentro de la cual el genoma es empaquetado posteriormente es el mecanismo elegido por la mayoría de virus icosaédricos de ADN bicatenario (Caudovirales, Herpesvirus y Adenovirus) y de ARN bicatenario (fagos Φ6 y Φ12). Esto requiere la presencia de un motor que proporcione la energía necesaria para la traslocación del ácido nucleico al interior de la precabeza. Esta energía proviene de la hidrólisis del ATP (Kainov et al., 2006).

Los Caudovirales representan el 96% de los bacteriófagos (Brussow y Hendrix, 2002), y presentan en su mayoría un genoma concatémico con unidades genómicas repetidas en tándem y unidas por los extremos en el proceso de

replicación (salvo $\Phi 29$ y fagos relacionados, que tienen además una proteína unida covalentemente (Harding et al., 1978; Salas et al., 1978; Yehle, 1978)). El reconocimiento de las secuencias de los extremos por las proteínas virales asegura que los virus empaqueten su propio genoma y no el del hospedador (Sun et al., 2010). Asimismo, las repeticiones terminales indican el lugar de corte entre unidades genómicas, y evita la pérdida de bases en el extremo 5' (Rentas y Rao, 2003). Estas secuencias específicas de reconocimiento (cos o pac), que flanquean cada unidad del concatémero, pueden ser de varios tipos según el virus. Los fagos λ y T7 presentan secuencias terminales idénticas en ambos extremos (Hashimoto y Fujisawa, 1988; Hohn, 1983); y en los fagos T4 y P22 estas secuencias idénticas aparecen de forma repetitiva (Lin y Black, 1998; Wu et al., 2002). Además del reconocimiento de estas secuencias, para el empaquetamiento de los concatémeros son necesarios dos cortes: el de iniciación (que genera el extremo libre por el que empezar a empaquetar) y el de terminación (que delimita la unidad genómica del fago). Estos cortes pueden ser específicos de secuencia, como en λ y T7, o inespecíficos como en T4, P22 y SPP1 (Fujisawa y Morita, 1997). En este último caso, la señal de terminación se produce mediante un mecanismo denominado de “cabeza llena” en el que el conector actuaría como sensor de la cantidad de ADN empaquetado (Casjens et al., 1992; Cuervo et al., 2007; Tavares et al., 1992). El conector es una proteína estructural, localizada en un vértice específico de la precabeza, donde se anclan tanto el complejo terminasa (durante el empaquetamiento) como la cola (una vez finalizado éste). De hecho, incluso en sistemas donde el corte de terminación es específico de secuencia, como λ y T7, existen evidencias de un cambio conformacional del conector al finalizar el empaquetamiento (Agirrezabala et al., 2005a; Cue y Feiss, 1997; Fujisawa et al., 1990).

A pesar de que la cabeza icosaédrica presenta doce vértices pentaméricos en principio idénticos, tanto el conector como la terminasa se localizan en un vértice específico (Agirrezabala et al., 2005a; de Haas et al., 1999; Mancini et al., 2004; Sun et al., 2008). A través de éste se produce tanto la entrada del ADN a la precabeza de los Caudovirales como la salida durante la eyección. En algunos fagos como T7 y $\epsilon 15$ existe una estructura proteica interna llamada core que interacciona también con este vértice. Aunque el core no es necesario para el ensamblaje de la precabeza, facilita el ordenamiento topológico del ADN durante el empaquetamiento y la eyección, y es esencial para el proceso infectivo (Agirrezabala et al., 2005a; Jiang et al., 2006; Serwer, 1976).

La ruta de ensamblaje del fago T7 es común al resto de Caudovirales, aunque cada fago presenta peculiaridades específicas (Black, 1995; Dokland, 1999; Steven et al., 2005; Wikoff y Johnson, 1999). Como muestra la figura I2 (revisado en (Cerritelli et al., 2003)) la ruta comienza con la formación de la precabeza a partir de las dos isoformas de la proteína de la cápsida (gp10A y gp10B), la proteína de andamiaje (gp9), el conector dodecamérico (gp8) y el core (gp14, gp15 y gp16). La existencia de dos isoformas de la proteína de la cápsida y de un core es característica de T7. El complejo terminasa está formado por dos proteínas: la terminasa mayor (gp19) y la menor (gp18). La terminasa mayor interacciona con el conector y posteriormente con la terminasa menor que previamente ha unido el ADN concatémico. La precabeza y el complejo terminasa en su vértice configuran el complejo 50S, que una

vez libera las proteínas de andamiaje puede comenzar a empaquetar. Gracias a la energía proveniente de la hidrólisis de ATP, que transforma el complejo terminasa en energía mecánica, el ADN puede ser trasladado unidireccionalmente al interior de la cabeza. Las cápsidas abortivas son intermediarios que han sufrido un proceso de maduración (adelgazamiento de sus paredes e incremento de su superficie) pero no contienen ADN. Cuando la unidad genómica se halla dentro de la cápsida, se produce el corte de terminación y el complejo terminasa es liberado. La unión de las proteínas de la cola (gp11, gp12 y gp17) evita la salida del ADN (constreñido a densidades cuasi-cristalinas en el interior de la cabeza) y da lugar al virus infectivo. El ensamblaje de la cola en T7 se produce de forma cooperativa, mientras que en T4 la cola se ensambla en una ruta morfogénica independiente (Matsuo-Kato et al., 1981; Rossmann et al., 2004).

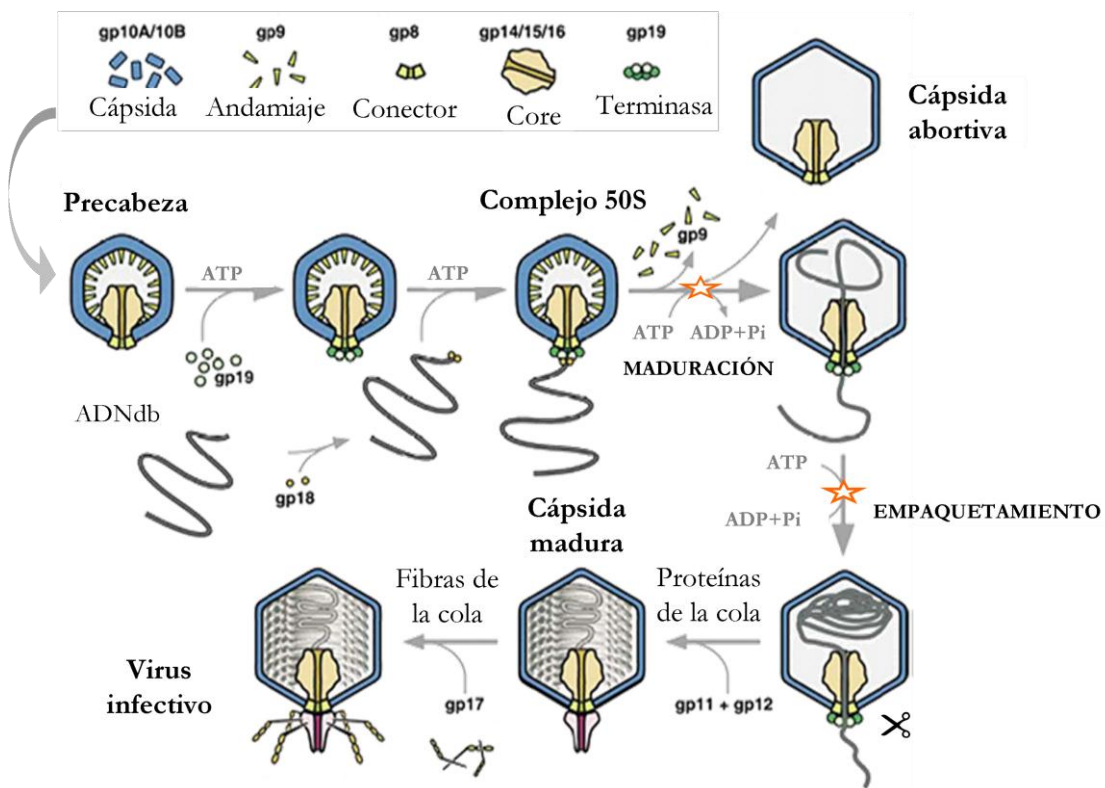


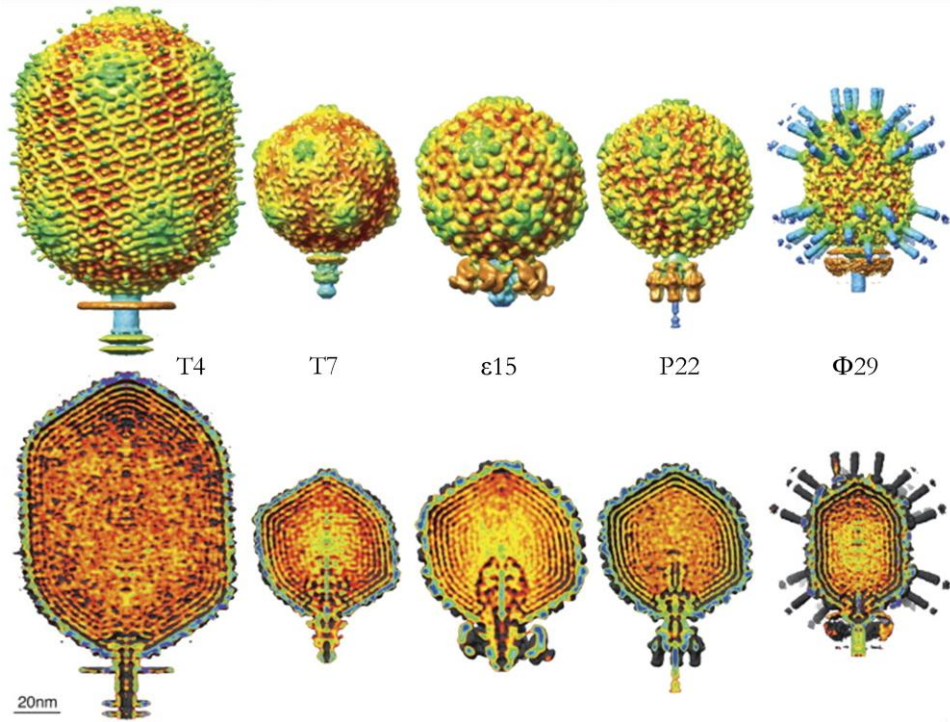
FIGURA I2. Ruta general de ensamblaje de bacteriófagos del orden Caudovirales. La ruta comienza con la formación de la precabeza a partir de distintas proteínas (en el recuadro, proteínas de la cápsida, de andamiaje y conector). El complejo terminasa (la terminasa mayor o gp19) interactúa con la precabeza, a través del conector, y con el ADN a través de la terminasa menor o gp18, configurando el complejo 50S. Cuando son liberadas las proteínas de andamiaje se inicia la maduración de la precabeza. Esta se caracteriza por la expansión de la cápsida y el adelgazamiento de sus paredes. El ADN es trasladado al interior de la cápsida con energía obtenida de la hidrólisis del ATP (estrellas en la figura) que realiza la gp19. Las cabezas expandidas que no contienen ADN (vacías) se conocen con el nombre de cápsidas abortivas. Cuando la unidad genómica se encuentra en el interior de la precabeza la gp19 realiza el corte de terminación y se desprende de la cabeza. El proceso culmina con el ensamblaje de las proteínas de la cola y las fibras de la cola, que constituyen el virus infectivo. Figura adaptada de (Cerritelli et al., 2003).

Tanto la longitud del genoma viral como las propiedades físicas de la molécula de ADN bicatenario imponen unas restricciones espaciales al

empaquetamiento, condicionando la forma en la que el ADN se ordenará dentro de la precabeza (Speir y Johnson, 2012). El ADN es confinado en la precabeza a una densidad superior a 500 mg/ml gracias a la presencia de la terminasa que empuja el ADN y del “core” interno que acomoda el ADN de una forma que permita su posterior eyección (Johnson y Chiu, 2007). Como muestra la figura I3, los estudios de criomicroscopía electrónica revelaron la disposición del ADN en capas con una geometría de bobina coaxial en cápsidas icosaédricas (T7, ϵ 15 y P22) y con una orientación más paralela al eje longitudinal en las cápsidas elongadas (T4 y Φ 29) (Johnson y Chiu, 2007). La presencia de una cola asegura no sólo el cierre del canal (para evitar la pérdida del ADN recién empaquetado) sino también la correcta eyección del genoma (Cuervo y Carrascosa, 2012a). Es importante resaltar que el ADN altamente condensado en la cabeza viral debe ser liberado eficientemente dentro de la bacteria. Esto impone severas constricciones a la topología del empaquetado del ADN, dado que la entrada y salida del ADN se producen por el mismo vértice portal mediante mecanismos completamente diferentes. El empaquetamiento es, como hemos dicho, un mecanismo activo, mientras que la eyección del ADN depende inicialmente de cambios estructurales en la cola. Estos desencadenan la liberación del ADN usando la energía potencial almacenada en la cabeza empaquetada produciendo la entrada del material genético del fago en la bacteria mediante un mecanismo pasivo (Rossmann y Rao, 2012). La energía potencial confinada en la cápsida está originada principalmente por las fuerzas de repulsión entre las dos hélices de ADN y por el doblamiento de las mismas (Sao-Jose et al., 2007). En virus como Φ 29 las proteínas virales procedentes de la primera parte del genoma que ha entrado en la célula son esenciales para completar el proceso de eyección (Alcorlo et al., 2007; Gonzalez-Huici et al., 2004; Gonzalez-Huici et al., 2006). En T7 se ha propuesto que la entrada del genoma a la célula está acoplada a la transcripción, como mecanismo de control del tiempo de expresión de los genes del fago (Molineux, 2001).

El desarrollo de sistemas de empaquetamiento *in vitro*, primero mediante extractos crudos (Black, 1981; Fujisawa et al., 1978) y después con componentes purificados (Grimes y Anderson, 1989; Hamada et al., 1986a; Leffers y Rao, 2000; Oliveira et al., 2005; Yang y Catalano, 2003), permitieron no sólo identificar los componentes implicados en el empaquetamiento sino determinar cuáles de estos eran esenciales. En el apartado siguiente describiremos estos componentes, centrándonos en las aportaciones que desde la estructura se han hecho a su descripción funcional.

FIGURA I3 (página siguiente). Estructura de fagos icosaédricos. Mapas de densidades electrónicas de reconstrucciones de los bacteriófagos T4, T7, ϵ 15, P22 y Φ 29. En la parte superior se muestran las superficies, con los vértices pentaméricos en verde y, en el caso de Φ 29, con las fibras en azul. En la parte inferior figuran los cortes transversales donde se aprecia la similar organización del ADN en el interior de las cápsidas y el canal cerrado de la cola. Números de acceso: T4 (em1075), T7 (em1164), ϵ 15 (em1175), P22 (em1220) y Φ 29 (em1265). Figura adaptada de (Johnson y Chiu, 2007).



13. COMPONENTES DEL COMPLEJO PORTAL

El complejo portal se localiza en un vértice único de la precabeza, y comprende el conector (que construye un canal para acomodar el ADN) y el complejo terminasa, implicado no sólo en la selección y procesamiento del ADN sino también en su traslocación dirigida por la hidrólisis de ATP. El funcionamiento de este complejo portal está definido por la comunicación entre los distintos componentes que lo forman y por la interacción de éstos con el ADN (Rao y Feiss, 2008). En la tabla 2 se muestran las masas de las proteínas empaquetadoras y la longitud de los genomas de los virus más estudiados. El conector y la terminasa mayor presentan tamaños heterogéneos dependiendo del sistema viral, mientras que el tamaño de la terminasa menor es similar en los distintos virus (excepto en HSV1, virus herpes simple de tipo 1, significativamente mayor). A pesar de que la molécula de ADN bicatenario es siempre lineal, su longitud varía bastante dependiendo del sistema viral: desde 19'3 kb en $\Phi 29$ hasta 166 kb en T4. La homología de los componentes implicados en el empaquetamiento (en forma general y estequiometría) y la conservación del mecanismo empaquetador aportan una nueva evidencia a la ya mencionada relación evolutiva entre Caudovirales y Herpesvirus (Baker et al., 2005).

TABLA I2. Componentes del complejo portal de virus de ADN bicatenario.

Fago/Virus	Terminasa menor		Terminasa mayor		Conector		ADNdc
	Proteína	Masa	Proteína	Masa	Proteína	Masa	Longitud
T7	gp18	20 kDa	gp19	67 kDa	gp8	59 kDa	40 kb
T4	gp16	18 kDa	gp17	70 kDa	gp20	61 kDa	166 kb
λ	gpNu	20 kDa	gpA	73 kDa	gpB	59 kDa	48'5 kb
SPP1	gp1	21 kDa	gp2	49 kDa	gp6	57 kDa	45'9 kb
P22	gp3	19 kDa	gp2	58 kDa	gp1	83 kDa	43,4 kb
Φ 29	gp3	31 kDa	gp16	39 kDa	gp10	35 kDa	19'3 kb
			pRNA	58 kDa			
HSV1	UL28	85 kDa	UL15	81 kDa	UL6	74 kDa	152 kb

I3.1. EL CONECTOR

Los conectores presentan una arquitectura común, aunque carecen de homología de secuencia y varían considerablemente de tamaño en función del sistema viral. Son ensamblados de doce subunidades con forma de toroide y un canal central. Su morfología en anillo es común a complejos proteicos implicados en la traslocación de ADN como helicasas, exonucleasas y topoisomerasas, lo que sugiere la implicación del canal en la interacción con el ácido nucleico (Carrascosa, 1999). Como muestra la figura I4, varios conectores oligoméricos han sido resueltos mediante microscopía electrónica (Agirrezabala et al., 2005b; Jiang et al., 2006; Orlova et al., 1999; Tang et al., 2011; Trus et al., 2004; Valpuesta et al., 1999; Valpuesta et al., 1992) y cristalografía de rayos X (Guasch et al., 2002; Lebedev et al., 2007; Olia et al., 2011; Simpson et al., 2000). Los conectores pueden dividirse en varios dominios claramente diferenciados: la corona o parte más apical (ver figura I4A en HSV1, T7, ϵ 15 y P22), las alas o parte central de máximo diámetro, y el tallo que corresponde a la región más estrecha en la base de las estructuras (Cuervo y Carrascosa, 2012b). El dominio central es el más conservado y comprende dos hélices y un dominio adicional α - β extendido presente en todos los conectores virales (ver motivo coloreado en la figura I4B) (Agirrezabala et al., 2005b). Los otros dos dominios, la corona y el tallo, varían en longitud y complejidad (en la figura I4B derecha se muestra la enorme estructura tubular de α -hélices que se extiende a partir de la corona del conector de P22). Teniendo en cuenta la conservación estructural de los conectores virales es razonable asumir que el de menor tamaño representará el núcleo mínimo para realizar las funciones principales, mientras que los dominios suplementarios presentes en conectores de mayor tamaño proporcionarán características adicionales (Agirrezabala et al., 2005b).

Todos los conectores insertados en la precabeza viral presentan doce subunidades (Agirrezabala et al., 2005b; Jiang et al., 2006; Lander et al., 2006; Orlova et al., 2003), aunque la sobreproducción de esta proteína puede originar la formación de diferentes formas oligoméricas (Cerritelli y Studier, 1996; Kang et al., 2008; van Heel et al., 1996). La falta de concordancia entre la simetrías que tiene el conector, dodecamérico, y el vértice de la precabeza, pentamérico, juega un papel esencial durante la traslocación del ADN, así como en el anclaje de la cola al portal.

En este contexto, el ADN bicatenario presenta una simetría rotacional intermedia (pseudo-simetría 10) entre la del conector y la del vértice (Cerritelli y Studier, 1996; Hendrix, 1978). Los conectores tienen un canal con un diámetro que varía desde los 25 Å en el caso de HSV hasta los 40 en P22, suficiente para acomodar la molécula de ADN bicatenario que tiene un diámetro de 23 Å (Vlieghe et al., 1999). La superficie electrostática del canal es mayoritariamente electronegativa (especialmente en la entrada y salida del mismo) con anillos de cargas positivas dispersas en sus paredes, que permitirían la interacción con la molécula electronegativa de ADN (Cuervo y Carrascosa, 2012b). Los segmentos α -hélice dispuestos paralelamente al eje del canal aparecen conservados no sólo en conectores sino también en canales proteicos de traslocación inespecífica de ácidos nucleicos (Hingorani y O'Donnell, 2000). Además, en los conectores de SPP1 y Φ 29 los bucles que sobresalen hacia el interior del canal podrían estar implicados en la retención del ADN dentro de la precabeza (Grimes et al., 2011; Isidro et al., 2004a).

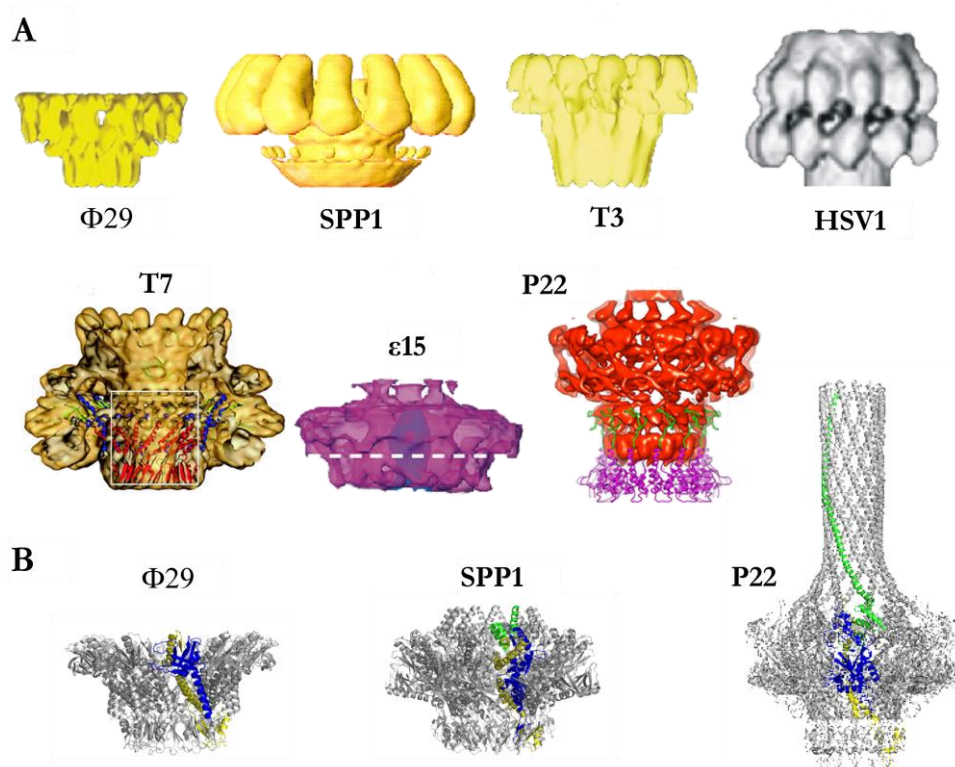


FIGURA I4. Estructuras de los conectores oligoméricos. A. Volúmenes de densidades electrónicas de conectores oligoméricos. Todos presentan una morfología similar con unas protusiones a modo de “alas” rodeando la parte exterior, un canal central (sólo apreciable en T7) y un tallo en la parte inferior. Salvo el conector de SPP1, con trece subunidades, el resto son dodecaméricos. B. Estructura atómica de los conectores oligoméricos resueltos mediante cristalografía de rayos X. Un monómero de cada complejo se muestra en color (corona en verde, región central en amarillo y alas en azul) revelando la conservación de los dominios y de la estructura general de las subunidades. Números de acceso PDB: Φ 29 (1H5W), SPP1 (2JES) y P22 (3LJ5). Figura adaptada de (Cuervo y Carrascosa, 2012b).

Las interacciones entre los conectores y el resto de componentes son fundamentales para el funcionamiento del complejo portal, como ha mostrado el análisis mutacional. La incorporación del conector a la procápsida, mediante la

interacción de su región apical con las proteínas de andamiaje, implica dominios diferentes dependiendo del sistema viral (Chen et al., 2010; Fu et al., 2011; Isidro et al., 2004b). En los fagos λ , T4 y Φ 29 se ha descrito la función nucleadora del conector durante la formación de la precabeza (Aksyuk y Rossmann, 2011). En la interacción con la terminasa, el conector actúa como punto de anclaje (Lin et al., 1999; Morita et al., 1995a; Morita et al., 1995b; Oliveira et al., 2010; Yeo y Feiss, 1995b), llegando incluso en el fago SPP1 a modular la actividad del enzima (Oliveira et al., 2006). El fago Φ 29 es un caso inusual porque la interacción entre conector y terminasa está mediada por una molécula de ARN (el pARN), que rodea el extremo más estrecho del conector formando un puente entre el portal y la terminasa. (Ibarra et al., 2000; Morais et al., 2008). En P22 el conector presenta un barril de α -hélices (figura I4B derecha) que podría mediar el empaquetamiento ordenado del ADN en el interior de la precabeza regulando asimismo la presión de salida durante el proceso de eyección del ADN (Tang et al., 2011). Además, el conector interacciona con las proteínas de la cola y otras proteínas implicadas en el cierre del canal tras el empaquetamiento del ADN (Cardarelli et al., 2010; Lhuillier et al., 2009). De hecho, en algunos virus el conector ha sido propuesto como sensor del mecanismo de cabeza llena, esencial para definir la cantidad de ADN que será empaquetado (Casjens et al., 1992; Tavares et al., 1992). Por último, para realizar todas sus funciones durante y después del empaquetamiento el conector probablemente sufra un cambio conformacional, no necesariamente irreversible como se había predicho (Rossmann y Rao, 2012).

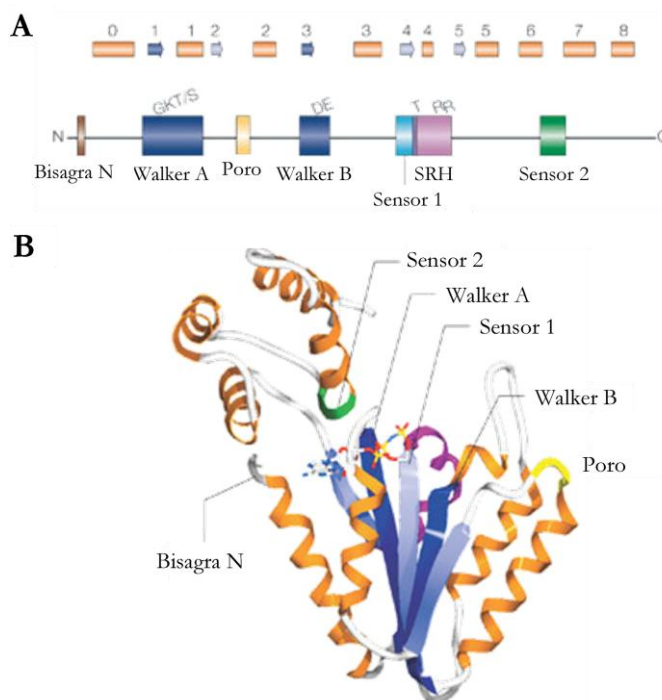
I3.2. EL COMPLEJO TERMINASA

El complejo terminasa es considerado el motor macromolecular encargado de convertir la energía química proveniente de la hidrólisis de ATP en el desplazamiento mecánico del ADN durante la morfogénesis del fago. Además de la actividad ATPasa la mayoría de las terminasas son endonucleasas, ya que realizan el corte de terminación, función que originalmente les dio el nombre, del ADN concatémico generando unidades genómicas individuales. El complejo terminasa es generalmente un hetero-oligómero formado por una terminasa menor encargada del reconocimiento del ADN y una terminasa mayor que contiene actividad ATPasa, nucleasa, y un motivo de anclaje al vértice portal (Rao y Feiss, 2008).

A pesar de que no existe un porcentaje significativo de homología de secuencia entre las distintas terminasas virales, se conservan regiones de secuencias aminoácidas o motivos estructurales esenciales para el empaquetamiento (Rao y Feiss, 2008). Las terminasas pertenecen a una amplísima familia de proteínas, conocida como proteínas AAA+ (ATPasas Asociadas con Actividades celulares variadas) y definida por la conservación en la organización y estructura de su dominio de unión a ATP (Figura I5). Las funciones asignadas a esta familia de proteínas abarcan multitud de procesos celulares, desde la degradación de proteínas y la replicación de ADN en todos los organismos hasta actividades más específicas como la termotolerancia (en bacterias, hongos y plantas), la fusión de membranas y el movimiento de motores sobre microtúbulos en eucariotas (Hanson y Whiteheart,

2005). Las proteínas AAA+ poseen los dominios Walker A y B, así como varios motivos característicos que las distinguen de otras NTPasas (Davey et al., 2002) (Figura I5A). Presentan dos subdominios: el extremo amino con un plegamiento $\alpha\beta$ de tipo Rossmann muy conservado, y el carboxilo terminal constituido por un número variable de α -hélices (Figura I5B). Como veremos, la información estructural sobre las terminasas virales, obtenida principalmente mediante cristalografía de rayos X, ha permitido empezar a relacionar su topología e interacciones con su posible función en el empaquetamiento del ADN.

FIGURA I5. Organización y estructura del dominio AAA+. A. Estructura secundaria y elementos clave del dominio AAA+. La posición aproximada de los elementos clave (bisagra N, Walker A y B, poro, segunda región de homología (SRH) y sensores 1 y 2) se muestra bajo los elementos de estructura secundaria correspondientes (rectángulos para α -hélices y flechas para las láminas β). B. Estructura cristalográfica del segundo dominio AAA+ de la proteína NSF presentada como modelo, donde se localizan los elementos clave señalados anteriormente. Número de acceso PDB: 1D2N. Figura adaptada de (Davey et al., 2002; Hanson y Whiteheart, 2005).



I3.2.1. La terminasa mayor

La actividad dual (ATPasa y nucleasa) de la terminasa mayor unida a su interacción transitoria con la maquinaria empaquetadora le confieren una naturaleza flexible, conformacionalmente heterogénea y altamente inestable (Hamada et al., 1986b; Nadal et al., 2010). Su tendencia a la agregación ha dificultado enormemente la determinación de su estructura y estequiometría (Morita et al., 1994). La primera estructura atómica presentada, obtenida por difracción de rayos X, correspondía a la ATPasa hexamérica P4, perteneciente al fago de ARN bicatenario Φ 12 (Mancini et al., 2004). El grupo de David Stuart obtuvo el monómero de P4 (Figura I6A) unido a distintos nucleótidos y el hexámero (figura I6B, izquierda) en la conformación “apo” (sin nucleótido unido). En 2007 fue cristalizado el dominio amino (en adelante Ndom) de la terminasa mayor del fago RB49, que compartía un 72% de identidad de secuencia con su homólogo en el bacteriófago T4 (Sun et al., 2007). Un año después el mismo grupo (Sun et al., 2008) consiguió resolver el dominio carboxilo (en adelante Cdom) que faltaba, y también la estructura atómica completa de la terminasa mayor (gp17) del fago T4 (Figura I6A). La reconstrucción del oligómero de gp17 mediante criomicroscopía electrónica de precabezas empaquetadoras permitió generar un modelo pentamérico de la misma (Figura I6B,

centro). Recientemente fueron obtenidas las estructuras atómicas de los Cdom de las terminasas G2P (Smits et al., 2009) y UL89 (Nadal et al., 2010) pertenecientes al fago SPP1 y al Citomegalovirus humano (HCMV) respectivamente (Figura I6A).

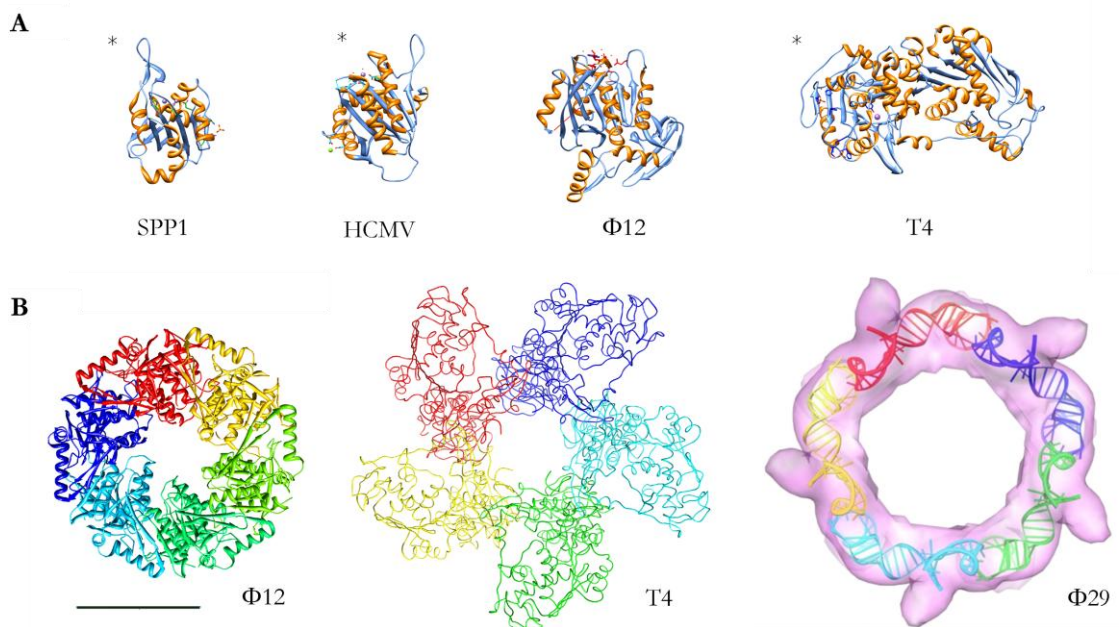


FIGURA I6. Estructuras atómicas de las subunidades mayores del complejo terminasa y del pARN resueltos por cristalografía de rayos X. A. Estructuras cristalográficas de los dominios nucleasa de G2P del fago SPP1 y de UL89 del virus eucariota HCMV; y de los monómeros P4 del fago Φ12 y de gp17 del fago T4. El asterisco señala el dominio nucleasa donde la similitud estructural se refleja en el dominio de plegamiento RNasa H/integrasa (grupo de láminas β rodeado de α hélices). B. Vista frontal de los anillos oligoméricos de las terminasas de los fagos Φ12 y T4, y del pARN con su envoltura pentamérica obtenida por criomicroscopía. Cada monómero se representa en un color para facilitar su visualización. La barra corresponde a 50 Å. Números de acceso PDB: SPP1 (2WC9), HCMV (3N4Q), Φ12 (monómero 1W48, hexámero 1W4C), T4 (monómero 3CPE, pentámero 3EZK) y Φ29 pRNA (3R4F).

Los alineamientos de secuencia de las terminasas virales muestran la conservación de los motivos funcionales del dominio ATPasa y su similitud con aquellos de helicasas traslocadoras monoméricas tipo SF2, endonucleasas de restricción y traslocasas proteicas (Draper y Rao, 2007). La terminasa mayor presenta dos dominios: el amino tiene la actividad ATPasa que proporciona la energía para la traslocación del ADN, y el carboxilo es el dominio nucleasa, encargado de generar el corte final en el genoma concatémico. En el fago Φ29 la subunidad mayor (gp16) no posee actividad nucleasa (ya que el genoma de Φ29 no es multimérico) y funciona en coordinación con el pARN, responsable del anclaje de la terminasa al portal (ver figura I6B, derecha). El Ndom de la terminasa de T4 presenta un plegamiento clásico de unión a nucleótido de tipo Rossmann, formado por una lámina β de 3 o más bandas paralelas con α-hélices intercaladas. Este motivo contiene el Walker A y el B, el carboxilato catalítico y se encuentra normalmente en proteínas que unen y rompen ATP (ver también figura I5). Los análisis bioquímicos realizados con las terminasas mayores de los fagos Φ29, λ,

SPP1, P22, T3 y T4 confirman la actividad ATPasa de este dominio (Goetzinger y Rao, 2003; Guo et al., 1987; Hwang y Feiss, 1996; Morita et al., 1993; Nemecek et al., 2007; Oliveira et al., 2006). El dominio nucleasa presenta un plegamiento conservado de tipo RNasa H/integrasa constituido por siete láminas β rodeadas por dos grupos de α -hélices. Este motivo básico de plegamiento (señalado con un asterisco en la figura I6A) varía en longitud y carece de homología de secuencia aminoacídica entre virus distintos (Nadal et al., 2010; Smits et al., 2009; Sun et al., 2008).

La sobreexpresión y purificación de terminasas mayores de virus diferentes ha revelado sus distintos estados oligoméricos. En los virus T4, SPP1, P22 y HCMV las subunidades mayores existen esencialmente como monómeros (Gual et al., 2000; Leffers y Rao, 2000; Nadal et al., 2010; Nemecek et al., 2007), mientras que en los fagos λ y Φ 12 oligomerizan en solución (Maluf et al., 2005; Mancini et al., 2004). Sin embargo, hay que considerar que durante el ensamblaje de la maquinaria empaquetadora, la estequiometría de la terminasa puede ser remodelada (Casjens, 2011). La ATPasa de Φ 12 (con genoma ARN bicatenario) es un hexámero (figura I6B, izquierda) y realiza funciones tanto de conector como de terminasa. El análisis de las terminasas mayores unidas a las precabezas de los fagos Φ 29 y T4 (gp16 y gp17, respectivamente) ha mostrado densidades electrónicas consistentes con la presencia de cinco subunidades en el complejo (Simpson et al., 2000; Sun et al., 2008). En el caso del pRNA inicialmente se reportaron seis subunidades interaccionando con el vértice portal (Shu et al., 2007); sin embargo estudios más recientes han confirmado la presencia de un anillo pentamérico (figura I6, derecha) unido a la precabeza (Ding et al., 2011). Por último, el anillo correspondiente a la terminasa mayor del fago T4 (gp17), obtenido por criomicroscopía, permitió al grupo de Rossmann realizar un encaje flexible de la estructura atómica del monómero de gp17 en el volumen tridimensional (modelo atómico pentamérico en la figura I6B, centro). Tanto la forma de anillo oligomérico como el diámetro del canal sugieren la interacción de las terminasas con el ácido nucleico a través del canal. Dado que en Φ 12 el ARN traslocado es monocatenario, el diámetro de la ATPasa es considerablemente menor (21 Å en su región más estrecha) que el de la terminasa gp17 (con un diámetro de 40 Å) apto para acomodar el ADN bicatenario de T4. Finalmente, la simetría pentamérica de la terminasa, presente en fagos con ADN bicatenario, encajaría bien con la pseudo-simetría 10 de ADN, pero no con la simetría de orden 12 del conector. Esta falta de correspondencia en las simetrías sería menor si consideramos la simetría pentamérica del vértice de la precabeza con quien la terminasa interacciona. Como explicaremos más adelante, los ajustes y desajustes de simetría tienen un papel fundamental en los mecanismos propuestos para este tipo de motores (Hendrix, 1978).

Durante el empaquetamiento la terminasa mayor interacciona con el conector (insertado en la precabeza), con la terminasa menor (unida al ácido nucleico) y con el ADN (primero para traslocarlo y finalmente para cortarlo). La unión de la terminasa al conector se basa en interacciones de tipo electrostático y tiene lugar a través de uno (Hegde et al., 2012; Morita et al., 1995a; Sun et al., 2008; Yeo y Feiss, 1995a; Yeo y Feiss, 1995b) o de ambos dominios (Kanamaru et al., 2004). Como describíamos anteriormente, el ADN es traslocado a través del canal

de la terminasa mayor, y el corte de terminación tiene lugar en el surco catalítico localizado en el Cdom de la terminasa (Nadal et al., 2010; Smits et al., 2009). Por último, estudios genéticos y bioquímicos localizan la interacción con la terminasa menor en el Ndom de la terminasa mayor (Frackman et al., 1985), siendo en T4 una interacción transitoria y dinámica (Malys et al., 2002).

Dado que el sitio de unión a ATP y el sitio de corte del ADN residen en la terminasa mayor, se ha especulado con la realización de un cambio conformacional en respuesta a la hidrólisis de ATP que mueva físicamente el ADN. Sin embargo, se ha propuesto también que la energía proveniente de la hidrólisis de ATP es transmitida al conector, que a su vez mueve al ADN. Los modelos de empaquetamiento que consideran como componente activo la terminasa o el conector, serán detallados en la sección siguiente.

I3.2.1. La terminasa menor

Las dos funciones básicas de la terminasa menor son: el reconocimiento del ADN a través de un motivo hélice-vuelta-hélice (de Beer et al., 2002) y la regulación de la actividad enzimática de la terminasa mayor durante la traslocación del ADN (Rao y Feiss, 2008). La terminasa menor presenta mayor variabilidad de secuencia que las otras proteínas del complejo portal (terminasa mayor y conector) aunque contiene también regiones conservadas estructuralmente. Existen otros casos, como el de Φ 29, en el que a pesar de que el genoma no codifica ninguna terminasa menor, la proteína gp3, unida al extremo del ADN, desarrolla una función homóloga (Grimes y Anderson, 1989).

En la última década han sido obtenidas las estructuras de varias terminasas menores (figura I7) mediante distintas técnicas estructurales: RMN (de Beer et al., 2002), criomicroscopía electrónica (Nemecek et al., 2008) y cristalografía de rayos X (Buttner et al., 2012; Sun et al., 2011; Zhao et al., 2010). Datos bioquímicos y estructurales revelan que la organización en dominios está altamente conservada en las terminasas menores: el dominio amino es el encargado de unir ADN, el dominio central es responsable de la oligomerización y el carboxilo es el dominio de interacción con la terminasa mayor (Sun et al., 2011). El fragmento N-terminal de gpNu1 (fago λ) y de g1p (fago Sf6, que infecta *Shigella*) comparten un mismo dominio hélice-vuelta-hélice. Como se muestra en la figura I7C el dominio central está formado por dos α -hélices conservadas, y el Cdom por un barril β característico (figura I7C, panel izquierdo y derecho).

La oligomerización de la terminasa menor genera anillos multiméricos que pueden variar entre octámeros y decámeros (o mayores). El dímero de gpNu1 (fago λ) fue resuelto por RMN (Figura I7A), y posteriormente estudios de centrifugación analítica revelaron que se ensamblaba como un octámero, igual que su homólogo en el fago *Shigella* Sf6 (figura I7C, panel izquierdo). Las terminasas menores de los fagos P22 (gp3) y SF6 (G1P) formaban anillos de nueve subunidades (figura I7, B y C, respectivamente), mientras que la gp16, perteneciente al fago 44R2 (de la familia de T4), presentaba once subunidades (figura I7C, panel central). Estos datos sugieren que aunque la oligomerización es importante, tanto la estequiometría como el diámetro interno no parecen esenciales para la función de la terminasa menor.

Tampoco podemos descartar que las interacciones con el resto de componentes de la maquinaria empaquetadora condicionen *in vivo* una estequiometría determinada (Casjens, 2011). Además, los diámetros internos de los anillos formados por las terminasas menores varían entre 10 y 24 Å en su región más estrecha. Como consecuencia, el modelo más aceptado de interacción con el ADN es aquel en el que la terminasa menor es rodeada por el ácido nucleico (Buttner et al., 2012; Sun et al., 2011), frente al anterior modelo que postulaba una interacción mediada por el interior del canal (Nemecek et al., 2008; Zhao et al., 2010). Finalmente, a pesar de la similitud en la forma general de las terminasas menores, no existen residuos conservados en el exterior del oligómero, lo que sugiere que la interacción con la terminasa mayor y con el conector está mediada por la arquitectura global del motor y por la forma característica de la terminasa menor (Buttner et al., 2012).

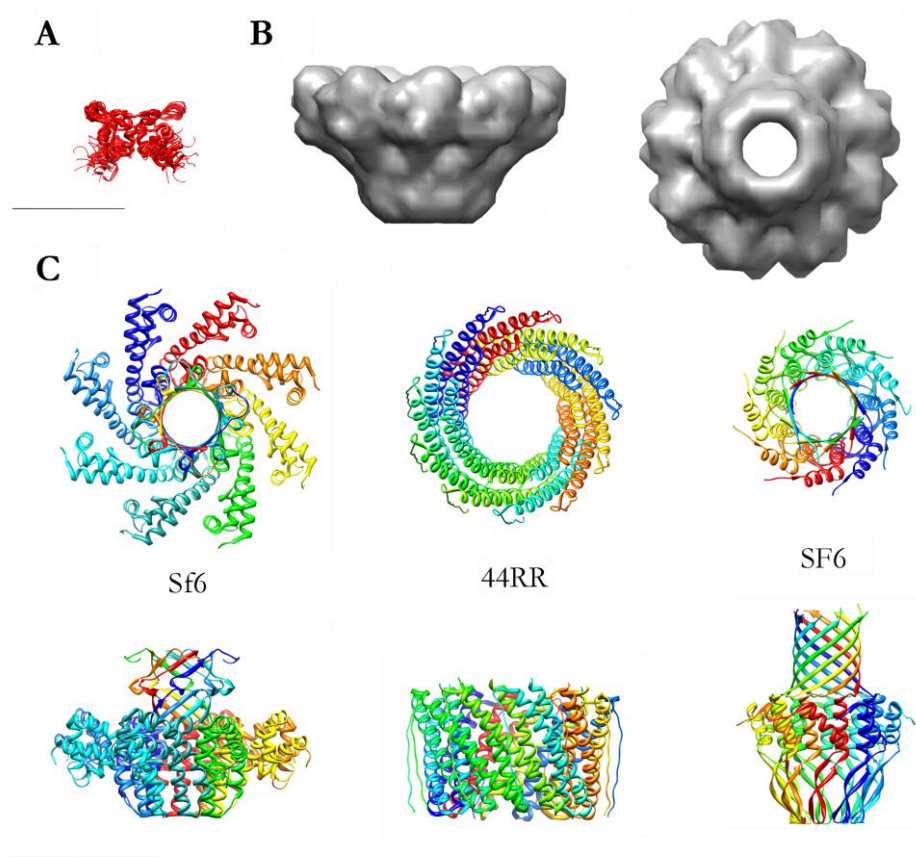


FIGURA I7. Estructuras de la terminasa menor del complejo terminasa. A. Dominio de unión a ADN resuelto por RMN del dímero de gpNu1, perteneciente al fago λ . La barra corresponde a 25 Å. B. Volumen de microscopía electrónica del nonámero de gp3, del fago P22. La reconstrucción mostrada tiene una resolución de 18 Å. C. Estructuras oligoméricas resueltas por cristalografía de rayos X, de izquierda a derecha: octámero de gp1 del fago de *Shigella flexneri* Sf6, oligómero de once subunidades de la región central de gp16 del fago 44RR (similar a T4) y nonámero de G1P del fago SF6 que infecta *Bacillus subtilis* (similar a SPP1). En las vistas frontales se aprecian los distintos diámetros del canal. La región de barril β apical de Sf6 (*Shigella flexneri*) y SF6 (*Bacillus subtilis*) se evidencia en las vistas laterales y su ausencia en 44RR se debe probablemente a la delección de sus dominios amino y carboxilo. La barra corresponde a 50 Å, y se refiere a los apartados B y C. Números de acceso PDB: fago λ (1J9I), Sf6 (3HEF), 44RR (3TXQ) y SF6 (3ZQP).

14. MODELOS DE EMPAQUETAMIENTO

La maquinaria empaquetadora está formada, como hemos mencionado, por el conector dodecamérico, situado en un vértice pentamérico específico de la cápsida, y el complejo terminasa, compuesto por la ATPasa viral que interacciona transitoriamente con la precabeza durante el empaquetamiento. Pese a los numerosos estudios centrados en la caracterización de estos motores, el mecanismo molecular de traslocación dista de conocerse con precisión (Rao y Feiss, 2008). Los modelos propuestos, presentados en la figura I8, pueden agruparse en dos categorías:

- centrados en el conector: en ellos los cambios conformacionales del conector son los que dirigen el empaquetamiento. Estos cambios son inducidos a su vez por la hidrólisis de ATP que realiza la terminasa.
- centrados en la terminasa: son los cambios conformacionales de la ATPasa los que directamente traslocan el ADN. Consideran el conector como un componente pasivo.

Es importante señalar que ambos mecanismos consideran que la terminasa proporciona la energía necesaria para el cambio conformacional, gracias a la hidrólisis de ATP. La diferencia entre uno y otro reside en qué elemento (si la terminasa o el conector) empuja activamente el ADN hacia el interior de la precabeza. En el caso de los modelos centrados en el conector la terminasa regularía la actividad del conector para que este pudiera empujar el ADN dentro de la cápsida.

El primer modelo propuesto se basaba en la discordancia de simetrías entre el conector y la precabeza (Hendrix, 1978). El desfase de simetrías debilitaría la unión entre ambos componentes, permitiendo la rotación del conector dentro de la cápsida. A través de ésta el ácido nucleico sería empaquetado en el interior de la precabeza (Figura I8A). Finalmente, el modelo apunta que la gran cantidad de energía almacenada por el elevado empaquetamiento del genoma estaría disponible para eyectar el ADN en el interior de la bacteria.

La posterior determinación de la estructura atómica de los conectores de $\Phi 29$ y SPP1 (Guasch et al., 2002; Lebedev et al., 2007; Simpson et al., 2000) dio origen a nuevos modelos que describían los cambios conformacionales precisos implicados en la traslocación del ADN. La estructura atómica del conector de $\Phi 29$ (Simpson et al., 2000) revelaba cierta inclinación en la posición de las hélices que formaban las paredes del canal. El grupo de Michael Rossmann sugirió que la hidrólisis de ATP hacía rotar 12° la parte basal del conector (ver Figura I8B, conector en verde), cambiando levemente el ángulo de las hélices del canal y originando una expansión en longitud del conector (debida al enderezamiento de las hélices). Este movimiento en la base del conector se transmitiría a su extremo superior produciéndose una relajación y contracción del conector que empujaría el ADN (en amarillo y negro en la figura) al interior de la precabeza. La compleción de la estructura atómica del conector de $\Phi 29$ y la compactación que revelaba su estructura cuaternaria contrastaba con los cambios estructurales descritos y dio lugar al modelo de deslizamiento del ADN (Guasch et al., 2002). Este modelo alternativo (Figura I8C)

sugería que era el anillo de lisinas (cargadas positivamente) presente en el canal del conector el que actuaba como punto de agarre para el ADN cargado negativamente. Esta interacción electrostática, unida a la rotación del conector (en blanco y azul en la figura) permitiría al ADN (en rojo) pasar de un anillo de lisinas (estrellas azules) al siguiente y ser traslocado sin que el conector sufriera modificaciones estructurales adicionales. La estructura pseudo atómica del conector de SPP1 (Lebedev et al., 2007) inspiró asimismo un nuevo modelo que se muestra en la figura I8D. La presencia de un cinturón ondulante continuo formado por bucles (en azul, cian, rojo y magenta) de la región central del canal conector sugería que un cambio conformacional secuencial en estos bucles podría actuar como palanca molecular traslocando el ADN. En este modelo un cambio cíclico en la posición de los bucles provocaría la traslocación de 2 pb del ADN y la rotación de 12° del conector, seguida de la hidrólisis de una molécula de ATP.

Sin embargo, la demostración de que el conector no rotaba en el interior de la cápsida (Baumann et al., 2006; Hugel et al., 2007) unida a la obtención de la estructura atómica de la terminasa mayor del fago T4, pusieron de relevancia los modelos centrados en la terminasa (ver Figura I8E). El cuidadoso análisis bioquímico y estructural realizado en T4 (revisado en (Rao y Black, 2010)) sugería la localización precisa de los elementos estructurales implicados en la hidrólisis de ATP y su acoplamiento a la traslocación del ADN (ver apartado I3.2). La gp17 estaba formada por dos dominios: el amino con actividad ATPasa (en morado en la figura) y el carboxilo con actividad nucleasa (en marrón). La unión de ambos a través de una región bisagra flexible (línea amarilla discontinua en la figura) permitía la movilidad relativa de uno respecto al otro. Estos datos sugerían un modelo basado en las interacciones electrostáticas (Sun et al., 2008; Williams et al., 2008) en el que la hidrólisis de ATP desencadenaría un cambio conformacional en el Ndom que alinearía los dos dominios. Dada la cercanía de éstos, las fuerzas electrostáticas atractivas entre ambos desplazarían el Cdom hacia arriba. Este movimiento de oruga (al pasar la terminasa de un estado relajado a uno tenso) empujaría el ADN al interior de la precabeza. Finalmente, la liberación de los productos de hidrólisis supondría una pérdida neta de carga negativa que desalinearía los dominios devolviendo la terminasa al estado relajado.

Por último es interesante mencionar las aportaciones que desde la caracterización estructural de las terminasas menores se han hecho a los modelos de empaquetamiento. Inicialmente todos los modelos proponían una localización coaxial de las dos proteínas del complejo terminasa (Nemecek et al., 2008), sin embargo la obtención de la estructura atómica de las terminasas menores gp1 (Zhao et al., 2010), gp16 (Sun et al., 2011) y G1P (Buttner et al., 2012) sugería fuertemente la disposición del ADN alrededor de los anillos, como se describe en la sección I3.2.1. Asimismo, no es posible descartar que la formación del complejo terminasa se produzca mediante la interacción entre el oligómero de la terminasa menor y el monómero de la mayor, como se ha sugerido para el fago 44RR (Buttner et al., 2012).

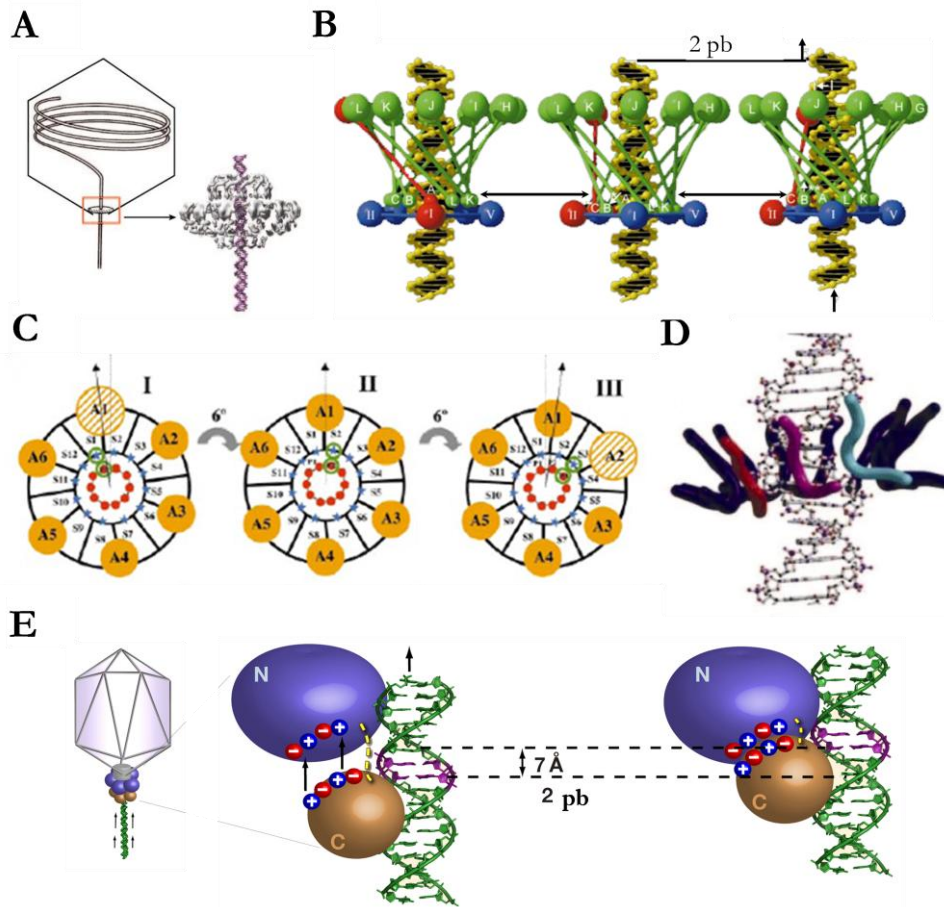


FIGURA 18. Modelos de empaquetamiento. A. Tuerca y tornillo. El giro rotacional del conector (tuerca) permite el movimiento lineal del ADN (tornillo). B. Compresión/relajación. La hidrólisis del ATP provoca la rotación (12°) del conector que se expande en longitud. La relajación/compresión del conector causa el movimiento hacia arriba del ADN, que se desplaza 2 pares de bases. Monómeros del conector en verde y rojo, monómeros de terminasa en azul y rojo, ADN en amarillo y negro. C. Deslizamiento del ADN. El anillo de lisinas (carga positiva), presente en el canal del conector de $\Phi 29$ (estrellas), actúa como punto de agarre electrostático del ADN (cargado negativamente) permitiendo la rotación del conector y el movimiento del ADN (en rojo). En este modelo el pARN actuaría como punto fijo (estator) y la ATPasa (círculos amarillos) como motor auxiliar. D. Cambio conformacional secuencial. Los doce bucles del canal del conector de SPP1 forman un apretado “cinturón ondulante” alrededor del ADN. El deslizamiento y reposicionamiento de un bucle causa lo mismo en el siguiente, transmitiéndose el cambio conformacional como una ola mexicana que resulta en la traslocación del ADN. E. Motor lineal tipo oruga. La traslocación del ADN estaría dirigida por el cambio conformacional de la terminasa, que se produce debido a la repulsión de cargas electrostáticas que alinea sus dos dominios atrayendo el carboxilo (en marrón) hacia el amino (en morado). El desplazamiento de 2 pb del ADN encaja con la diferencia de 7 \AA entre el estado pre-traslocación (conformación relajada, izquierda) y el post-traslocación (conformación tensa, derecha) de la terminasa. Figura adaptada de (Rao y Feiss, 2008; Williams et al., 2008).

15. OTRAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DEL MOTOR EMPAQUETADOR

Los motores moleculares han sido objeto de estudio mediante técnicas biofísicas muy diversas, en esta sección nos centraremos en las aportaciones proporcionadas por dos de ellas: las pinzas ópticas y las micropalanca.

15.1. LAS PINZAS ÓPTICAS

La cuantificación de las cinéticas de empaquetamiento viral resulta difícil cuando observamos poblaciones no sincronizadas, como en los ensayos de empaquetamiento *in vitro*. La complejidad aumenta si tenemos en cuenta que el motor no es un componente estructural de la precabeza, sino que interacciona transitoriamente con ésta. Los ensayos bioquímicos tradicionales pueden determinar únicamente la eficiencia global de empaquetamiento de una población a partir del tiempo total empleado. Sin embargo, los experimentos de molécula única han proporcionado estadísticas a partir de mediciones individuales, revelando por primera vez la existencia de pausas en las que el motor interrumpe el empaquetamiento del ADN (Chemla et al., 2005).

El sistema experimental de las pinzas ópticas aplicado al estudio del empaquetamiento se muestra en la figura I9A. Consiste básicamente en una terminasa viral ensamblada a la precabeza (en presencia de un análogo del ATP) con la que interacciona un ADN que previamente se ha unido a una microesfera. Variaciones en la longitud del ácido nucleico son registradas durante la aplicación de diferentes fuerzas al sistema (revisado en (Casjens, 2011)).

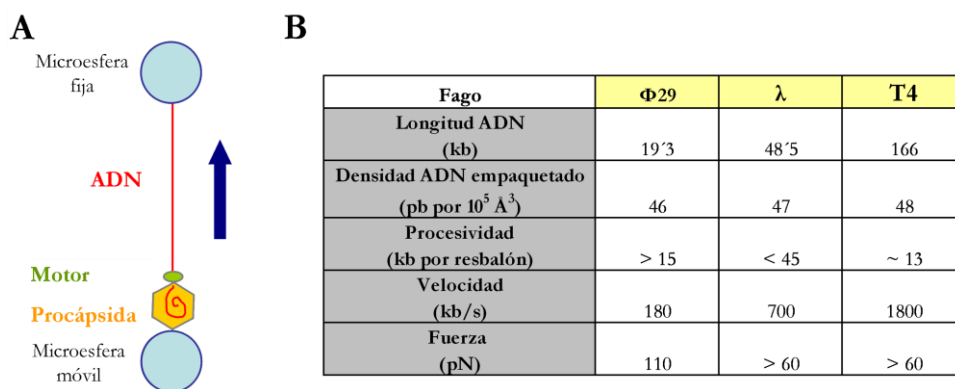


FIGURA I9. Análisis mediante pinzas ópticas del empaquetamiento de ADN. A. Esquema del sistema experimental de las pinzas ópticas. La precabeza (con el motor molecular) y el ADN son adheridos a sendas microesferas. Ambas microesferas están capturadas en trampas ópticas y la distancia entre ellas disminuye (flecha azul) a medida que avanza el empaquetamiento (porque el ADN comienza a entrar en la precabeza). La detección de la posición de las microesferas y su manipulación permite determinar distintos parámetros del motor. B. Tabla con las propiedades de los motores moleculares de los fagos $\Phi 29$, λ y T4, determinadas mediante pinzas ópticas. Figura y tabla adaptadas de (Casjens, 2011).

Uno de los parámetros determinados mediante pinzas ópticas ha sido la velocidad de empaquetamiento de los motores de los fagos $\Phi 29$ (Rickgauer et al.,

2008; Smith et al., 2001), T4 (Fuller et al., 2007a) y λ (Fuller et al., 2007b). Como muestra la tabla (figura I9B) los valores de velocidad media varían desde 180 kb/s en Φ 29 hasta 1800 kb/s en T4. La velocidad de cada motor parece estar relacionada con la longitud del genoma de cada fago, así aunque los fagos con genomas de mayor tamaño presentan velocidades más grandes todos completan el empaquetamiento de su ADN en 2-3 minutos (el ciclo viral completo demora unos 20-30 min) (Rao y Feiss, 2008). Además se ha observado que la velocidad disminuye a medida que avanza el empaquetamiento, debido al aumento de la presión interna de la cápsida. Por ejemplo, en el fago λ la velocidad de empaquetamiento es tres veces menor cuando el 90% del genoma se encuentra dentro de la precabeza que al inicio del empaquetamiento (Fuller et al., 2007a).

El paso es el número de pb de ADN trasladados por el motor cada vez que es hidrolizada una molécula de ATP. Los análisis bioquímicos en Φ 29 y T3 lo estimaron en 2 pb/ATP (Guo et al., 1987; Morita et al., 1993). Sin embargo, los experimentos de molécula única mostraron que el paso no tenía un valor fijo, sino que podía variar dependiendo de la simetría del ADN y del grado de llenado de la cápsida (Chemla et al., 2005). Posteriores análisis con pinzas ópticas de alta resolución determinaron que el motor trasladaba el ADN en cuatro pasos de 2.5 pb. Esto sugería fuertemente la elevada coordinación entre subunidades de la terminasa, dado que sólo cuatro de las cinco unían ATP antes de producirse la hidrólisis y la traslocación (Moffitt et al., 2009).

Las pinzas ópticas revelaron también las enormes fuerzas (entre 60 y 110 pN dependiendo del virus) realizadas por los motores durante el empaquetamiento del ADN. Estas fuerzas eran 20 veces superiores a las encontradas en la miosina II, implicada en la contracción muscular (Smith et al., 2001). Valores tan altos son esenciales para empaquetar el ADN frente a las enormes fuerzas electrostáticas repulsivas (y probable energía entrópica y de doblamiento) derivadas de confinar una molécula cargada negativamente en el reducido volumen de la cápsida (Rao y Feiss, 2008).

Para entender el funcionamiento del motor empaquetador es necesario conocer el mecanismo de acoplamiento entre la hidrólisis de ATP (liberación de energía química) y la traslocación del ADN (desplazamiento mecánico). Durante la traslocación el motor interacciona con el ADN y lo desplaza un número de pb por cada hidrólisis para, a continuación, soltarlo para que pueda reiniciarse el ciclo. La catálisis del ATP puede dividirse en varios pasos: la unión del ATP, el ataque nucleofílico del γ fosfato y la liberación de los productos de reacción. Estudios recientes del grupo de Carlos Bustamante sugieren que el motor de Φ 29 se une al ADN después de interactuar con el ATP y que el ADN es trasladado justo antes de la liberación del ADP (Rossmann y Rao, 2012).

I5.2. MICROPALANCAS

Las técnica de las micropalancas deriva de la microscopía de fuerzas atómicas (en adelante AFM (Binnig et al., 1986)) y utiliza las puntas del AFM no para obtener una imagen “topográfica” de la muestra, sino como soporte y transductor

de fuerzas moleculares que tienen lugar en su superficie (Chen et al., 1995; Gimzewski et al., 1994). De esta forma se crean unos dispositivos híbridos bio-mecánicos, siendo la micropalanca el componente mecánico y las moléculas adheridas a ella la parte orgánica. Esta técnica ha supuesto una aproximación intermedia entre los experimentos de molécula única mencionados en el apartado anterior y los experimentos bioquímicos tradicionales (Norman y Badia, 2009).

Las micropalancas funcionan como un péndulo, presentando:

- Frecuencia de vibración: directamente relacionada con su elasticidad (dependiendo del material con que esté fabricada, por ejemplo silicio) y su masa, referida al pegamiento de moléculas en su superficie (Burg et al., 2007). La funcionalización de una sola de las superficies permite generar un pegamiento diferencial detectable entre ambas caras de la micropalanca (figura I10A, arriba).
- Capacidad de deflexión: pueden flexionarse hacia un lado u otro como resultado de cambios en el estrés superficial, es decir, en las interacciones que tengan lugar en su superficie (figura I10A, abajo). Las interacciones entre moléculas (o dentro de una misma molécula) adheridas a la superficie de la micropalanca provocan cambios en el estrés superficial. Este se relacionará con los cambios conformacionales producidos en la superficie (Mukhopadhyay et al., 2005).

Además, la sensibilidad de las micropalancas depende de:

- las fuerzas intermoleculares entre las partículas adheridas y entre éstas y la superficie. Los enlaces covalentes son los más fuertes y los más fácilmente detectables.
- la forma y homogeneidad de la capa de moléculas: una monocapa autoensamblada proporcionará una señal detectable (Mertens et al., 2008).
- rigidez de la micropalanca, cuanto más flexible sea mayor sensibilidad tendrá (Scholz et al., 2011).

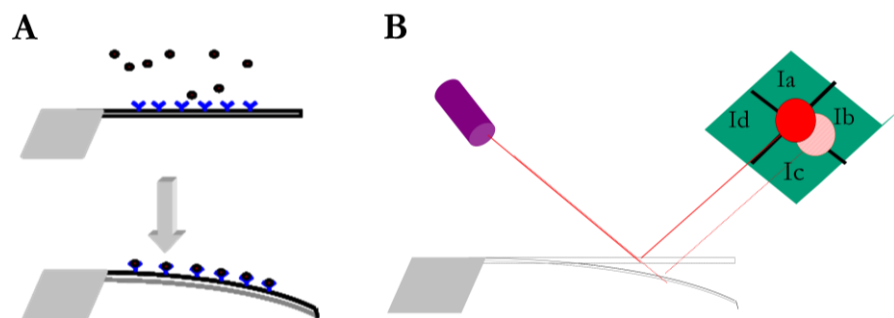


FIGURA I10. Sistema experimental de las micropalancas. A. Esquema de la funcionalización de una de las superficies de la micropalanca que permite el pegamiento diferencial de motores moleculares. Las variaciones en masa y estrés superficial derivadas de la adhesión de los motores provocan cambios en la frecuencia de vibración y en la deflexión de la micropalanca respectivamente. B. Sistema de detección: la flexión de la micropalanca es detectada mediante la incidencia de un rayo láser (línea roja) en su superficie. Este se refleja en un fotodiodo (cuadro verde) que registra su posición exacta (círculos).

La detección a escala nanométrica de cambios en la frecuencia o en la deflexión de las micropalancas, requiere la amplificación de la señal. Se consigue incidiendo con un láser en la punta de las micropalancas de forma que registremos los cambios en el ángulo de reflejo del láser, que es proyectado y detectado en un fotodiodo bidimensional (Figura I10B) (Mertens et al., 2005).

Por todo lo anterior, en los últimos años numerosos trabajos han validado la aplicación de las micropalancas al estudio de problemas biológicos diversos (revisado en (Arlett et al., 2011; Hess et al., 2004)). En uno de los primeros estudios (Shu et al., 2005) detectaban y controlaban (variando el pH) la transición reversible de un motor molecular de ADN entre la forma cerrada (cuádruplex) y abierta (dúplex). Además, eran capaces de dirigir la dirección y amplitud de la flexión de la micropalanca variando la fuerza iónica de la solución. De esta forma, hacían funcionar al ácido nucleico como un interruptor molecular. La elevadísima sensibilidad de las micropalancas fue demostrada en un trabajo del grupo de Rachel A. McKendry (Ndieyira et al., 2008) donde obtenían las constantes catalíticas de una interacción mucopéptido/antibiótico. Eran capaces de detectar la simple rotura de un puente de hidrógeno asociado a la resistencia al antibiótico. Para ello empleaban micropalancas recubiertas de tres compuestos: dos mucopéptidos (uno sensible y otro resistente al antibiótico) y un control negativo (polietilenglicol), y medían la interacción específica con la vancomicina. Un año después, la sensibilidad de esta técnica fue aplicada para medir una interacción completamente distinta: la del virus T5 con sus receptores específicos (Braun et al., 2009). La unión de receptores virales a proteolipasomas adheridos a la superficie de la micropalanca permitía determinar el incremento (en mgr) de masa sobre la superficie frente a concentraciones picomolares de virus.

Paralelamente, es interesante mencionar la contribución que desde el AFM se ha hecho al estudio del cambio conformacional. El desarrollo de la técnica (Ando et al., 2001; Sahin et al., 2007; Viani et al., 2000) ha permitido estudiar con elevada resolución temporal movimientos a nivel molecular (Dong et al., 2009; Wickham et al., 2011). En uno de los trabajos de referencia, el grupo de Kunio Takeyasu visualizó en tiempo real el cambio conformacional de la chaperonina GroEL en presencia de ATP y ADP (Yokokawa et al., 2006).

Estas novedosas técnicas biofísicas proporcionan una vía para obtener información adicional y complementaria sobre el funcionamiento de motores moleculares, y pueden ser de gran utilidad para abordar el estudio del complejo terminasa. Los estudios de molécula única de las pinzas ópticas han permitido conocer la fuerza y la velocidad ejercidas por motores de virus similares a T7, proporcionando datos cuantitativos del empaquetamiento viral. Las micropalancas, que han sido aplicadas a motores moleculares muy variados, suponen una aproximación prometedora al estudio del cambio conformacional del complejo terminasa y por ello han formado parte del trabajo que hemos realizado en esta Tesis Doctoral.

Objetivos

Con el objeto de caracterizar la estructura y los posibles cambios conformacionales involucrados en el funcionamiento de la terminasa mayor del bacteriófago T7 se pretende:

- Clonar y purificar la terminasa mayor del bacteriófago T7. Purificar asimismo los complejos terminasa/conector.
- Obtener una reconstrucción tridimensional de la terminasa mayor en forma activa mediante microscopía electrónica (ME) y técnicas de procesamiento de imagen.
- Obtener una reconstrucción tridimensional del complejo portal (terminasa/conector) y analizar eventuales cambios conformacionales de la terminasa al interactuar con el conector.
- Generar un modelo atómico de la terminasa y encajarlo en los volúmenes de ME. Localizar las regiones catalíticas y superficies electrostáticas en los mismos.
- Estudio del cambio conformacional de la terminasa mediante la técnica de micropalanca. Análisis de la inmovilización de la terminasa sobre superficies funcionalizadas y de su interacción con distintos nucleótidos.

Materiales y métodos

M1. MATERIALES BIOLÓGICOS

M1.1. CEPAS BACTERIANAS

Para la amplificación del bacteriófago T7 salvaje se utilizó la cepa de *E. coli* BL21. La cepa de *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987) fue utilizada para el clonaje de la proteína gp19. La cepa de *E. coli* BL21 DE3 pLys (Studier et al., 1990) se empleó como sistema de sobreexpresión de las proteínas gp19 y gp8.

M1.2. VIRUS

El fago T7 salvaje utilizado proviene de la colección ATCC (*“American Type Culture Collection”*), código BAA-1025-B2.

M1.3. PLÁSMIDOS

El plásmido pET21(+) (Novagen) fue utilizado para la producción de la proteína gp19. Presenta un promotor de T7 inducible por IPTG, una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo y un gen que le confiere resistencia a la ampicilina. El plásmido pRSET (Invitrogen) fue utilizado como control positivo de los ensayos de expresión, es inducible por IPTG y contiene un gen que le confiere resistencia a la ampicilina. El plásmido pET28Aa (Novagen) fue utilizado para la producción de la proteína gp8, es inducible por IPTG, presenta una etiqueta de 5 histidinas en el extremo carboxilo y un gen de resistencia a la kanamicina.

M2. MÉTODOS

M2.1. AMPLIFICACIÓN Y TITULACIÓN DEL BACTERIÓFAGO T7

Para la producción de un título elevado del fago T7 salvaje se empleó el protocolo de amplificación de fagos en medio sólido. Se infectó la cepa de *E. coli* BL21 en condiciones de lisis confluyente y se plaqueó sobre una base de TopAgar (Sambrook et al., 1989). Tras incubar toda la noche a 37°C, se resuspendieron las placas confluentes con 5 ml de TMS (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 100

mM NaCl) durante 8 horas con agitación continua a 4°C. Posteriormente, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación (15000 r.p.m., 10 minutos a 4°C, en un rotor Sorvall SS34) y se concentró el sobrenadante mediante ultracentrifugación (42000 r.p.m., 2 h a 4°C, en un rotor Beckman 55.2Ti). Finalmente se resuspendió el sedimento en el volumen de TMS requerido. La titulación se realizó por el procedimiento convencional (Adams, 1950).

M2. 2. AMPLIFICACIÓN Y CLONAJE DEL GEN 19

El ADN del fago T7 correspondiente al gen 19 fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los oligonucleótidos delanteros (*forward*) empleados diferían en el codón de inicio (en negrita):

- 5'-GGCGGCGAATTCGCATGGATTC**GTG**CGTTACAGG
- 5'-GCGCGAATTCCAAGTAAGAGGCAAT**ATG**TC

Los tres oligonucleótidos reversos empleados dieron lugar a las construcciones sin etiqueta, con una etiqueta de 6 histidinas (presente en el pET21(+)) y con una etiqueta de estreptavidina (8 aminoácidos, en negrita), y corresponden respectivamente a:

- 5'-GCCGCCCTCGAGCCCTCCTCTCCCTATAGTGAG
- 5'-CGCGCTCGAGCCACTCAATGAAAGACGTACC
- 5'-GCGCCTCGAGTCA**CTTTCAA**ACTGTGGGTGGG**ACCACCAC**
TCAATGAAAGACGTACC

El gen 19 fue amplificado usando como molde una dilución 1/10 de virus entero ($1.4 \cdot 10^{13}$ pfu/ml) previamente hervido (24 min a 100°C) para liberar el genoma. La mezcla de reacción (50 µl de volumen final) contenía: 5 µl de tampón de reacción 10x, 0.5 mM dNTPs, 4 µl de fago, 2 U de Vent polimerasa (Biolabs) y 0.2 µM de oligonucleótidos. El programa de PCR empleado consistía en 5 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C; por último 10 min a 72°C. El vector fue producido mediante el procedimiento de lisis alcalina (kit Mini-Prep de Promega). Los productos de PCR fueron digeridos (1 h a 37°C) con 40 U de las enzimas EcoRI y XhoI (Biolabs) en reacciones consecutivas. Asimismo, el vector fue digerido con sendas enzimas y defosforilado mediante tratamiento con 1.5 U de fosfatasa alcalina SAP (Roche). Los ADNs purificados fueron insertados en el pET21(+) y tras la ligación (75 min a 16°C) se transformaron mediante choque térmico en *E. coli* XL1-Blue. Las preparaciones de los ADNs plasmídicos fueron comprobadas mediante PCR. Una vez confirmados por secuenciación (Secugen), los recombinantes fueron transformados en células BL21 DE3 pLys para la expresión de proteínas.

M2.3. PRODUCCIÓN DE LA GP19

Los ensayos de expresión se hicieron con cultivos crecidos en medio LB a 37°C hasta densidades ópticas (DO 600 nm) de 0.4-0.6, e inducidos con IPTG (a 2

mM y 0.75 mM) durante 5 h. Los antibióticos de selección utilizados, ampicilina a 100 µg/ml y cloramfenicol a 35 µg/ml, se añadieron también en el momento de inducir y dos horas después, para mantener la selección. Las células lisaban pasadas 2 h y a ese tiempo procesábamos (centrifugando 4 min a 13200 r.p.m.) tanto el precipitado (P) como el medio (sobrenadante, SB). Este se analizaba solamente en el momento de la lisis y una hora después (SB t2 y t3). En el resto de alícuotas las células (1 ml) eran precipitadas (4 min a 13200 r.p.m.) y lisadas (2 min a 95°C) directamente en tampón de carga (30 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 10 mM de 2-mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol y 0.2% de azul de bromofenol) para su análisis por electroforesis en geles desnaturalizantes (10% acrilamida/bisacrilamida) teñidos con azul de Coomassie.

Para la sobreproducción de la gp19 con histidinas y codón ATG se siguió el mismo protocolo con algunas variaciones. Una vez lisado (1 h 50 min después de la inducción) el cultivo se enfriaba en hielo y se centrifugaba a 12000 r.p.m. durante 30 min a 4°C, en el rotor Sorvall GSA. El precipitado (restos celulares) era desechado y el sobrenadante (SB t2, conteniendo la gp19 soluble) congelado a -20°C.

M2.4. PURIFICACIÓN DE LA GP19

El extracto de proteína soluble era dializado durante la noche a 4°C en solución A: 20 mM imidazol, 50 mM tampón sodio fosfato pH 7, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 20% (v/v) de glicerol. La proteína era parcialmente purificada mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel de 1 ml (His Trap, Amersham Biosciences) y eluida, con un gradiente escalonado de imidazol, a la concentración de 500 mM. Los escalones correspondían a 20 mM, 500 mM y 1 M de imidazol en solución A tamponada. A continuación, las fracciones con máxima concentración de gp19 eran dializadas (2 h a 4°C en mini tubos de diálisis, GE Healthcare) frente a la solución B: 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoetanol, 0.1 mM espermidina y 20% (v/v) de glicerol. El último paso de purificación consistía en la ultracentrifugación (16 h a 4°C, 45000 r.p.m., rotor Beckman SW55Ti) en gradientes de glicerol del 25 al 40% (v/v). La concentración de proteína fue estimada con el método Bradford (Bradford, 1976) utilizando como referencia seroalbúmina bovina (BSA).

Para los gradientes de GraFix (Kastner et al., 2008) la muestra proveniente de la cromatografía de afinidad era dializada frente a solución C: 50 mM tampón sodio fosfato pH 7, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ADP tamponado a pH 7, 5 mM DTT y 20% (v/v) de glicerol. El gradiente empleado era del 20 al 50% (v/v) de glicerol en solución C. El glutaraldehído se añadía sólo en la solución madre pesada, quedando un gradiente del 0.09 al 0.15% de agente fijador. Los tubos de GraFix eran preparados en un formador de gradientes (*Gradient Master*, Biocomp) y estabilizados al menos 1 h a 4°C. La muestra se ultracentrifugaba a 35000 r.p.m. en el rotor SW55Ti durante 16 h a 4°C. La ruptura del gradiente se hacía con el mismo aparato formador (desde la superficie hasta el fondo), para garantizar la reproducibilidad. Se recogían 28 fracciones y el fondo era resuspendido en 50 µl de

solución C. El entrecruzamiento se detenía añadiendo glicina a una concentración final de 80 mM en las fracciones recolectadas. Estas eran analizadas sin hervir en geles SDS-PAGE al 8%. Alícuotas de las fracciones eran conservadas a -20°C.

M2.5. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA GP8

La producción y purificación del conector de T7 fue realizada por la doctora Sonia Moreno, introduciendo ligeras variaciones en el protocolo descrito anteriormente (Agirrezabala et al., 2005b; Cerritelli y Studier, 1996). El gen 8 fue clonado en el plásmido pET28Aa con 5 histidinas en el extremo carboxilo (cedido amablemente por R. Pérez-Luque y M. Coll). La crecida de 50 ml de cultivo de *E. coli* BL21 DE3 pLys se realizó a 37°C en medio LB con kanamicina (50 µg/ml) y cloramfenicol (35 µg/ml) hasta la fase exponencial de crecimiento (DO 600 nm = 0'4-0'6). En este punto se inducía con 1 mM de IPTG durante 6-8 horas. Tras esto se recogían las células centrifugando a 4000 r.p.m. durante 5 min a 4°C, se retiraba el sobrenadante con vacío y se congelaba el precipitado a -80 °C.

Tras descongelar las células se resuspendían en 1 ml (por cada 50 ml de cultivo) de tampón de ruptura: 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 3 mM 2-mercaptoetanol, 50 mM de MgCl₂, 20 µg/ml DNasa, 30 µg/ml RNasa e inhibidores de proteasas (libres de EDTA). Posteriormente, se incubaban durante 30 min en hielo y se centrifugaban (15 min a 7000 r.p.m a 4°C) para separar los restos celulares (precipitado).

El sobrenadante se cargaba en la resina (500 µl de resina por cada 100 ml de cultivo) Talon de cobalto (Clontech) previamente equilibrada con solución de lavado: 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 3 mM 2-mercaptoetanol y 10 mM imidazol. La muestra se incubaba con la resina durante 2 h o toda la noche a 4°C. Se realizaban 6 lavados con la solución de lavado (5 ml por cada ml de resina) y 6 eluciones con solución de elución (1 volumen por cada volumen de resina): 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 3 mM 2-mercaptoetanol y 350 mM imidazol. Durante los lavados se centrifugaba la resina con la muestra a 7000 r.p.m. (a 4°C) y a 2000 r.p.m. (a temperatura ambiente) durante las eluciones. Finalmente se dializaba durante toda la noche a 4 °C frente a 500 volúmenes de solución de diálisis: 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, y 3 mM 2-mercaptoetanol. La muestra se conservaba a -80 °C o se mantenía a 4 °C si se iba a utilizar inmediatamente.

M2.6. FORMACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO GP19/GP8

Para los ensayos de interacción, ambas proteínas fueron dializadas en solución D: 50 mM tampón sodio fosfato pH 7, 300 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT y 20% (v/v) de glicerol. Se añadieron cantidades equimolares de ambas al volumen de reacción (395 µl) que contenía además 1 mM de ATP tamponado a pH 7 en solución D. En el control negativo (conector sin terminasa) el volumen de gp19 era sustituido por solución D. Las mezclas de reacción se incubaron durante 1 h 30 min a 30°C, para inducir la formación del complejo. Los gradientes utilizados y

las condiciones de ultracentrifugación son iguales a las descritas en el apartado M2.4. Se recogieron 12 fracciones y el fondo se resuspendió en 50 μ l de solución D. La fijación del glutaraldehído se detuvo añadiendo glicina a 80 mM. Las fracciones se analizaron sin hervir (salvo en el gradiente sin glutaraldehído) en geles SDS-PAGE al 8% y posteriormente se conservaron a -20°C .

M2.7. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ATPASA DE LA GP19

Los ensayos de actividad ATPasa se realizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Leffers y Rao, 2000; Manne et al., 1982) con ATP [γ - ^{32}P] marcado radiactivamente (grupo Taper). Cada fracción de gp19 purificada del gradiente de glicerol era incubada en una mezcla de reacción (20 μ l) conteniendo 1-10 μ Ci de ATP [γ - ^{32}P] (actividad específica 3000 Ci/mmol) en solución P: 10 mM Tris-HCl pH 7.7, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM 2-mercaptoetanol, 0.1 mM espermidina y 10% (v/v) de glicerol durante 2h a 37°C . La reacción se detenía añadiendo a cada mezcla de reacción EDTA a una concentración final de 10 mM. A continuación, 1 μ l de cada mezcla de reacción se cargaba, a 1 cm del borde inferior y del siguiente punto, sobre una banda de PEI-celulosa F de 18 cm de largo por 10 cm de ancho. La banda se ponía en contacto con el solvente (150 mM de LiCl y 150 mM de ácido fórmico a pH 3) hasta que la zona húmeda se encontraba a 0.5 cm del borde superior (unos 25 min). El cromatograma se secaba al aire y los puntos eran visualizados usando un *Molecular Dynamics Phosphorimager*. La cuantificación de actividad se realizó utilizando el programa *Quantity One* de Biorad.

M2.8. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA TINCIÓN NEGATIVA

En el caso de la gp19, la fracción 8 proveniente del GraFix fue adsorbida sobre rejillas de cobre recubiertas de carbón-colodion, que previamente habían sido sometidas a una descarga iónica para aumentar su carácter hidrófilo. Se incubaron 10 μ l de muestra con cada rejilla durante 1h a 4°C . Como habían descrito Kastner y colaboradores, alargar el tiempo de adsorción aumenta de manera considerable la concentración de la muestra. El tampón excedente se retiraba de la rejilla absorbiéndole con papel de filtro. Se realizaron tres lavados con agua destilada y se teñió con acetato de uranilo al 2% durante 1 min.

En el caso del complejo gp19/gp8 y del control de gp8, las fracciones 5 de ambos tubos GraFix eran adsorbidas sobre rejillas quantifoil utilizando la técnica de sándwich (Ohi et al., 2004) para asegurar una tinción completa de la muestra. Las preparaciones fueron incubadas durante 1h a 4°C sobre rejillas evaporadas con carbón y previamente ionizadas. Se realizaron tres lavados con acetato de uranilo al 2% y se teñía con acetato de uranilo durante 1 min. Finalmente todo se recubría con una capa de carbón de 0.5 cm^2 arrastrándola desde abajo con la rejilla (para que la muestra quedara finalmente entre dos capas de carbón) y se dejaba secar al aire.

M2.9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

La visualización de rejillas de tinción negativa fue realizada en un microscopio Tecnai F20 equipado con un cañón de emisión por campo. Las muestras fueron examinadas a 100 kV (para la gp19) o 200 kV (para la gp8 y el complejo gp8-gp19) y las fotografías fueron realizadas a una magnificación nominal de 50000X que, debido al factor de corrección de la cámara empleada (CCD EAGLE 4X), daba una magnificación final de aproximadamente 67000X. El subenfoco empleado era de 1 micra aproximadamente. Todas las fotografías se tomaron en condiciones de mínima dosis.

M2.10. PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

Las micrografías digitales fueron submuestreadas hasta $4'4 \text{ \AA}/\text{píxel}$ (la terminasa y el conector) y a $4'2 \text{ \AA}/\text{píxel}$ (el complejo). Su calidad en cuanto a astigmatismo y deriva fue evaluada mediante el análisis de su Función de Transferencia de Contraste (CTF).

El pre-procesamiento, alineamiento bidimensional y clasificación de imágenes fueron realizados utilizando el paquete de software Xmipp (Marabini et al., 1996; Sorzano et al., 2004). Las partículas fueron seleccionadas manualmente y recortadas en cajas de: 80x80 píxeles (px) en el caso de la terminasa, 72x72 px en el conector y 112x112 px en el complejo. Para la normalización se utilizó el método rampa (*Ramp*) del paquete Xmipp. La CTF fue corregida utilizando un filtro tipo Wiener.

En el procesamiento de la terminasa la clasificación de imágenes se llevó a cabo utilizando el método de Máxima Probabilidad (*Maximum Likelihood*) (Scheres et al., 2005a; Scheres et al., 2005b). Las imágenes del conector y el complejo se clasificaron utilizando el método CL2D de alineamiento clásico multirreferencial (*Maximum of the distance*) (Sorzano et al., 2010). Asimismo, las imágenes se clasificaron mediante mapas auto-organizativos KerDerSOM (Marabini y Carazo, 1994; Pascual-Montano et al., 2001) empleando la simetría rotacional como parámetro principal de clasificación.

M2.11. RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL

Para obtener la reconstrucción tridimensional (3D) de la terminasa se partió de un modelo inicial generado por el método de líneas comunes (Thuman-Commike y Chiu, 2000). Éste se basa en el teorema de la sección central (Crowther et al., 1970) que postula que la transformada de Fourier bidimensional (2D) de una proyección de un objeto es una sección central de la transformada de Fourier 3D de dicho objeto. Existen por tanto líneas comunes de información en la transformada de Fourier de las diferentes proyecciones. Dado que cada una de las partículas extraídas de las micrografías pueden considerarse imágenes de proyección del objeto

a distintos ángulos, si tomamos el número necesario de imágenes a distintos ángulos de inclinación del objeto, tendremos suficientes secciones en el espacio de Fourier como para reconstruirlo usando la transformada de Fourier inversa. Así, partiendo de imágenes de proyección a distintos ángulos (imágenes medias frontales y laterales), se calculan las transformadas de Fourier 2D. Dada la simetría rotacional de orden 5 de la gp19, el número de proyecciones necesarias será considerablemente menor, ya que cada 72° se repite la estructura. A continuación, las transformadas de Fourier de las proyecciones se combinan en el espacio de Fourier 3D. Una vez determinadas las orientaciones relativas de las diferentes proyecciones, se realiza la síntesis de Fourier o transformada de Fourier tridimensional inversa, que genera una reconstrucción 3D del objeto. Esto se somete a un proceso iterativo que genera finalmente un modelo inicial aproximado, requerido para el siguiente paso de refinamiento angular.

El refinamiento angular comienza con la proyección del modelo inicial en todas las direcciones del espacio tridimensional. A continuación las imágenes experimentales son comparadas, mediante métodos de correlación con las proyecciones para buscar los ángulos de orientación que mejor las definen (Llorca, 2005). Una vez calculados éstos, se reconstruye un nuevo volumen 3D que se usará como referencia en el siguiente ciclo. Este proceso se repite de forma iterativa hasta que la asignación de ángulos a las imágenes experimentales no varía significativamente. Para el alineamiento multi-referencia empleamos el software EMAN (Ludtke et al., 1999) y el método de Máxima Probabilidad 3D del software Xmipp (Scheres et al., 2007). El problema de estas técnicas es la gran dependencia del resultado sobre la referencia seleccionada (lo que se conoce como *model bias*). Es por esto que es fundamental que el modelo preliminar sea fiable y consistente. Posteriormente utilizamos el paquete Xmipp, siguiendo el protocolo conocido como *Projection Matching* (Scheres et al., 2007), para generar el volumen tridimensional final, constituido en el caso de la terminasa por 14097 partículas.

Para obtener la reconstrucción tridimensional del conector y del complejo se siguió un procedimiento muy similar al de la terminasa. Los modelos iniciales fueron generados por el método de líneas comunes, utilizando el paquete EMAN. Para el alineamiento multi referencia empleamos el software EMAN y el método de Máxima Probabilidad 3D del software Xmipp. Finalmente el refinado del modelo se realizó con los métodos *Projection matching* y de Máxima Probabilidad 3D, ambos del paquete Xmipp. El volumen del conector fue reconstruido utilizando 17382 partículas y en el del complejo fueron empleadas 11650 partículas.

Las simetrías pentamérica y dodecamérica fueron impuestas a lo largo del proceso de refinado de la terminasa y del conector respectivamente. Para ello, en la reconstrucción sin simetría, se realizó un análisis rotacional de los componentes armónicos de cada sección del volumen para definir las áreas de imposición de las simetrías 12 y 5 en el paso final del refinamiento. Esta tarea se realizó mediante la obtención de los espectros rotacionales de los distintos planos del volumen del complejo reconstruido sin simetrizar. Se usaron radios distintos con el objetivo de incluir las principales características morfológicas de cada sección. Asumimos que la mano del conector era la misma que la definida para la reconstrucción por criomicroscopía electrónica presentada previamente (Agirrezabala et al., 2005b;

Fernandez et al., 2008). Asimismo, la mano del conector se consideró igual a la definida para los componentes individuales.

La resolución de los mapas 3D fue estimada por el criterio FSC (*Fourier Shell Correlation*) tomado éste con los valores de 0'3 y 0'5. La FSC mide la correlación cruzada normalizada entre dos volúmenes 3D en función de la frecuencia espacial. La resolución final de los volúmenes fue estimada en 16-17'5 Å para la terminasa, 19'8-21'1 Å para el conector y 29'4-31'4 Å para el complejo, según los criterios mencionados.

M2.12. SEGMENTACIÓN, MODELADO Y AJUSTE DE ESTRUCTURAS

La segmentación del volumen correspondiente a la terminasa a partir del mapa completo del complejo reconstruido se realizó manualmente utilizando el software CHIMERA (Pettersen et al., 2004) mediante la inspección visual de la densidad presente a distintos niveles σ .

El potencial electrostático fue calculado mediante la herramienta *Coulombic Surface Coloring* en CHIMERA.

El modelo atómico de la terminasa fue generado por Juan Carlos Sánchez, del grupo de Florencio Pazos y Mónica Chagoyen del Centro Nacional de Tecnología (CNB-CSIC). Se empleó el reconocimiento de plegamiento (*threading*), una metodología basada en la localización de un homólogo estructural para la secuencia diana (la gp19). Este método se emplea cuando la similitud de secuencia entre ambas proteínas (diana y molde) es muy baja (inferior al 20%) o inexistente y el modelado por homología de secuencia no puede ser utilizado. Una de las aproximaciones del reconocimiento de plegamiento consiste en buscar homólogos distantes usando métodos basados en perfiles capaces de detectar relaciones de secuencia muy sutiles. Para este trabajo se empleó el programa HHpred (Soding et al., 2005) que compara, mediante perfiles HMM (acrónimo inglés para modelos ocultos de Markov), la secuencia diana con una librería compuesta por proteínas de estructura conocida. Se obtuvieron varios posibles moldes, siendo el mejor candidato la proteína gp17 del bacteriófago T4 (código PDB 3CPE) (Sun et al., 2008). A partir de los alineamientos previos de terminasas virales (Draper y Rao, 2007; Rao y Feiss, 2008) que señalaban los principales motivos catalíticos, refinamos el alineamiento entre la gp19 (diana) y la gp17 (molde) para generar el modelo final tridimensional empleando los programas Swiss-PdbViewer y Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997). Finalmente, utilizamos estos mismos programas para evaluar la calidad del modelo.

Los modelos atómicos del monómero y del pentámero de la gp19 se encajaron manualmente sobre el mapa de densidad de la terminasa a 16 Å de resolución empleando CHIMERA y el resultado fue comprobado mediante el programa CoLoRes del paquete SITUS (Chacon y Wriggers, 2002; Wriggers et al., 1999). Se calcularon los índices de correlación para diferentes posiciones de los modelos atómicos sobre el volumen de microscopía. Para ello se aplicaron tanto el criterio volumétrico (que ajusta los volúmenes como si fueran esferas) y laplaciano (que ajusta por superficies y bordes), obteniéndose mejores coeficientes de

correlación en los ajustes volumétricos. El índice de correlación correspondiente al ajuste final del modelo pentamérico sobre el mapa de microscopía de la terminasa fue 0,79 y permitió la asignación sin ambigüedades de la mano del volumen.

En el caso de la terminasa segmentada el encaje del modelo atómico se realizó manualmente y tampoco fue necesario un ajuste flexible de la molécula. Los ajustes del modelo atómico sobre los mapas de microscopía fueron validados en el servicio del PDB RCSB.

M2.13. PRODUCCIÓN DE GP19 PARA LOS ENSAYOS DE MICROPALANCAS

La gp19 utilizada en los experimentos con micropalancas se obtuvo como describe el apartado M2.4.

Adicionalmente se hizo un ensayo ATPasa cualitativo, para confirmar la actividad de las fracciones oligoméricas de gp19, como describe el apartado M2.7.

Las fracciones oligoméricas activas eran dializadas (en mini tubos de diálisis, GE Healthcare) durante 2 h a 4°C frente a solución M: 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM espermidina y 50% (v/v) de glicerol.

M2.14. PREPARACIÓN DE LAS MICROPALANCAS

Las micropalancas de silicio monocristalino de 400 µm de largo, 100 µm de ancho y 1 µm de grueso fueron adquiridas en Mikromasch. Mediante evaporación térmica fueron recubiertas, por una de sus caras, de una capa de oro de 20 nm sobre una capa de 2 nm de cromo que facilitaba su adhesión. A continuación eran incubadas a temperatura ambiente con 2 mM de DSP (Sigma-Aldrich) en DMSO durante 2 h. Después se lavaban con DMSO (10 min), PBS (5 min) y solución M (5 min).

M2.15. MEDIDA DE LA DEFLEXIÓN DE LAS MICROPALANCAS

Las medidas de deflexión de la palanca fueron realizadas utilizando un sistema óptico de deflexión del haz construido por el grupo de J. Tamayo (CMM, CSIC). La técnica de registro combina el método de deflexión óptica del haz y el escaneo bidimensional automático con un rayo láser único manipulado mediante unos actuadores (*voice-coil actuators*). Así es posible registrar la flexión absoluta, es decir, la medida del borde libre de la palanca respecto a su posición fija. Llamamos deflexión positiva (hacia arriba) cuando la capa de oro se expande respecto a la de silicio. Teniendo en cuenta que la capa de oro está situada en la cara inferior, la flexión se producirá hacia “arriba”, es decir, doblándose en dirección a la capa de silicio. Llamamos deflexión negativa (hacia abajo) cuando la palanca se vence hacia la cara con oro, es decir, cuando la capa de oro se comprime respecto a la de silicio.

La temperatura dentro de la celda era controlada con 0'1 % de precisión gracias a un controlador de temperatura modelo 325 (Newport). La calibración previa a los experimentos consistía en la aplicación de un pulso de calor de 1 a 3 °C durante 30 s. Se utilizaban una resistencia Peltier y una sonda montada en el interior de la celda para medir los cambios de temperatura del fluido.

M2.16. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los experimentos fueron realizados en una celda líquida de cristal, conteniendo solución M, donde las micropalanca eran sumergidas para mantener las condiciones físico químicas. El flujo se controlaba mediante una bomba de jeringa (Cole Palmer) equipada con una válvula de inyección a baja presión y un bucle de inyección. Las diferentes soluciones eran introducidas cambiando de la jeringa de inyección al bucle de reserva conteniendo los analitos (terminasas y nucleótidos) a la concentración deseada en la solución M. La capacidad de la celda era de 100 μ l, asegurando el rápido reemplazo de las soluciones. La inyección de las diferentes soluciones de analitos se llevaba a cabo después de que la deflexión de la palanca alcanzara el estado de equilibrio.

Al sumergir la micropalanca en la celda, ésta se exponía a un flujo constante de 50 μ l/min de solución M a 25°C, y la medida de su deflexión marcaba la línea base considerada como 0 nm. La solución M era reemplazada por las diferentes soluciones de analitos a tiempo $t=0$. A tiempo 0 se inyectaba la solución de analito en el tubo y ésta era empujada, por el flujo constante de solución M, hacia la celda de medida. De esta forma la solución de analito entraba al interior de la celda con el mismo flujo, 50 μ l/min. Es importante resaltar que la composición de las soluciones y su flujo se mantuvieron constantes durante todo el experimento. Se producía siempre un intervalo entre la respuesta de la palanca y la inyección previa, debido al tiempo que tardaba la muestra inyectada en pasar a través del tubo y rellenar la celda.

M2.17. MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS

La morfología de la capa de terminasas fue investigada mediante AFM (Digital Instrument, D3100) en modo PeakForce™ QNM™. Este modo controla precisamente la fuerza ejercida durante la toma de imágenes (~ 10 pN) para mantener una indentación pequeña, que permitiera una visualización no destructiva y de alta resolución. El AFM fue empleado para visualizar los cambios en la disposición de la gp19 sobre la superficie antes y después de la inyección de 50 μ M ATP (Sigma-Aldrich). Previamente a la toma de imágenes, las muestras fueron tratadas con PBS (5 min) y agua desionizada (15 min) y posteriormente secadas de forma controlada (15 min) en una cámara húmeda.

Resultados

R1. PRODUCCIÓN DE LA TERMINASA MAYOR DEL FAGO T7.

R1.1. DISEÑO DE CLONAJE DEL GEN 19

El gen 19 codifica la proteína mayor del complejo terminasa del bacteriófago T7. Este fago, ampliamente estudiado en el laboratorio, supone un excelente sistema modelo porque pese a su simplicidad genética posee una complejidad estructural y funcional considerable. Aunque la terminasa del fago T7, gp19, no ha sido extensamente caracterizada, sí existen numerosos trabajos bioquímicos sobre la terminasa de un fago evolutivamente muy cercano aunque diferente: el fago T3 (Beck et al., 1989; Davis y Hyman, 1971). La terminasa del fago T3, también llamada gp19, fue clonada y purificada en 1986 (Hamada et al., 1986b), pudiendo localizarse sus dominios funcionales (Morita et al., 1994; Morita et al., 1995a; Morita et al., 1995b) y cuantificarse su gasto energético de traslocación (Morita et al., 1993). Si comparamos la secuencia nucleotídica del gen 19 en los fagos T3 y T7, obtenemos una identidad del 83%. La comparación de su secuencia, da una identidad aún mayor, del 86% (92% si consideramos aminoácidos con características similares), lo cual sugiere que estamos ante la misma proteína. Sin embargo, actualmente la caracterización estructural de la gp19 no ha sido abordada en ninguno de los dos sistemas (T7 y T3). Es por ello que comenzamos con un diseño racional del clonaje de la gp19 del fago T7, basado en la información previa de que disponíamos.

Con el objetivo de facilitar la purificación del gen 19 se incluyeron etiquetas de histidinas o estreptavidina en uno de sus extremos. Para determinar qué extremo de la proteína gp19 era más apto para portar la etiqueta se hizo un alineamiento por homología de secuencia de terminasas virales (Figura R1). En la figura se muestran la conservación de aminoácidos (en negro y gris) y la localización de las regiones funcionales determinadas en estudios previos. La menor conservación del dominio carboxilo, sometido a inserciones y deleciones en las diferentes terminasas virales, lo convierte en idóneo para la colocación de la etiqueta.

Asimismo, se modificó el codón de inicio del gen 19 (GTG), por el codón estándar de iniciación (ATG) para favorecer una mejor expresión del gen. Se realizaron seis construcciones del gen 19 (Figura R2A) según tuvieran ATG o GTG como codón de inicio y portaran etiqueta, histidinas o estreptavidina, o no. Una vez diseñado el clonaje se procedió a amplificar el gen con los oligonucleótidos correspondientes para obtener los insertos deseados.

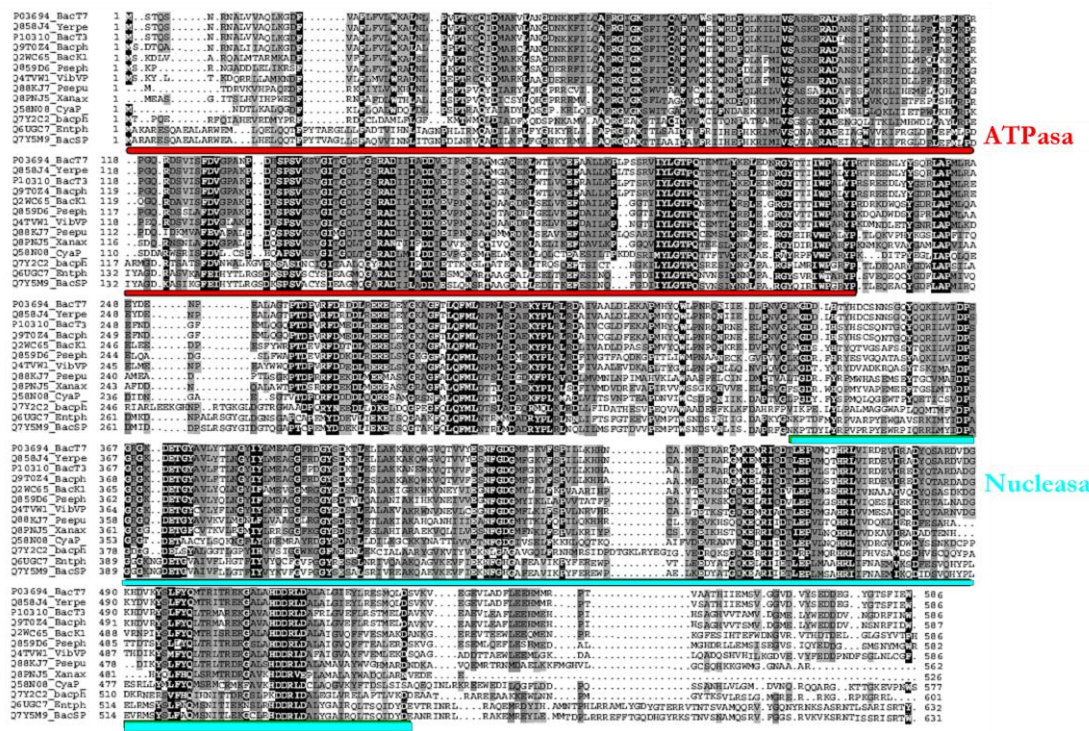


FIGURA R1. Alineamiento por homología de secuencia de ATPasas virales. La localización de los dominios ATPasa y nucleasa se muestra en rojo y cian respectivamente. Los números de los aminoácidos aparecen al inicio y al final de cada línea. Codificación: P03694: gp19, bacteriófago T7; Q858J4: ADN maturasa B, fago Φ A1122 de *Yersinia pestis*; P10310: gp19, bacteriófago T3; Q9T0Z4: proteína de empaquetamiento B, bacteriófago Φ YEO3-12; Q2WC65: gp19, bacteriófago K1F; Q859D6: proteína de empaquetamiento B, fago GH-1 de *Pseudomonas*; Q4TVW1: proteína de empaquetamiento B, vibriofago VP4; Q88KJ7: ADN maturasa B, *Pseudomonas putida* (cepa kt2440); Q8PNJ5: ADN maturasa emparentada con fagos, *Xanthomonas axonopodis*; Q58N08: subunidad β de la ADN maturasa, cianofago P-SSP7; Q7Y2C2: maturasa gp43, bacteriófago Φ KMV; Q6UGC7: proteína 40, fago K1-5 de *Enterobacteria*; Q7Y5M9: gp41, bacteriófago SP6.

R1.2. AMPLIFICACIÓN Y CLONAJE DEL GEN 19 A PARTIR DEL GENOMA DEL FAGO T7

El gen 19 fue amplificado mediante PCR a partir del genoma viral obtenido mediante choque térmico de la cápsida del fago. En la figura R2B se presentan los seis productos de la PCR y el control negativo (en ausencia de molde). La diferencia de tamaño de las etiquetas y la inclusión de la región posterior al gen 19 en el inserto sin etiqueta se reflejan en la diferente migración de las bandas.

Los seis insertos fueron introducidos en un vector comercial inducible por IPTG (pET21(+)) utilizando los sitios de restricción EcoRI y XhoI. Las construcciones resultantes fueron transformadas en cepas de *E.coli* supercompetentes, tanto de clonaje (XL1-Blue) como de expresión (BL21 DE3 pLys). Los transformantes positivos fueron detectados mediante PCR de las colonias o extracción de ADN, y posteriormente confirmados por secuenciación. En la figura R2C se muestra como ejemplo el análisis de los transformantes de la

construcción 2 (gp19_ATG_His) en la cepa de clonaje. Los clones positivos corresponden a los pocillos 2A, 2B, 2C y 2E.

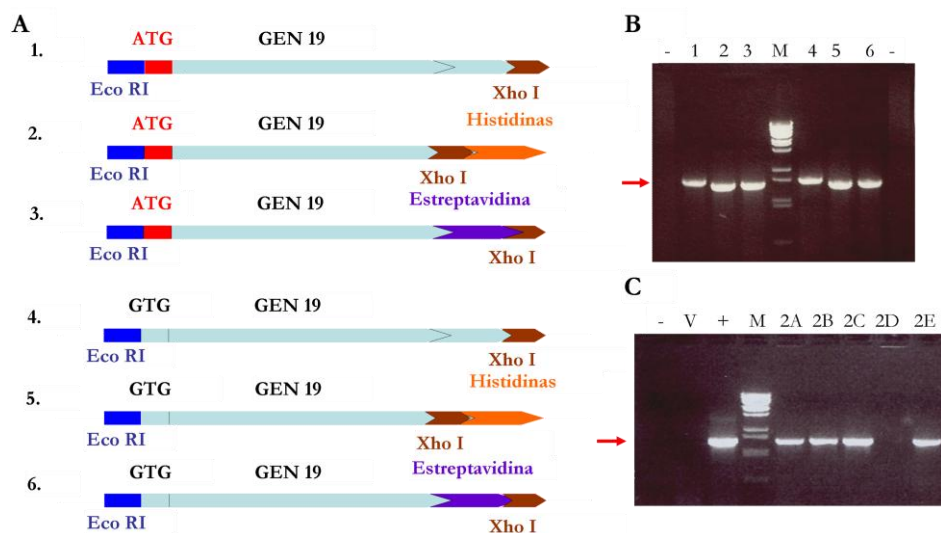


FIGURA R2. Clonaje del gen 19 del bacteriófago T7. A. Esquema de las seis construcciones del gen 19 con los respectivos codones de inicio, las etiquetas y los sitios de restricción utilizados. B. Amplificación mediante PCR de los insertos del apartado A. La flecha roja señala la altura correspondiente a 1.8 kb. Los marcadores de peso molecular están indicados por una M, y el control negativo (sin ADN) de la PCR se indica con “-“. C. Comprobación mediante PCR de la transformación de células supercompetentes con la construcción 2. Los clones analizados se indican con letras. El control negativo de la PCR (en ausencia de molde) está indicado por “-“; como control negativo adicional se utilizó como molde el vector sin inserto, en el pocillo V; en el control positivo “+” el molde empleado era el genoma del fago T7. Los transformantes positivos corresponden a los clones 2A, 2B, 2C y 2E.

R1.3. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA TERMINASA CON HISTIDINAS

Los ensayos de sobreexpresión y purificación fueron iniciados con la construcción 2 (gp19_ATG_His), y los resultados obtenidos permitieron realizar la caracterización estructural y funcional de la terminasa. El resto de construcciones no serán caracterizadas en el presente trabajo.

R1.3.1. Sobreexpresión de la terminasa en E.coli

Se realizaron pruebas de expresión fijando una concentración de inductor lo suficientemente grande (IPTG a 2 mM) como para disparar la inducción y determinar su tiempo óptimo. La figura R3 muestra el seguimiento temporal del crecimiento de las bacterias transformadas con: vector sin inserto (control negativo), vector inducible pRSET-VP2 (control positivo que expresa VP2, una proteína control no relacionada, en grandes cantidades) y vector con gp19 (construcción 2). Se representa el crecimiento bacteriano como medida de la densidad óptica (DO) a 600 nm en función del tiempo (5 horas) en la figura R3A. El comportamiento de las

Resultados

bacterias no inducidas es similar en las tres construcciones (curvas cian, amarilla y verde claro), alcanzándose densidades más altas que en las cepas inducidas correspondientes (curva azul, naranja y verde oscuro respectivamente). La sobreexpresión del inserto provoca retraso en el crecimiento, porque tras la inducción la maquinaria celular se emplea en producir numerosas copias de los plásmidos, comprometiendo su propio crecimiento. Por esta razón la diferencia entre el control negativo inducido y sin inducir (en azul y cian) no es significativa: ninguna proteína está siendo sobreexpresada. En el control positivo las células inducidas retrasan su crecimiento prácticamente desde la primera hora (curva naranja) indicando la producción de VP2. En la construcción 2, además del retraso del crecimiento, la inducción de la gp19 provoca una caída de la DO a las 2 horas post inducción (h.p.i.) que sugiere lisis celular (estrella). La proteína gp19 resulta por tanto citotóxica, sin embargo algunas células resistentes se recuperan y comienzan a duplicarse de nuevo (aumento de la DO a las 3 h.p.i.). El análisis en geles desnaturizantes de la expresión de gp19 (Figura R3B) evidencia la producción de gp19 a partir de las 2 h.p.i., sólo en los cultivos inducidos. Tras la lisis celular la gp19 está presente mayoritariamente en el sobrenadante (flecha roja, SB t2) pero a las 3 h.p.i ya ha sido degradada por las proteasas presentes en el medio (ausencia de banda en SB t3). La gp19 del interior celular deja de aumentar a las 3 h.p.i confirmando que tras la lisis las células no producían nuestra proteína: o bien expulsaron nuestra construcción o bien la dañaron para evitar que sobreexpresara.

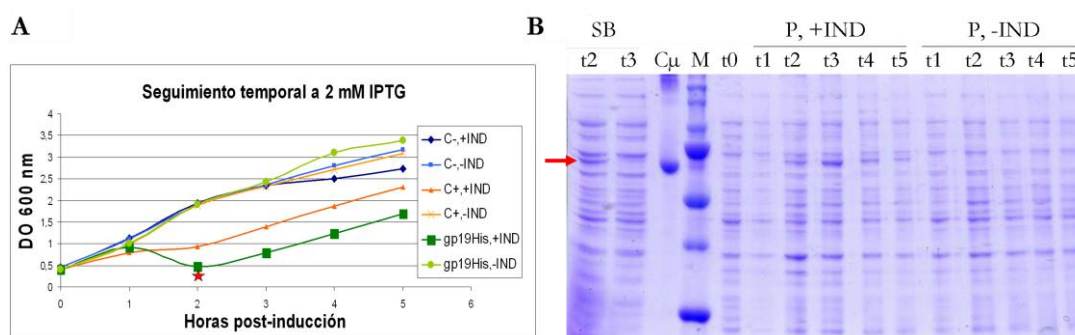


FIGURA R3. Sobreexpresión de la proteína gp19_ATG_His en *E.coli*. A. Representación del crecimiento (DO a 600 nm) de células inducidas y no inducidas conteniendo: vector inducible pRSET-VP2 (control positivo, en amarillo y naranja respectivamente), vector sin inserto (control negativo, en azul oscuro y cian) y vector con gp19_ATG_His (en verde oscuro y claro). La estrella roja señala la caída de la DO debida a la lisis celular como consecuencia de la sobreexpresión de la proteína de estudio. B. Análisis por electroforesis en geles desnaturizantes de las células precipitadas (P) y el medio sobrenadante (SB) de las muestras inducidas (línea verde oscuro) y no inducidas (línea verde claro). La “t” indica la hora a la que se tomaron las alícuotas. Cμ es un control de movilidad de 66 kDa. M son los marcadores de peso molecular. La flecha roja señala la proteína gp19 sobreexpresada en las células inducidas y ausente en los cultivos sin IPTG. La gp19 es liberada al medio tras la lisis celular (SB, t2) y posteriormente degradada por las proteasas presentes en el medio (SB,t3).

Se hicieron ensayos a 0.75 mM de IPTG con idénticos resultados: lisis celular a las 2 h.p.i., y recuperación del cultivo sin expresión de gp19. Esto sugiere que el sistema de inducción tiene un mecanismo de interruptor, donde la detección de

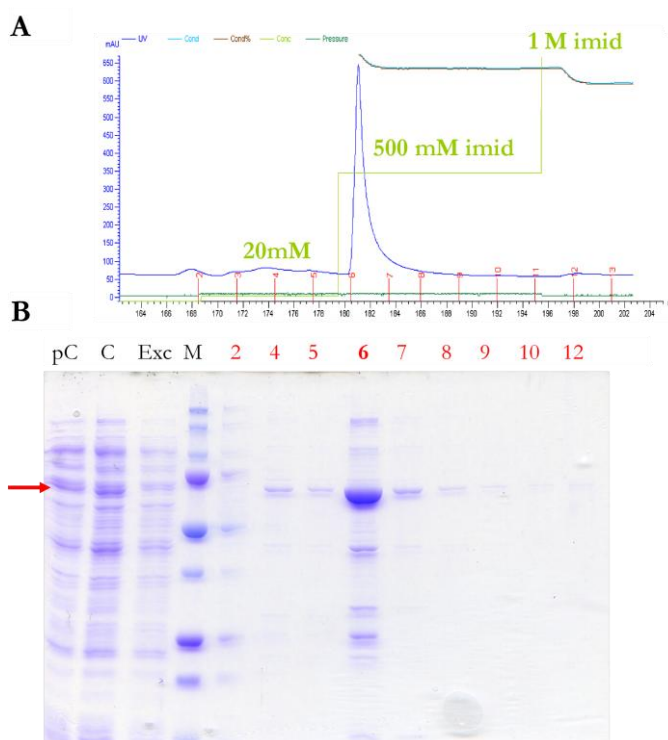
IPTG (a partir de una concentración umbral) dispara la sobreexpresión, y donde la puesta en marcha del sistema no se produce de forma gradual.

Dado que la gp19 aparecía en forma soluble en el sobrenadante, decidimos seguir la purificación partiendo del medio en el momento de la lisis (SB t2 en la figura R3B). Como la cantidad de gp19 soluble en el momento de la lisis era mayor en el ensayo a 2 mM de IPTG que a 0,75 mM, elegimos la primera como concentración óptima de inductor.

R.1.3.2. Purificación de la terminasa

El primer paso de purificación consistía en una cromatografía de afinidad en columna de níquel, que une específicamente las histidinas presentes en el dominio carboxilo de la gp19 (Figura R4). El perfil cromatográfico del gradiente escalonado de imidazol (Figura R4A) muestra un pico de unas 600 mili unidades de absorbancia (mUA) en la fracción 6 que, como comprobamos a continuación, correspondía mayoritariamente a la gp19. En la Figura R4B se muestra el análisis de las fracciones mediante electroforesis en geles desnaturalizantes teñidos con azul de coomassie. La diálisis de la muestra (SB t2) en solución de tampón A (20 mM imidazol, 50 mM tampón sodio fosfato pH 7, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 20% (v/v) glicerol) no sólo la concentra sino que evita la precipitación inherente a la terminasa generando, gracias al glicerol, un efecto de volumen excluido. Comparando los pocillos pC (previo a la diálisis) y C (muestra cargada, tras dializar) se evidencia el incremento de concentración producto de la diálisis (flecha roja sobre la gp19). La ausencia de gp19 en el excluido (pocillo Exc) muestra que ésta se une de manera eficiente a la columna. Finalmente en la fracción 6, correspondiente al pico de absorbancia, encontramos la máxima concentración de gp19 entre otras proteínas celulares. La cromatografía de afinidad nos proporciona fracciones altamente concentradas en gp19 aunque no totalmente puras, siendo necesario un segundo paso de purificación.

FIGURA R4. Purificación de la gp19 con histidinas. A. Cromatografía de afinidad en gradiente escalonado de imidazol. En rojo se indican las fracciones recogidas. El pico de la fracción 6 corresponde a la gp19 mayoritariamente. B. Análisis de las fracciones mediante electroforesis en geles desnaturalizantes. pC es la muestra antes de dializar; C es la muestra cargada; Exc es una alícuota del excluido y M son los marcadores de peso molecular. La flecha roja señala la gp19. En rojo se indican las fracciones analizadas.



Resultados

El segundo paso de purificación consistía en la ultracentrifugación en gradientes de glicerol. La aplicación de velocidades de centrifugación elevadas sobre un gradiente de densidad permite la migración diferencial de la muestra en función de su tamaño y forma general. De esta manera los monómeros o estructuras de menor tamaño quedarán en la parte superior (cercana al borde) del gradiente mientras que estructuras de mayor tamaño (como oligómeros o agregados) entrarán hasta zonas más profundas del gradiente, en función de su tamaño y forma general. Así, además de obtener una muestra considerablemente pura de gp19, podremos separar en fracciones los distintos estados oligoméricos de la terminasa.

La oligomerización de las terminasas ha sido objeto de intenso estudio debido a sus implicaciones funcionales (Hendrix, 1978). Está descrito que la gp19 interacciona con el vértice pentamérico de la precabeza (Morita et al., 1995a; Morita et al., 1995b) a través del conector dodecamérico (Agirrezabala et al., 2005b). La concordancia o no de simetrías entre los componentes de la maquinaria empaquetadora ha aumentado el interés sobre el estado de oligomerización de la gp19, de ahí la importancia de aislarla en su estado oligomérico.

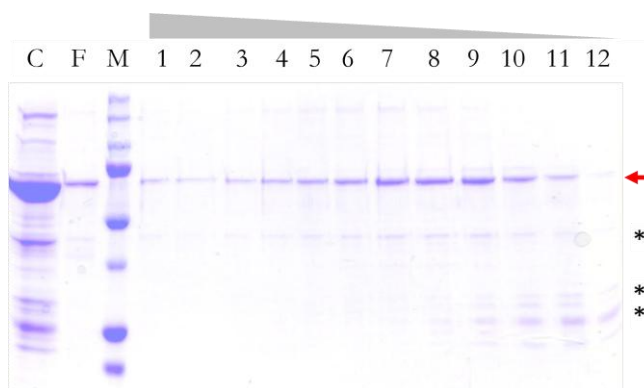


FIGURA R5. Segundo paso de purificación de la gp19 en gradientes de glicerol. Análisis por electroforesis en geles desnaturalizantes del fraccionamiento del gradiente. El fondo del gradiente corresponde al 40% de glicerol, y el tope al 25%, con fracciones del 1 (fondo) al 12 (tope). El pocillo C corresponde a la muestra cargada procedente del primer paso de purificación. El pocillo F corresponde al fondo del gradiente resuspendido, y muestra la proteína precipitada durante la ultracentrifugación. La flecha roja señala la gp19, y los asteriscos proteínas contaminantes.

La mejora en el grado de purificación debida a la centrifugación en gradiente se evidencia mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de las fracciones del gradiente (Figura R5). Una parte de la muestra cargada en el gradiente (pocillo C), aparece precipitada en el fondo del tubo (pocillo F) reflejando la inestabilidad característica de este tipo de proteínas. La gp19 (flecha roja), aunque se concentra en las fracciones centrales (7-9), aparece prácticamente distribuida por todo el gradiente. Esto sugiere la existencia de distintos estados oligoméricos de gp19: monómeros (fracciones 11-12), oligómeros (fracciones 7-10) y grandes agregados (fracciones 1-5, y fondo F), como sugería la visualización al microscopio electrónico. Mediante espectroscopía de masas confirmamos, que la banda mayoritaria corresponde a gp19. Asimismo, se advierte la presencia de proteínas contaminantes con un patrón de migración diferente al de gp19 (asteriscos), que fueron identificadas también mediante espectrometría de masas. Estas correspondían a las

proteínas bacterianas: factor Tu de elongación (42 kDa), formil tetrahidrofolato deformilasa (28-30 kDa) y cis-trans isomerasa (25 kDa). Aunque la concentración y pureza de gp19 obtenidas tras este segundo paso de purificación no podrían considerarse óptimas, resultaron aptas para abordar los ensayos de caracterización.

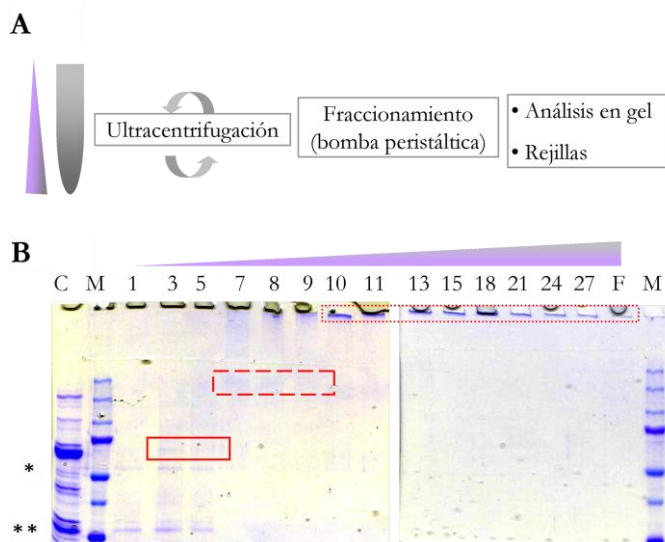


FIGURA R6. A. Esquema del protocolo de GraFix para el análisis estructural de los oligómeros de gp19. B. Análisis por electroforesis en geles SDS-PAGE al 8% del GraFix como segundo paso de purificación y fijación. El fondo del gradiente corresponde al 50% de glicerol y 0'15% de glutaraldehído, y la parte superior al 20% de glicerol y 0'09% de glutaraldehído. Los recuadros en rojo indican los distintos estados oligoméricos de la gp19. En línea continua se observa el monómero de gp19, en línea discontinúa vemos las bandas difusas de los oligómeros y con puntos discontinuos los agregados de gp19 que han quedado en los pocillos. El pocillo C corresponde a la muestra cargada procedente del primer paso de purificación y el pocillo F al fondo del gradiente resuspendido. Los asteriscos señalan proteínas contaminantes.

Las condiciones subóptimas de concentración y pureza de la gp19, unidas a la inestabilidad que presumiblemente afectaría a su oligomerización, nos llevaron a contemplar el uso de GraFix (*Gradient Fixation*, fijación en gradiente) (Kastner et al., 2008) como paso alternativo para la caracterización estructural. Esta técnica consiste en la fijación de la muestra durante la ultracentrifugación en gradientes mixtos de glicerol y glutaraldehído. Aunque en microscopía electrónica históricamente se había utilizado el glutaraldehído como agente fijador para mejorar el contraste de la muestra, éste dejó de emplearse porque podía provocar la aparición de artefactos. Sin embargo existen evidencias experimentales de que las condiciones de fijación muy suaves del método GraFix no sólo reduce la aparición de artefactos sino que estabiliza y aumenta el contraste de macromoléculas individuales (Melero et al., 2012). En la figura R6A se muestra un esquema del protocolo de GraFix aplicado a la proteína de estudio. Los tubos de GraFix se someten a ultracentrifugación (tiempo y velocidad determinados experimentalmente, ver Métodos) y a continuación se fracciona el gradiente con una bomba peristáltica, que garantiza la reproducibilidad. Las fracciones obtenidas se analizan en geles desnaturantes pudiendo observarse las bandas correspondientes a los oligómeros en la parte superior del gel debido a la irreversibilidad del entrecruzamiento. En la figura R6B

se muestra el análisis en gel del GraFix de la gp19. Los análisis previos en gradientes de glicerol (ver figura R5) permitieron la puesta a punto de las condiciones del GraFix. Los monómeros de gp19 aparecen en las fracciones 3 a 5, más cercanas a la parte superior del gradiente (recuadro rojo, la banda corresponde a un tamaño de 67 kDa); los oligómeros (bandas difusas recuadradas en línea discontinua, con un tamaño superior a 250 kDa) comprenden las fracciones 7 a 9, es decir el primer tercio del gradiente; por último los grandes agregados (bandas en los pocillos, recuadradas con puntos y de un tamaño tal que no han podido entrar en el gel) comienzan a aparecer en la fracción 10 hasta el fondo del gradiente (F). Las fracciones óptimas para el análisis mediante microscopía electrónica serán por tanto las 7, 8 y 9, que corresponderían a las fracciones 9 y 10 del gradiente de glicerol (sin glutaraldehído).

Sin embargo, si observamos el gel con detenimiento vemos que además de la correspondiente a la gp19 existen otras bandas: una migra a la altura de 54 kDa (un asterisco) y la otra de 27 kDa (dos asteriscos). La banda de 27 kDa aparece en la carga (pocillo C, figura R6B) y en el gradiente sin glutaraldehído (ver Figura R5, asterisco inferior, pocillos 10 a 12), pero sólo en las fracciones iniciales. Esto sugiere que la proteína no es un producto de la fijación con glutaraldehído, ni es un complejo que pudiéramos confundir con la gp19 oligomérica, ya que su patrón de migración es diferente. Es decir, está ausente en las fracciones centrales del gradiente sin glutaraldehído, y probablemente también en el GraFix, así que no representó ningún problema dadas las fracciones empleadas para microscopía (fracciones 7-9). La banda de 54 kDa, por el contrario, no aparece en la muestra cargada (pocillo C, figura R6B), ni en el gradiente sin glutaraldehído (ver figura R5), ni tampoco cuando cargamos la mitad de volumen de muestra. Esto último deshecha la posibilidad de que se deba a una migración diferencial de la gp19 debida al exceso de volumen de muestra (se recomienda cargar volúmenes inferiores al 5% del volumen del tubo para asegurar que la muestra migra con un frente único). El que esa banda no aparezca en la carga ni en el gradiente sin glutaraldehído sugiere que proviene del proceso de fijación, es decir que pudiera ser un agregado de una proteína de menor tamaño, pero no tiene relevancia en nuestro caso, ya que se escogieron las fracciones 7 a 9 (donde esta banda no aparece).

R2. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ATPASA DE LA TERMINASA OLIGOMÉRICA.

La heterogeneidad conformacional de la gp19, documentada en los primeros estudios bioquímicos (Hamada et al., 1986a; Morita et al., 1994) y reflejada en su distribución en varias fracciones del gradiente de glicerol (ver apartado anterior, figura R5), hacía necesario un análisis funcional para determinar la relevancia de los distintos estados oligoméricos de gp19. Dado que la actividad ATPasa es una propiedad intrínseca de la subunidad mayor de las terminasas virales (Goetzinger y Rao, 2003; Guo et al., 1987; Hwang y Feiss, 1996; Nemecek et al., 2007; Oliveira et al., 2006), y que en el caso de gp19 había sido cuantificada mediante el sistema de

empaquetamiento *in vitro* (Morita et al., 1993), decidimos hacer un ensayo cualitativo utilizando cromatografía en capa fina (TLC) y ATP marcado radiactivamente. Previamente comprobamos que ninguno de los contaminantes detectados (Figura R5, asteriscos) poseía la actividad ATPasa descrita. Como muestra la figura R7, detectamos hidrólisis de ATP (presencia de Pi, producto de hidrólisis) en las fracciones 9, 10 y 11 del gradiente de glicerol. La visualización al microscopio electrónico de las fracciones activas (recuadro rojo) reveló la presencia mayoritaria de anillos de unos 160 Å de diámetro, que corresponderían a la terminasa oligomérica (ver apartado siguiente). La hidrólisis de ATP se detectaba en las fracciones donde gp19 formaba ensamblados de mayor tamaño, pero no en aquellas donde la gp19 se hallaba en estado monomérico (fracción 12) o agregada (fracciones 1 a 5). Estos resultados muestran que la gp19 es capaz de oligomerizar en solución constituyendo complejos en forma de anillo funcionalmente activos.

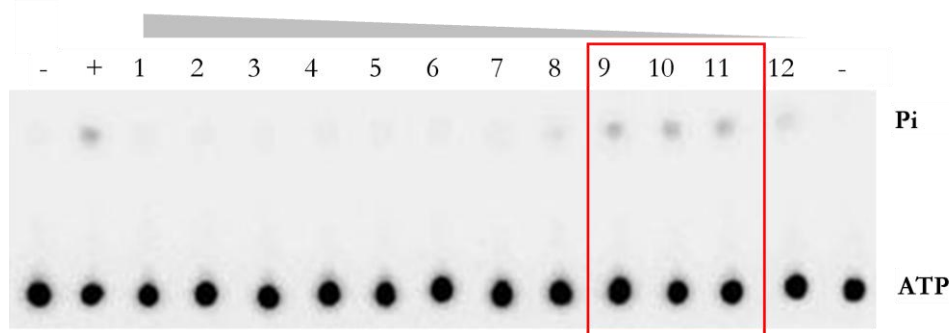


FIGURA R7. Detección de la actividad ATPasa mediante TLC. A. La actividad ATPasa de gp19 es detectada principalmente en las fracciones 9, 10 y 11, correspondientes al oligómero de gp19. Las fracciones están indicadas con números, - control negativo (sin gp19), + actividad de una fracción previamente ensayada de gp19. Los ensayos se realizaron por duplicado.

R3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA TERMINASA OLIGOMÉRICA

R3.1. ANÁLISIS BIDIMENSIONAL DE LAS IMÁGENES MEDIAS: DETERMINACIÓN DEL ESTADO PENTAMÉRICO DE LA GP19

Como hemos comentado en apartados anteriores, conocer la simetría de la terminasa es esencial para comprender el mecanismo de traslocación, porque los distintos modelos de funcionamiento propuestos hasta la fecha sugieren un papel clave del acoplamiento y desacoplamiento de simetrías de los distintos componentes. Hasta este momento sólo se ha determinado de manera directa el estado oligomérico de dos terminasas virales, mostrando ambas forma de anillo. En el caso del fago $\Phi 12$ se obtuvo mediante cristalografía de rayos X la estructura hexamérica de P4 (Mancini et al., 2004), que trasloca ARN monocatenario. El hexámero de P4 tiene unas dimensiones de 95 Å de diámetro, 55 Å de altura y un

canal central de entre 25 y 21 Å. La terminasa del fago T4, gp17, fue cristalizada en forma monomérica, y la estructura del oligómero se obtuvo mediante criomicroscopía electrónica (en adelante criome) a partir de precabezas de virus (Sun et al., 2008). Gp17 forma un pentámero de aproximadamente 160 Å de diámetro y 75 Å de altura, con un canal central de 40 Å de diámetro, apto para traslocar ADN bicatenario. En el caso de gp19 del fago T3, los estudios bioquímicos realizados no han conseguido determinar su estequiometría de forma concluyente (Fujisawa et al., 1991; Morita et al., 1995b; Simpson et al., 2000).

Tras visualizar en el microscopio electrónico las fracciones correspondientes a los oligómeros activos de la terminasa se escogieron las fracciones equivalentes del gradiente GraFix, siendo la fracción 8 la óptima. En la figura R8A un campo mostrado por tinción negativa permite apreciar (flechas) tanto anillos en vista frontal como posibles vistas laterales (alargadas, sin hueco central). El tamaño es consistente con lo que esperaríamos para un pentámero o hexámero de gp19.

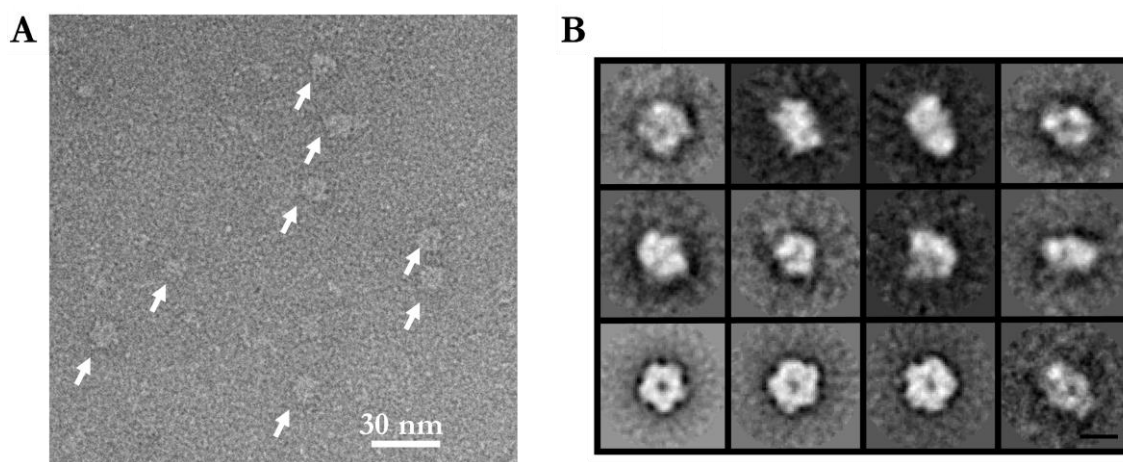


FIGURA R8. Análisis estructural de la terminasa oligomérica obtenida mediante la técnica GraFix. A. Campo mostrado por tinción negativa de la terminasa purificada, las flechas señalan los oligómeros de gp19. B. Imágenes medias de las distintas vistas de la terminasa oligomérica. La barra corresponde a 100 Å.

Las partículas seleccionadas fueron alineadas (rotacional y traslacionalmente) y clasificadas mediante el método de Máxima Probabilidad (*Maximum Likelihood*) (Scheres et al., 2005b). En la figura R8B se muestran las imágenes medias obtenidas, correspondientes a distintas orientaciones de la terminasa oligomérica. Las vistas claramente frontales (en la última fila) presentan un hueco central característico, mientras que el resto de clases corresponderían a vistas más o menos inclinadas del anillo.

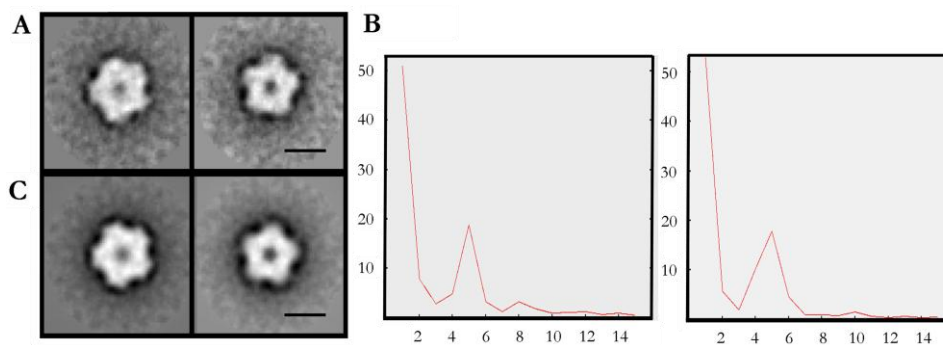


FIGURA R9. Determinación de la simetría de la terminasa oligomérica. A. Imágenes medias de dos vistas frontales de la terminasa obtenidas sin la imposición de ninguna simetría. B. Espectro rotacional de las imágenes medias de las vistas frontales donde se evidencia la simetría c5. C. Imposición de simetría c5 sobre las imágenes medias del apartado A. Las barras corresponden a 100 Å.

Las imágenes medias frontales presentaban una simetría rotacional de orden cinco apreciable a simple vista (Figura R9A). Para estimar objetivamente la existencia de esta simetría realizamos un análisis rotacional de dichas clases confirmando la simetría c5 en todas ellas (Figura R9B). La imposición de simetría cinco a las imágenes medias (Figura R9C) nos permitió resaltar la subestructura y evidenciar la calidad de las mismas. Esto justifica la aplicación de simetría pentamérica durante el proceso de reconstrucción del volumen tridimensional.

R3.2. RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA TERMINASA PENTAMÉRICA

La selección de imágenes medias frontales y laterales permitió la reconstrucción de un primer volumen inicial por el método de líneas comunes, asumiendo simetría 5. Este volumen inicial fue sometido a un proceso de refinamiento iterativo hasta generar el volumen final. En la figura R10A se presenta un esquema del proceso de generación del volumen tridimensional final. La clara similitud entre las proyecciones del volumen y las imágenes medias asignadas a las mismas durante el refinamiento se muestra en la figura R10B, y apoya la calidad del modelo final. El volumen 3D final fue reconstruido a partir de 14097 partículas utilizando técnicas de alineamiento multi-referencial, asignación angular mediante búsqueda de orientaciones (*Projection Matching*), y reconstrucción 3D con algoritmos iterativos (Ludtke et al., 1999; Scheres et al., 2007).

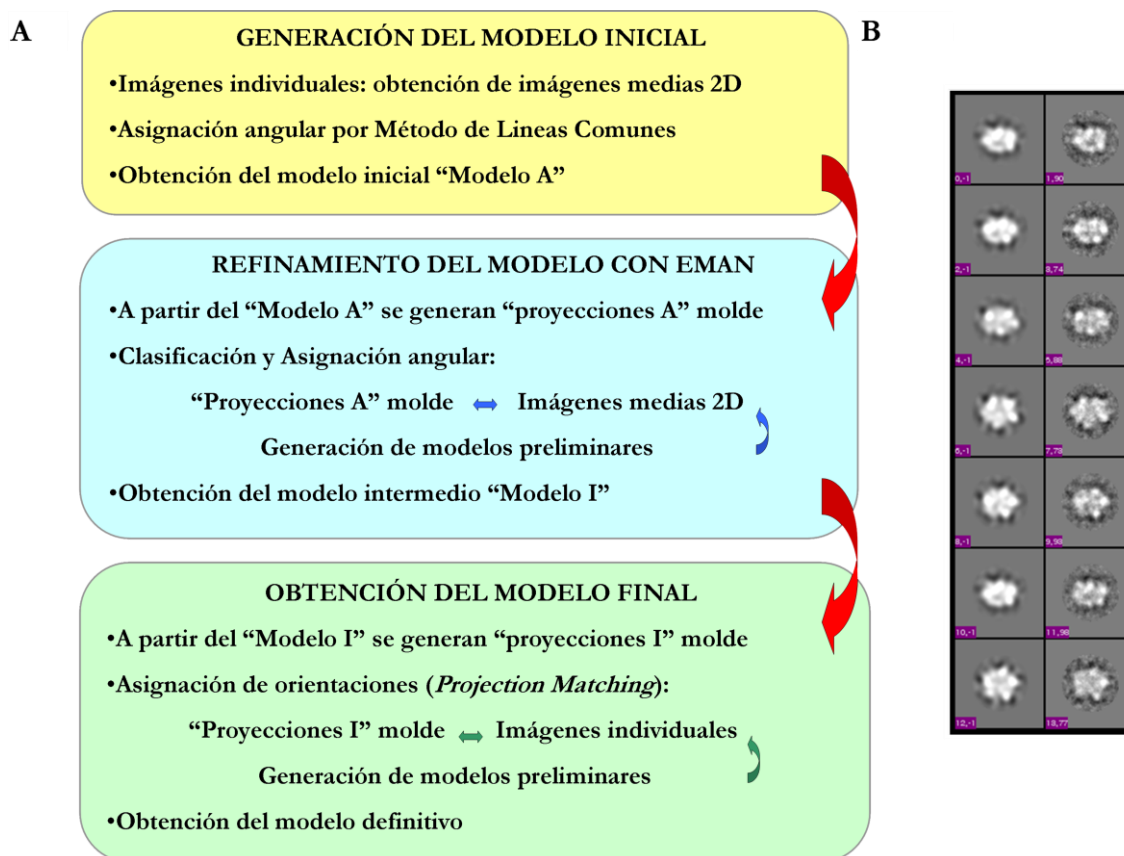
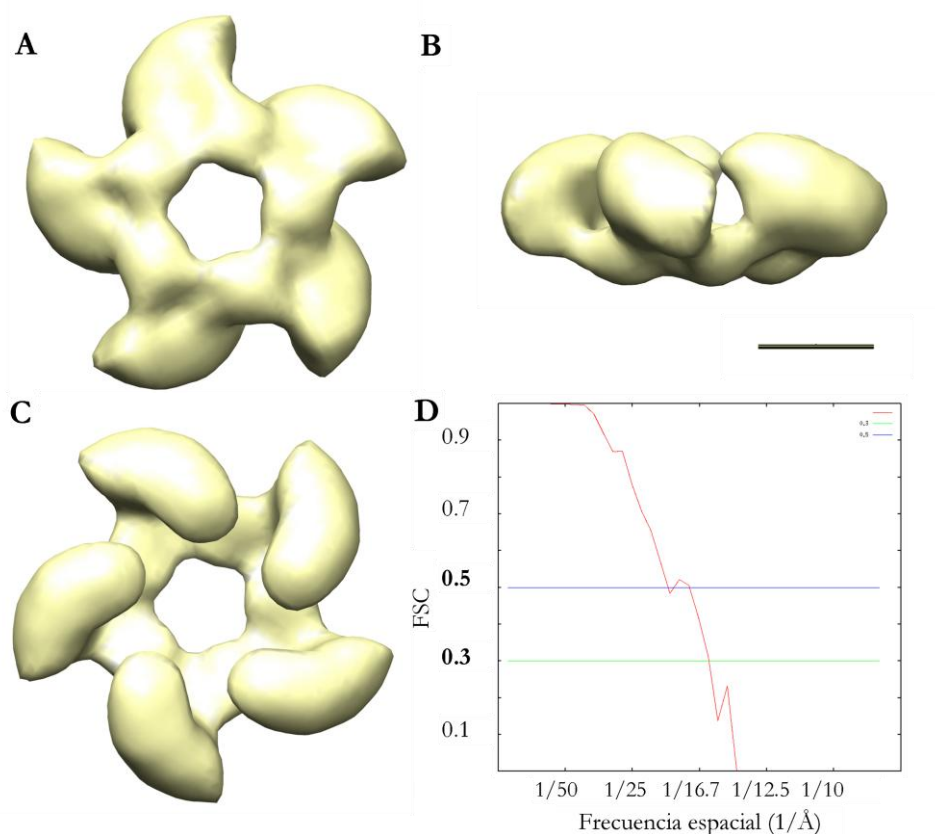


FIGURA R10. A. Esquema general del proceso de obtención del volumen tridimensional. B. Correspondencia entre las proyecciones del modelo tridimensional (columna izquierda) y las imágenes medias experimentales asignadas a las mismas (derecha) durante el refinamiento (bloque azul, apartado A).

El volumen obtenido para la terminasa de T7 presenta una morfología estrellada (Figura R11, A-C), con un diámetro máximo de 162 Å, en la que sobresalen cinco lóbulos alrededor de una canal central de 37 Å de diámetro. Cada uno de estos lóbulos se subdivide en dos dominios de distinto tamaño (Figura R11B, vista lateral). Los lóbulos interactúan de manera continua a través de la región de menor tamaño, siendo la altura total del complejo 65 Å. En la figura R11D se muestra la curva de resolución del volumen final, que corresponde a 16-17.5 Å en base a los criterios de corte de 0.3 y 0.5 respectivamente (ver Métodos).

FIGURA R11 (página siguiente). Reconstrucción tridimensional de la terminasa pentamérica obtenida mediante microscopía electrónica y procesamiento de imagen. A. Vista frontal. B. Vista lateral, giro de 90° del volumen mostrado en A. C. Vista frontal tras girar 180° el volumen en la posición A. La barra corresponde a 50 Å. D. Estimación de la resolución del volumen reconstruido en base al coeficiente de correlación cruzado (FSC) utilizando los criterios 0.3 y 0.5. En la reconstrucción final corresponde a 16-17.5 Å respectivamente.



R3.3. MODELADO DE LA ESTRUCTURA ATÓMICA DEL MONÓMERO Y EL PENTÁMERO DE GP19: LOCALIZACIÓN DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES.

Como sugerían estudios anteriores (Draper y Rao, 2007), el alineamiento de secuencia entre las principales terminasas virales daba, en el mejor de los casos, una identidad de secuencia del 12%, lo que condicionó la generación del modelo atómico mediante homología remota (*threading*) (Jones et al., 1992). La generación del modelo atómico del monómero de gp19 fue realizada por Juan Carlos Sánchez, dentro del grupo de Florencio Pazos en el CNB. El molde empleado fue la estructura cristalográfica de la gp17, terminasa del fago T4, con el que la proteína gp19 comparte un 12% de homología de secuencia. La gp17 tiene 610 aminoácidos (aa) y 70 kDa, mientras que la gp19 es ligeramente inferior en tamaño: 586 aa y 67 kDa. Ambas forman anillos pentaméricos y traslocan ADN bicatenario de distinta longitud (170 kb en T4 y 40 kb en T7). La estructura atómica de la gp17 utilizada como molde tenía deletados los 43 aa del carboxilo terminal y dos mutaciones puntuales en los dominios Walker B y en el carboxilato catalítico. Para la generación del modelo atómico se consideró la coincidencia entre la estructura secundaria predicha para la proteína diana y la estructura secundaria del molde. Asimismo, se priorizó especialmente el alineamiento de residuos funcionales descritos en la literatura (Draper y Rao, 2007), como el Walker A y B, el carboxilato catalítico, el motivo de unión a adenina y el motivo C (de acoplamiento, *Coupling*). El modelo atómico definitivo fue obtenido utilizando el método HHPred (Soding et al., 2005)

basado en la detección de homología y predicción de secuencia mediante modelos ocultos de Markov (HMM). Además fue validado mediante simulaciones de energía.

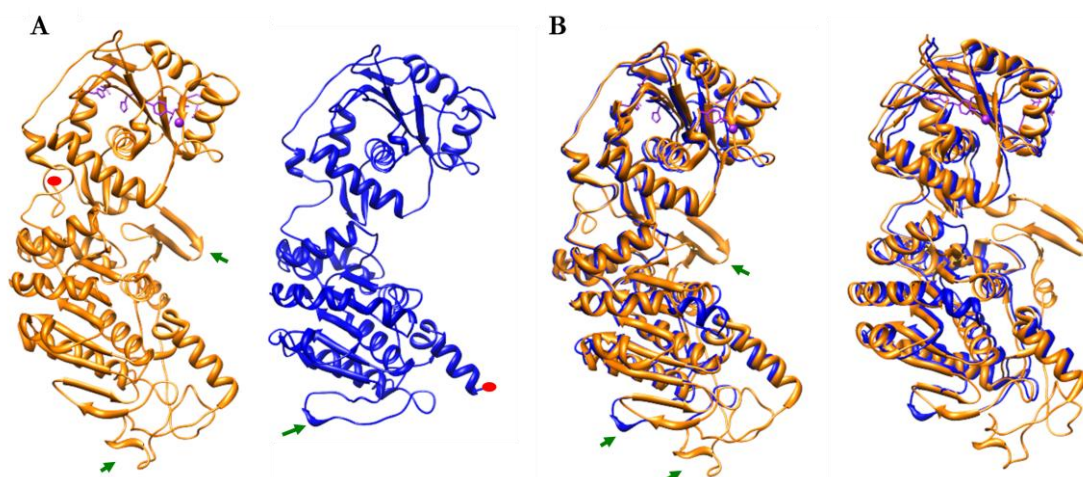


FIGURA R12. Obtención del modelo atómico del monómero de gp19 por homología de plegamiento. A. En naranja se muestra la estructura cristalográfica del monómero de la terminasa mayor (gp17) del fago T4, empleada como molde. El modelo atómico obtenido para el monómero de gp19 aparece en azul. El círculo rojo corresponde al extremo amino. Las flechas verdes señalan las regiones con menor similitud estructural. B. Ajuste de la estructura utilizada como molde (naranja) y el modelo atómico de gp19 (azul) en dos vistas diferentes relacionadas por un giro de 30° en el eje y.

En la figura R12A se muestra la estructura atómica del molde (en naranja, con 552 aa) y el modelo atómico obtenido para gp19 (en azul, con 475 aa). En ambas estructuras se observan dos dominios claramente diferenciados, separados por una región más estrecha. El dominio de mayor tamaño es el amino (parte inferior) y se halla separado por una región bisagra del dominio carboxilo (parte superior). Las diferencias de estructura entre el molde y la gp19 (flechas verdes) se encuentran en la región bisagra y en el dominio amino, así como en la ubicación del primer aminoácido (en rojo). En la figura R12B se muestra el grado de ajuste entre el molde y la gp19 en dos vistas diferentes.

La obtención del modelo atómico pentamérico se realizó simetrizando computacionalmente el monómero mediante el software SITUS (Wriggers et al., 1999). Tanto el monómero como el pentámero se ajustaron manualmente al volumen 3D de microscopía electrónica y se refinaron computacionalmente utilizando el programa CoLoRes del paquete de software SITUS (figura R13). En ninguno de los dos casos hubo necesidad de doblar o separar los dominios. En la figura se muestra la notable precisión del encaje del modelo atómico pentamérico en el mapa de microscopía, que tiene un coeficiente de correlación del 0,79. Además, se obtuvieron los índices de correlación a distintos valores umbrales utilizando los ajustes volumétrico y laplaciano, que permitieron asignar sin ambigüedades la mano del mapa de microscopía.

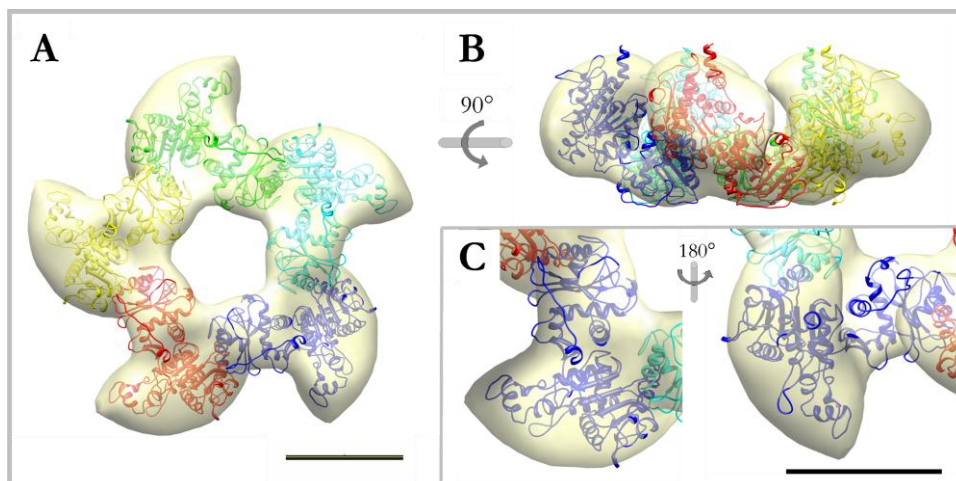


FIGURA R13. Ajuste del modelo atómico del pentámero de gp19 (cada monómero se representa en un color) en la estructura a 16 Å de resolución de la terminasa obtenida mediante microscopía electrónica y procesamiento de imagen (en amarillo transparente). A. Vista frontal, con los dominios carboxilo hacia arriba. B. Vista lateral. C. Detalle del encaje de uno de los monómeros en dos vistas diferentes. La barra corresponde a 50 Å.

Como muestra la figura, cada uno de los lóbulos del mapa de microscopía corresponde a un monómero de gp19 (Figura R13, A y C). El dominio mayor y el menor en los que se subdivide cada lóbulo corresponden al dominio amino y al carboxilo respectivamente (Figura R13B). La región bisagra constituye el estrechamiento entre dominios de cada lóbulo. En la vista frontal del ajuste (Figura R13A) se aprecia un volumen sin rellenar entre los dominios carboxilos adyacentes. Dado que el modelo atómico de gp19 tiene delecionados 110 aa del dominio carboxilo, sería factible que este volumen sea la región donde se acomoda el péptido delecionado. Por tanto, la bondad del ajuste sustenta la consistencia de nuestro volumen 3D, ya que coincide con la conformación tensa descrita en gp17 sin necesidad de alterar la posición relativa de los dominios.

A continuación procedimos a localizar las regiones catalíticas descritas en estudios anteriores (Draper y Rao, 2007; Morita et al., 1994; Morita et al., 1995b) en los modelos atómicos monomérico y pentamérico de gp19 (Figura R14). Como en el resto de terminasas mayores (Goetzinger y Rao, 2003; Guo et al., 1987; Hwang y Feiss, 1996; Nemecek et al., 2007; Oliveira et al., 2006) el centro de actividad ATPasa se sitúa en la gp 19 en su dominio amino (Morita et al., 1993) que comprende los residuos 1 al 229. La región bisagra (residuos 230 al 305) une el dominio amino con el carboxilo, que presenta actividad nucleasa y abarca los residuos 306 al 476. La región ATPasa comprende los dominios Walker A y B, motivo de unión a adenina y motivo C; característicos de proteínas que unen e hidrolizan ATP (Hanson y Whiteheart, 2005). Las regiones catalíticas señaladas en el monómero (Figura R14A) se detallan en la tabla R1, con su secuencia aminoacídica y estructura secundaria correspondiente. Los resultados obtenidos para la gp19 de T3 por mutagénesis dirigida confirmaban la implicación, en la hidrólisis de ATP y en la traslocación del ADN, de residuos localizados en las regiones propuestas. En el grupo de Hisao Fujisawa se analizaron las siguientes mutaciones: G61D, que afectaba a la interacción con ATP y se localizaba en el motivo Walker A; la H344D,

afectaba a la interacción con la precabeza y se incluía en la región nucleasa propuesta para gp19; G367D, G369D y G424E, mutantes defectivos en el procesamiento del ADN concatémico, y se hayan asimismo incluidos en la región nucleasa; y por último, el mutante H347K, defectivo en la iniciación del empaquetamiento y ubicado en la región nucleasa (Morita et al., 1994). Por tanto la localización de esas regiones en la estructura pentamérica (Figura R14B) está estrechamente vinculada con la función que realizan.

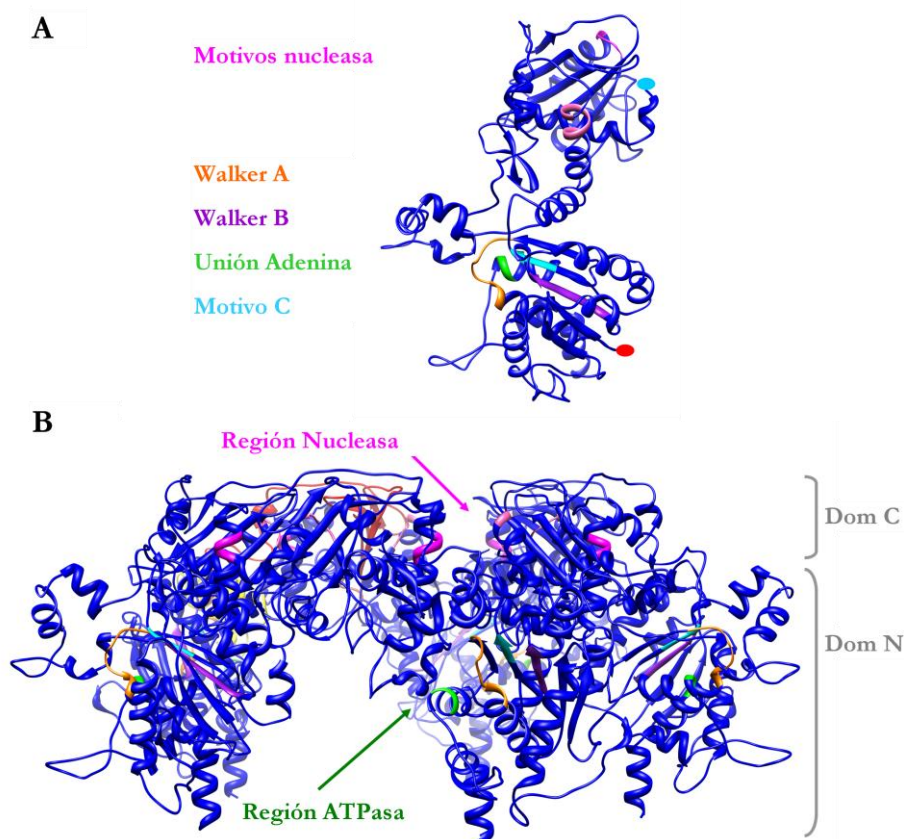


FIGURA R14. Localización de los dominios funcionales en el modelo atómico de gp19. A. Los dominios nucleasa (rosa), Walker A (naranja), Walker B (púrpura), unión a adenina (verde) y motivo C (cian) se resaltan en el modelo atómico del monómero. Los círculos rojo y azul corresponden a los extremos amino y carboxilo respectivamente. B. Ubicación de los dominios funcionales en el modelo atómico del pentámero siguiendo el mismo código de colores. La región ATPasa señalada en verde comprende los dominios Walker A y B, unión a adenina y motivo C; y se localiza en el dominio amino. La región nucleasa figura en rosa y se encuentra en el dominio carboxilo.

Sin embargo, para entender el acoplamiento entre la hidrólisis de ATP y el desplazamiento de ADN que realiza la terminasa, es necesario conocer cómo interacciona ésta con el resto de los componentes. De hecho, el funcionamiento coordinado de la terminasa con el conector, en el contexto de la precabeza y a través de la interacción con el ADN, introduce una serie de restricciones esenciales en el mecanismo de traslocación (Morita et al., 1994; Morita et al., 1995a).

TABLA R1. Motivos catalíticos de gp19: secuencia, localización y estructura secundaria

# aa	Dominios	Región catalítica	# aa	Secuencia	Estructura Secundaria
1-229	ATPasa	Walker A	58-65	AFRGIGKS	bucle entre hélice α y lámina β
		Walker B	155-160	IIIADD	lámina β
		Unión a Adenina	38-39	CQ	bucle seguido de hélice α
		Motivo C	198-200	LGT	lámina β
230-305	Bisagra		255-263	ALAGTPIDP	hélice α
			257-259	AGT	hélice α
306-476	Nucleasa	Ligandos metal	359-364	KILVID	hélice α y bucle
			417-420	VVYE	hélice α

R4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO PORTAL: TERMINASA/CONECTOR

Aunque la implicación de la terminasa gp19 en la traslocación del ADN fue descrita a finales de los años ochenta (Shibata et al., 1987b) no fue hasta varios años más tarde que se identificaron sus dominios de interacción con la precabeza (Morita et al., 1995a; Morita et al., 1995b). Diez años después fueron determinadas por criome las estructuras de la precabeza de T7 a 17 Å de resolución (Agirrezabala et al., 2005a) y del conector a 8 Å de resolución (Agirrezabala et al., 2005b), revelando la orientación del conector en el interior de la precabeza. Estos estudios nos permitieron analizar las posibilidades de ensamblaje de la terminasa en la precabeza, y obtener la estructura del complejo portal, formado por la terminasa y el conector.

La presencia de un core interno dentro de la precabeza de T7 (Agirrezabala et al., 2005a; Serwer, 1976) interaccionando con el conector, y la localización de ambos en uno de los vértices (determinada mediante análisis rotacional y ajuste de su estructura) sugerían fuertemente el lugar de interacción de la gp19 (Agirrezabala et al., 2005a). Además, éste vértice presentaba una diferencia de densidad intrínseca respecto al resto de pentámeros del icosaedro, que confirmaba su especificidad. Por último, la ubicación de la terminasa en ese vértice pentamérico había sido descrita en los fagos Φ 12 y T4 (de Haas et al., 1999; Sun et al., 2008). Por tanto, la gp19 se ensamblaría temporalmente en la cavidad pentamérica de la precabeza de T7, que presenta un diámetro de 95-100 Å y una altura de 40-45 Å, para realizar su función. Dadas las dimensiones de la terminasa sería esperable que ésta quedara parcialmente fuera de la procápsida. Existen por tanto dos posibles orientaciones para el ensamblaje de la gp19 en la precabeza, asumiendo que el canal de la terminasa esté alineado con el canal del conector. Estudios previos realizados con gp19 identificaban las regiones de interacción con la precabeza en el dominio carboxilo (Morita et al., 1995b), sin embargo las regiones de unión (L571-D576) o de estabilización de la unión (residuos D577 a W586) se hayan ausentes en nuestro modelo atómico, por lo que es necesario determinar cómo se produce la interacción en T7. Por otra parte, el modelo de interacción con la precabeza propuesto para la terminasa gp17 del fago T4 sugiere que ésta se une a través del dominio amino (Hegde et al., 2012) aunque ensayos previos localizaban la interacción de la terminasa con el conector en el dominio carboxilo de gp17 (Dixit et al., 2011; Lin et

al., 1999). Es necesario, por tanto, un análisis más exhaustivo para clarificar el ensamblaje de los distintos componentes de la maquinaria empaquetadora. Con este fin abordamos la caracterización estructural de complejo terminasa/conector.

R4.1. PURIFICACIÓN DEL COMPLEJO PORTAL

Los conectores fueron clonados por Rosa Pérez-Luque, del grupo de Miquel Coll, y purificados por Sonia Moreno, introduciendo ligeras modificaciones en el protocolo original (Cerritelli y Studier, 1996). El conector de T7 se componía de doce subunidades de la proteína gp8 (59 kDa), presentando un peso molecular total de unos 708 kDa. Dada la inestabilidad de la terminasa y lo transitorio del complejo terminasa/conector (*in vivo* y presumiblemente *in vitro*) abordamos la purificación del complejo gp19/gp8 mediante la técnica GraFix.

Incubamos cantidades equimolares del pentámero de gp19 y el dodecámero de gp8 en presencia de ATP e iones magnesio que favorecieran la formación del complejo (Hamada et al., 1986a), además de conector solo y un duplicado del complejo (para un gradiente sin glutaraldehído) como controles. La figura R15 muestra el análisis en gel de los tres gradientes. El conector solo (Figura R15A, flecha gris) está presente como monómero entre las fracciones 1 y 5 (recuadro negro). Aparecen bandas de menor intensidad por encima del marcador de mayor peso molecular (250 kDa), entre las fracciones 3 y 5, que podrían corresponder al complejo dodecamérico; y bandas en la interfase del gel, entre las fracciones 3 y 6, que corresponderían a agregados aún más grandes (por ejemplo, dos conectores juntos). Dado que las bandas de elevado peso molecular corresponden a complejos fijados (recuadro discontinuo), la determinación de su masa relativa en función de su movilidad electroforética es orientativa. Por último, la presencia de bandas en el pocillo refleja grandes agregados, entre las fracciones 6 y 11, probablemente debidos a la acción inespecífica del agente fijador (recuadro punteado). En la figura R15B se muestra el gel correspondiente al GraFix del complejo terminasa/conector (carga, pocillo TC). Entre las fracciones 1 y 6 (recuadro verde) se aprecia el monómero de gp8 (flecha gris), mientras que la banda correspondiente a la gp19 monomérica (flecha roja) aparece muy poco intensa entre las fracciones 1 y 3. Entre las fracciones 1 y 6 aparecen también bandas de mayor peso molecular, con la máxima intensidad entre la fracción 3 y la 5 (recuadro discontinuo). En las fracciones 5 y 6 hay una banda adicional de tamaño ligeramente inferior. Cualquiera de las dos bandas presentes en la fracción 5 podría corresponder a los complejos terminasa/conector, ya que no aparecen en el gel del conector solo (Figura R15A) y que, como veremos a continuación, contienen ambas proteínas. Desde la fracción 5 hasta el fondo del tubo encontramos proteína en los pocillos, es decir, grandes agregados (recuadro punteado). Las fracciones correspondientes al gradiente del complejo gp19/gp8 sin agente fijador se muestran en la figura R15C (carga en pocillo TC). Estas muestras no fueron sometidas a entrecruzamiento y sí fueron hervidas, por lo que las bandas de proteínas migran de acuerdo a su forma monomérica, y es su migración hacia el fondo del gradiente lo que indica la constitución de estructuras de mayor tamaño (oligómeros o complejos). El conector

(flecha gris) está presente de las fracciones 1 a 6, con un pico claro en la fracción 3. La terminasa (flecha roja) aparece en las fracciones 1 a 7, pero su máxima concentración corresponde a la fracción 5. También parece haber gp19 precipitada al final del tubo (pocillo F). Así, gp19 y gp8 comigran entre las fracciones 1 y 6, pero es en las fracciones 5 y 6 donde aparecen en una proporción similar (recuadro verde). Precisamente en estas fracciones aparecían bandas de elevado peso molecular, que tentativamente asignábamos a complejos terminasa/conector, en el gradiente con glutaraldehído. Por tanto, la fracción 5 fue elegida para el análisis por ME porque la presencia de ambas proteínas podría ser compatible con la presencia de complejos gp19/gp8.

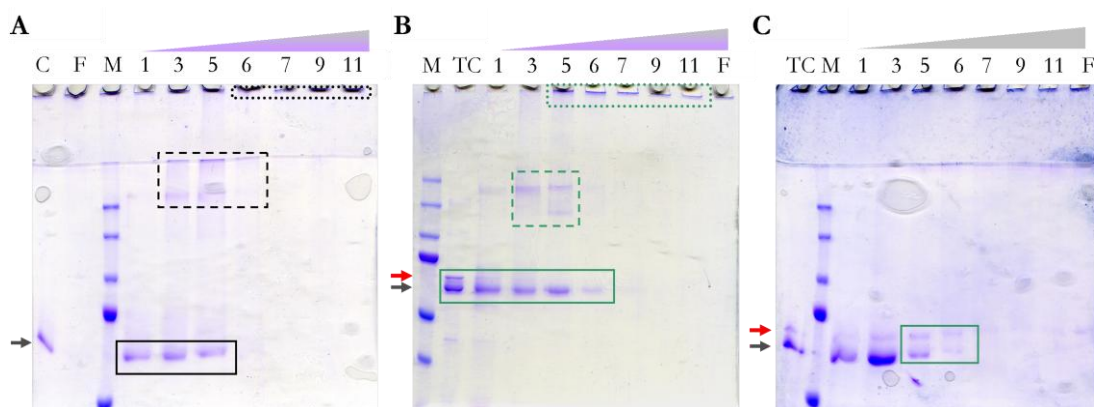


FIGURA R15. Purificación del complejo terminasa/conector mediante GraFix. A. Análisis mediante geles SDS-PAGE al 8% del GraFix del conector (flecha gris y pocillo C) utilizado como control negativo. Los recuadros indican los distintos estados oligoméricos del conector. En línea continua se observa el monómero de gp8, en línea discontinua vemos las bandas correspondientes a la gp8 oligomerizada y con puntos discontinuos los agregados de gp8 que han quedado en los pocillos. B. Análisis del GraFix del complejo terminasa/conector (pocillo TC, flechas roja y gris respectivamente). En línea verde continua se encuadran los monómeros de gp19 y gp8, en discontinua vemos las bandas correspondientes a los posibles complejos y con puntos discontinuos los agregados. C. Análisis del gradiente sin glutaraldehído del complejo terminasa/conector. La gp19 y la gp8 migran ambas entre las fracciones 1 y 6, el recuadro verde corresponde a los posibles complejos gp19/gp8. M, marcadores de peso molecular; F, fondo resuspendido del gradiente.

R4.2. OBTENCIÓN DEL MODELO TRIDIMENSIONAL DEL COMPLEJO PORTAL

El análisis por ME del complejo portal mostraba unas proyecciones en forma de anillo (Figura R16A, izquierda) muy similares en dimensiones al conector aislado resuelto a 8 Å de resolución (Agirrezabala et al., 2005b) mediante criome. Otras vistas mostraban una estructura alargada que podría interpretarse como vista lateral del complejo debido a que su tamaño (210-240 Å) correspondía aproximadamente a las alturas sumadas del conector y la terminasa (177 y 65 Å, respectivamente). La reconstrucción tridimensional del complejo revelaba una estructura en forma de barril, con dos vistas distintas, una circular frontal (con clara simetría 12), y una vista lateral alargada. La correlación entre las proyecciones del modelo reconstruido del complejo (Figura R16A, centro) y las imágenes medias experimentales (Figura

R16A, derecha) es más que aceptable. Las vistas laterales revelaban la presencia de dos dominios diferentes (uno mayor que el otro) separados por una constricción (Figura R16A, flechas). Teniendo en cuenta que la masa del conector dodecamérico es casi dos veces mayor que la de la terminasa oligomérica (700 y 335 kDa, respectivamente) y que el análisis de simetría rotacional mostraba una clara simetría 12 en el dominio mayor y 5 en el menor, es posible correlacionar el dominio mayor con el conector, mientras que el pequeño correspondería a la terminasa. La figura R16B presenta la reconstrucción tridimensional del complejo portal obtenido a partir de 11650 partículas a una resolución final de 30 Å. En el modelo se distinguen dos dominios con diferentes simetrías rotacionales conectados a través de un canal central. El complejo entero tiene 220 Å de altura y un diámetro máximo de 190 Å en el dominio con simetría 12 y 165 Å en el de simetría 5. La anchura del canal varía entre 55 Å en el dominio dodecamérico y 30-35 Å en el pentamérico. El dominio con simetría 12 presenta unas protuberancias que recuerdan a las alas del conector, mientras que el otro dominio muestra cinco lóbulos con cierta vorticidad alrededor del canal. A pesar de que las morfologías generales, tamaños y simetrías de los dos dominios del complejo sugieren la posición del conector y la terminasa, decidimos combinar la estructura de la terminasa con la reconstrucción 3D del conector aislado para validar la topología del complejo.

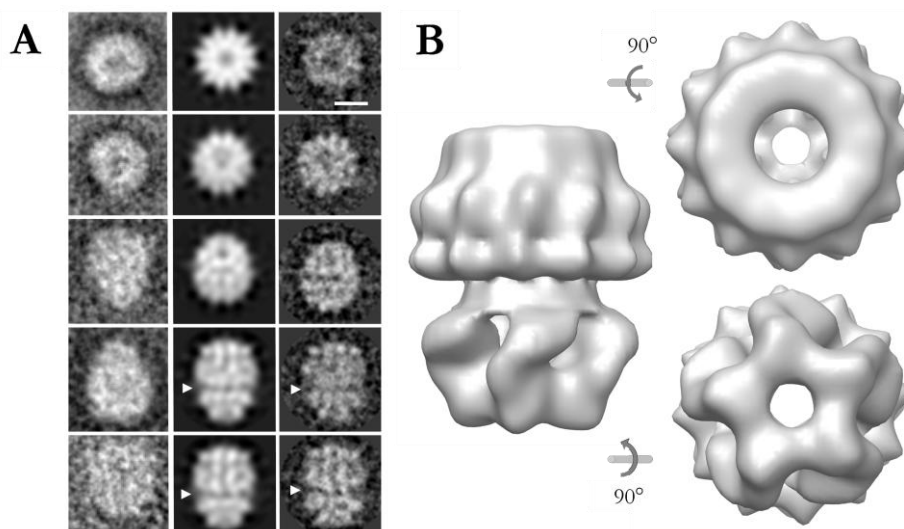


FIGURA R16. Obtención del modelo tridimensional del complejo gp19/gp8. A. Imágenes medias bidimensionales (izquierda), correspondencia entre las proyecciones del modelo tridimensional (centro) y las imágenes medias experimentales asignadas a las mismas (derecha) durante el refinamiento del volumen. La flecha señala la interfase propuesta entre los dos dominios del complejo. La barra corresponde a 100 Å. B. Reconstrucción tridimensional del complejo gp19/gp8 en tres orientaciones distintas mostrando la morfología diferente de ambos dominios. La barra corresponde a 50 Å.

R4.3. TOPOLOGÍA DEL COMPLEJO PORTAL Y ENCAJE DEL MODELO ATÓMICO DE LA TERMINASA PENTAMÉRICA EN EL COMPLEJO

Para asignar la posición del conector dentro del complejo portal, conectores purificados fueron sometidos al mismo procedimiento de preparación, tinción y microscopía que el complejo. El análisis por ME de la muestra de conector se presenta en la figura R17A. En las imágenes medias bidimensionales (Figura R17A, arriba) se aprecia la forma trapezoidal con un canal conspicuo central (región oscura en las vistas laterales) y rodeado de 12 subunidades (vista frontal). La reconstrucción 3D del conector a partir de estas imágenes se llevó a cabo con 17382 partículas a una resolución final de 20 Å, y muestra una buena correlación entre las proyecciones del modelo 3D (Figura R17A, centro) y las medias experimentales del modelo (Figura R17A, abajo). Estas imágenes medias son muy similares a las obtenidas a partir de criome del conector de T7, y son también similares a otros conectores virales (Orlova et al., 1999; Trus et al., 2004; Valpuesta et al., 2000). La única diferencia es la ausencia de corona en nuestra reconstrucción respecto al modelo previo de criome, un efecto que también se ha descrito en el caso del conector de SPP1 (Orlova et al., 1999; Orlova et al., 2003). La vista frontal del conector reconstruido es notablemente similar a su contraparte en el complejo portal, y la forma general en vista lateral recuerda asimismo el dominio mayor dodecamérico de la correspondiente vista del complejo portal, apoyando la localización genuina del conector en el complejo.

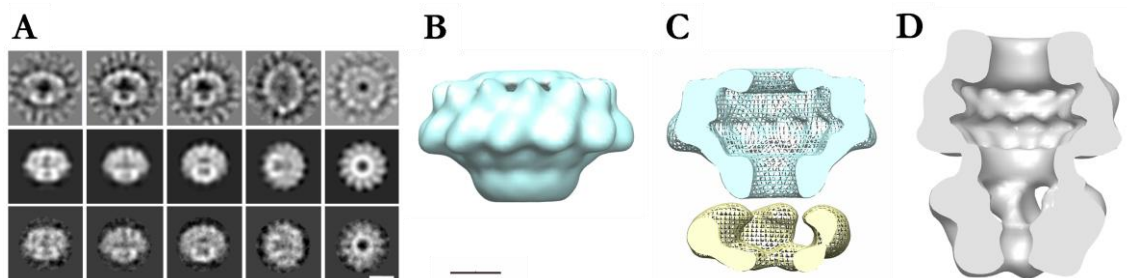


FIGURA R17. Topología del complejo gp19/gp8. A. Análisis por tinción negativa ME del conector purificado: medias bidimensionales (arriba), proyecciones del modelo tridimensional (centro) y las imágenes medias experimentales asignadas a las mismas (abajo). La barra corresponde a 100 Å. B. Vista lateral de la reconstrucción tridimensional del conector. C. Corte transversal de los volúmenes del conector (en cian) y la terminasa (en amarillo) formando un canal continuo. D. Corte transversal del volumen del complejo. La barra corresponde a 50 Å.

La obtención (mediante el mismo procedimiento) de las reconstrucciones 3D del conector gp8, de la terminasa gp19 y del complejo portal gp19/gp8, hizo posible identificar cada uno de los componentes en el complejo. La figura R17 muestra una vista lateral del conector (Figura R17B), del conector y la terminasa colocados uno sobre el otro para simular un canal central abierto y continuo (Figura R17C) y el complejo gp19/gp8 orientado de la misma manera (Figura R17D). Considerando la estructura interna del canal y la forma general, el conector gp8 forma la parte superior del complejo, mientras que la región de simetría 5 correspondería a la

terminasa. La presencia de cinco lóbulos y la morfología estrellada sustentan la correspondencia entre la terminasa (Figura R17C, en amarillo) y la parte inferior del complejo portal (Figura R17D).

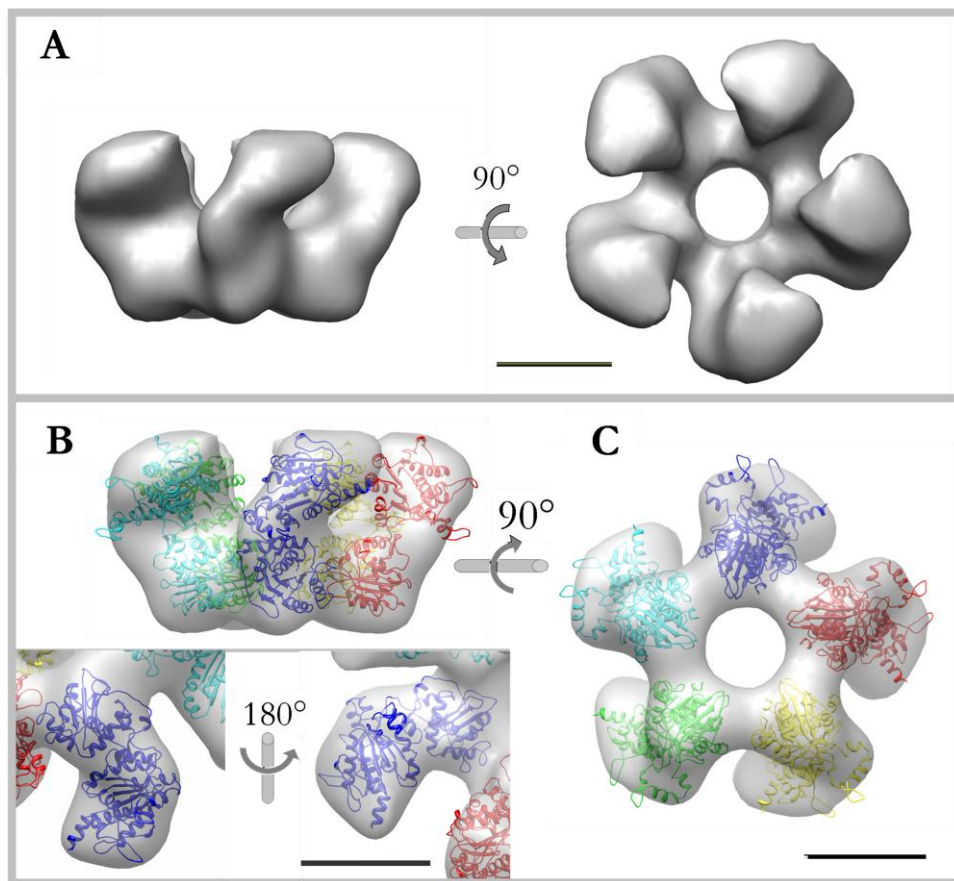


FIGURA R18. Segmentación del volumen de la terminasa a partir del complejo y ajuste del modelo atómico. A. Representación en superficie de la terminasa segmentada del complejo gp19/gp8 en dos vistas diferentes. B. Ajuste del modelo atómico de gp19 (cada monómero se muestra en un color) en el volumen segmentado de la terminasa (en gris transparente) en vista lateral (arriba) y detalle del encaje del monómero en dos vistas distintas (abajo, izquierda y derecha). C. Vista frontal del ajuste del pentámero. La barra corresponde a 50 Å.

Además de las semejanzas generales entre el conector aislado y la terminasa con sus correspondientes dominios en el complejo portal, existen importantes diferencias. La desaparición de la corona en el conector aislado era visible en el complejo, pudiendo sugerir una importante variabilidad conformacional en esta región, y la interfase entre los dominios conector y terminasa revelaba algunas diferencias estructurales inducidas por la interacción. Además existen diferencias obvias en la disposición de las subunidades de la terminasa aislada y la estructura del dominio terminasa en el complejo portal (Figura R17, C y D). Esta observación podría indicar la existencia de diferentes estados conformacionales en gp19, como se propuso para otras ATPasas empaquetadoras (Draper y Rao, 2007; Mancini et al., 2004; Sun et al., 2008; Sun et al., 2007). Para estudiar más detenidamente esta posibilidad, decidimos segmentar el dominio terminasa del complejo portal (Figura R18A). La terminasa segmentada presenta una morfología estrellada con un

diámetro máximo de 158 Å, alrededor de un canal de 35 Å de diámetro del que sobresalen 5 lóbulos de 86 Å de altura. Los lóbulos adyacentes están unidos a través de la región situada en el extremo opuesto a la interacción con el conector. La comparación entre la terminasa aislada y la unida al conector mostraba un cambio significativo en la conformación de los lóbulos, que condicionaba el estrechamiento del canal y la mayor altura de la terminasa segmentada del complejo respecto a la aislada (ver también Figura R17, C y D). Para entender en términos moleculares este cambio conformacional, decidimos encajar el modelo atómico de la terminasa en el volumen de gp19 segmentada del complejo (Figura R18, B y C). El encaje anterior en el volumen de la terminasa aislada, y la llamativa similitud de las vistas longitudinales de ambos modelos (Figuras R18B y R13B; ver también las figuras R18C y R13A) sugerían la orientación del modelo atómico de la gp19 en el volumen de terminasa segmentado del complejo. La bondad del ajuste de los modelos monomérico y pentamérico es considerable (Figura R18B), a excepción de los dominios que conectaban los lóbulos de monómeros adyacentes (Figura R18C). Estas áreas posiblemente correspondan a los 110 aa de gp19 que no estaban presentes en nuestro modelo atómico (debido a la correspondiente ausencia en el molde), igual que sucedía en el ajuste sobre el volumen de la terminasa aislada. A pesar de este cambio considerable en la forma general de las dos conformaciones de terminasa, el ajuste fue obtenido sin imposición de ningún cambio de estructura intra-monomérica.

R4.4. CAMBIOS EN LA TOPOLOGÍA DE OLIGOMERIZACIÓN DE LA TERMINASA POR LA INTERACCIÓN CON EL CONECTOR

La comparación de las dos conformaciones de terminasa revelaba diferencias que podrían estar implicadas en el funcionamiento de la terminasa durante la traslocación del ADN. La terminasa unida al conector es unos 20 Å más alta que la terminasa aislada (Figura R19A), y la forma del canal cambia dramáticamente siendo mucho más estrecha en la terminasa unida al conector (ver también figura R17, C y D). El ajuste del monómero de gp19 en ambas estructuras muestra que es posible pasar de la estructura de la terminasa aislada (Figura R19B, izquierda) a la de la terminasa en el complejo (Figura R19B derecha), mediante una rotación del monómero rígido de gp19 hacia fuera y hacia arriba. La topología del monómero en el complejo dispone sus dos dominios casi paralelos al eje longitudinal del complejo, restringiendo el área de interacción de la terminasa con el conector al dominio amino de ésta, como se propuso recientemente para la terminasa del fago T4 (Hegde et al., 2012). La diferente topología de los monómeros de gp19 en ambas estructuras da lugar a superficies electrostáticas distintas en el canal, así como diferencias en la localización de las regiones catalíticas de gp19 (Figura R20). El potencial coulombico de superficie de la terminasa aislada es predominantemente electropositivo, con bandas de cargas negativas cerca de la entrada del canal (Figura R20A, izquierda). El potencial de superficie electrostático en la terminasa del complejo muestra una agrupación más conspicua de cargas negativas en la entrada del canal (dominio carboxilo de la gp19), seguida de bandas de cargas positivas y

negativas tapizando el resto del canal (Figura R20, derecha). La presencia de canales principalmente electropositivos es una característica común no sólo de conectores virales sino de otras proteínas implicadas en la traslocación de ADN (Cuervo y Carrascosa, 2012b). La existencia en ambas conformaciones de una banda diagonal de cargas positivas hacia el dominio amino y otra agrupación de cargas positivas en el borde superior de éste recuerda a los anillos de lisina de las paredes del canal del conector de $\Phi 29$ (Guasch et al., 2002) y podrían interpretarse como una característica común relacionada con la interacción con ácidos nucleicos.

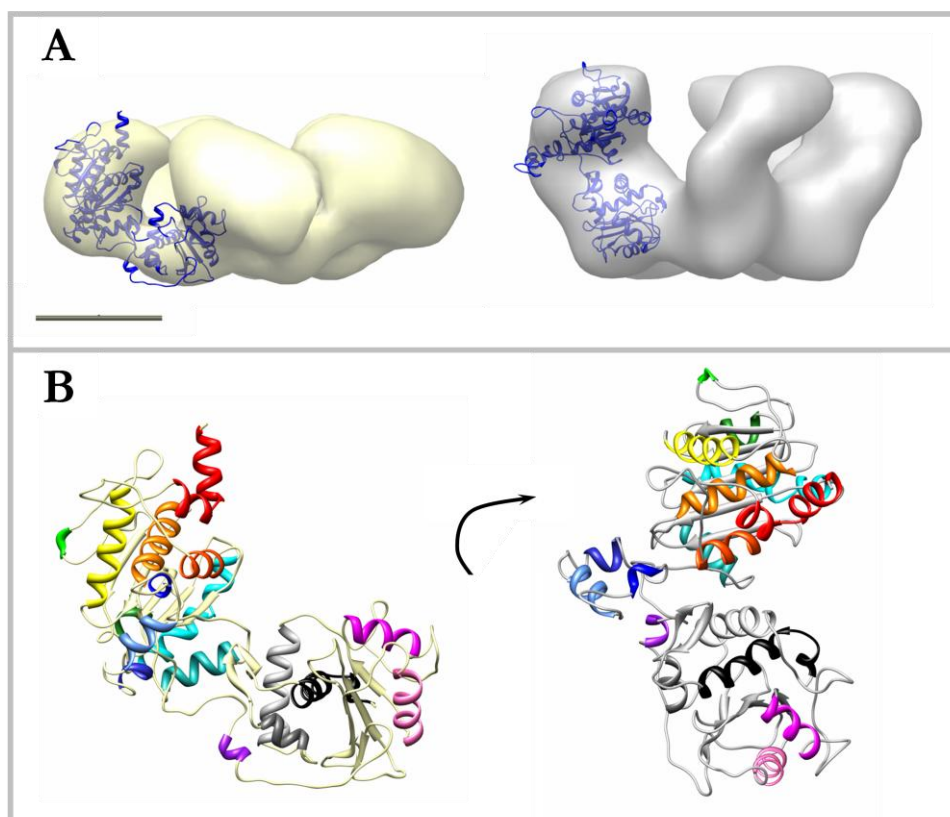


FIGURA R19. Estados conformacionales de la terminasa. A. Encaje del modelo atómico del monómero de gp19 (en azul) en los mapas de ME correspondientes a la terminasa aislada (en amarillo) y segmentada del complejo (en gris). La barra corresponde a 50 Å. B. Transición de cuerpo rígido del modelo atómico del monómero de gp19 entre el estado aislado (izquierda) y la conformación en complejo (derecha). Cada hélice se muestra en un color para resaltar el movimiento global y la ausencia de doblamientos dentro del monómero.

Dada la mencionada similitud de secuencia entre las terminasas de los fagos T3 y T7, y considerando la extensa caracterización bioquímica llevada a cabo en la gp19 de T3 (Fujisawa et al., 1991; Hamada et al., 1986a; Hamada et al., 1986b; Morita et al., 1994; Morita et al., 1995a; Morita et al., 1995b; Shibata et al., 1987a; Shibata et al., 1987b) y los alineamientos de terminasas virales (Draper y Rao, 2007), procedimos a localizar las regiones catalíticas esta vez en el modelo atómico de la conformación de gp19 en el complejo (Figura R20B, derecha). La región ATPasa (en rojo) quedaba situada en la parte externa de los lóbulos, pudiendo favorecer de alguna forma la interacción y ruptura de la molécula de ATP. La región nucleasa, se

localizaba en la entrada del canal agrupando los residuos 344 a 429 (en cian) apoyando el análisis mutacional mencionado previamente.

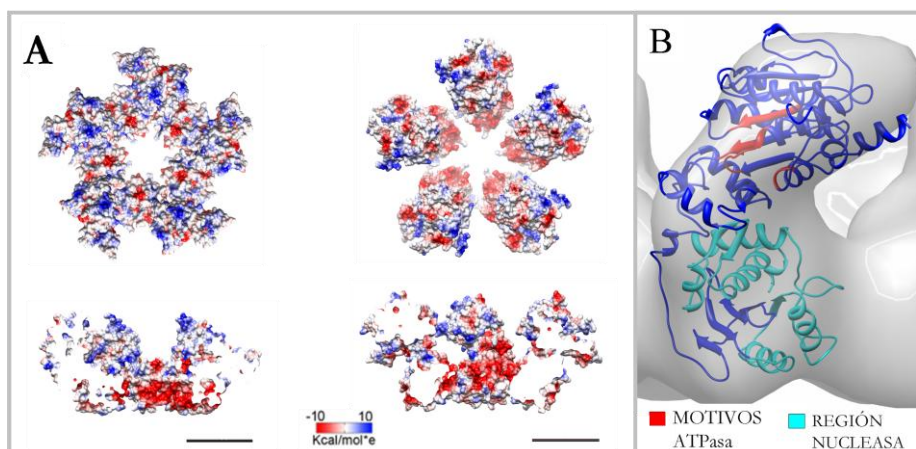


FIGURA R20. Superficies electrostáticas y motivos catalíticos en las dos conformaciones de la terminasa. A. Potencial electrostático de la superficie de la terminasa aislada (izquierda) y segmentada del complejo (derecha). En la parte superior se muestra la vista frontal, con el dominio amino hacia arriba. En la parte inferior se muestra una sección del canal interno. La barra corresponde a 50 Å. B. Localización de las regiones catalíticas en el volumen de terminasa segmentada del complejo. La región ATPasa se muestra en rojo, mientras que la región nucleasa aparece en cian

R5. DETECCIÓN DEL CAMBIO CONFORMACIONAL DE LA TERMINASA MEDIANTE MICROPALANCAS

Los resultados que se describen a continuación fueron obtenidos gracias al trabajo conjunto con el doctor Johann Mertens, del grupo de Bionanomecánica del Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM-CNM-CSIC) dirigido por Javier Tamayo.

En los últimos años se ha demostrado que el movimiento de elementos micro y nanomecánicos, tales como las micropalancas utilizadas en AFM, permiten medir las fuerzas implicadas en el reconocimiento y/o cambio conformacional de biomoléculas, incluso en una sola molécula (Chen et al., 1995; Gimzewski et al., 1994). Esto ha permitido la aparición de un nuevo tipo de sensores biológicos: los dispositivos biosensores nanomecánicos. Su principio básico reside en que procesos de reconocimiento molecular o cambio conformacional de biomoléculas, ocurridos sobre su superficie, producen cambios en su posición y características de vibración. Las micropalancas se han aplicado con éxito en la detección de cambios conformacionales de motores moleculares de ADN (Shu et al., 2005), en la obtención de constantes catalíticas de la unión péptido/antibiótico (Ndieyira et al., 2008) o incluso para medir la interacción específica entre virus y receptores de membrana (Braun et al., 2009).

La aplicación de estos dispositivos nanomecánicos resultaba muy interesante para el estudio de un motor molecular como la gp19, no sólo por su actividad hidrolítica de ATP, sino también por el análisis de la posible existencia de dos estados conformacionales. En este sentido los dispositivos nanomecánicos nos ofrecían numerosas ventajas: la ausencia de marcaje con moléculas secundarias (radioactivas, fluorescentes, colorimétricas...), su diminuto tamaño y alta sensibilidad, y su capacidad de proporcionar información rápida en tiempo real. Por todo ésto, como alternativa a los experimentos de molécula única, abordamos el estudio del cambio conformacional de la gp19 utilizando como biosensores micropalanca funcionalizadas.

R5.1. SISTEMA EXPERIMENTAL

Generamos un dispositivo híbrido (bio-nanomecánico) en el cual los cambios conformacionales de las terminasas se transmiten a la micropalanca a la que estaban ancladas en forma de tensión superficial. Esta tensión se transforma su vez en un desplazamiento, a escala nanométrica, de la micropalanca. La flexión de la micropalanca se registra mediante un haz láser reflejado en su superficie, y proyectado a continuación en un fotodetector (Figura R21A). El fotodiodo registra el desplazamiento del punto láser actuando como amplificador del desplazamiento de la micropalanca. Este sistema de detección, basado en la técnica óptica de deflexión de haz, deriva conceptualmente del AFM y proporciona resoluciones subnanométricas (Mertens et al., 2005). Una imagen de este sistema experimental se muestra en la Figura R21B.

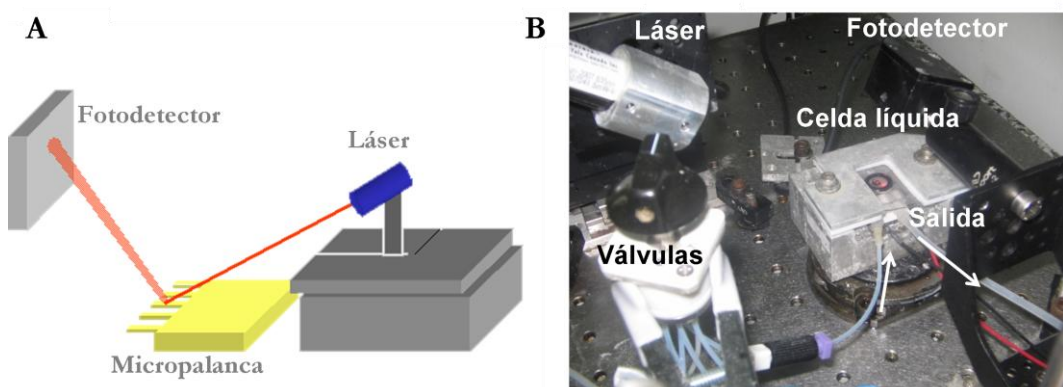


FIGURA R21. Sistema experimental. A. Esquema del haz de láser incidiendo sobre la micropalanca y proyectándose en el fotodetector para la lectura óptica de la señal de deflexión. B. Imagen del dispositivo con la celda líquida, las válvulas de entrada y salida, el láser y el fotodetector.

Las micropalanca se encuentran en una celda, con capacidad para 100 μ l, que asegura el rápido reemplazo del líquido. Es posible controlar el flujo de entrada y salida de la celda con un sistema de válvulas, así como la temperatura y el tipo de solución inyectada. En los experimentos que hemos llevado a cabo fuimos tanto solución de tampón (para el equilibrado y lavado), terminasas (para su

inmovilización sobre la micropalanca) y analitos (para estudiar su interacción con las terminasas y/o la micropalanca).

R5.2. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MICROPALANCAS

El primer desafío consistía en la inmovilización controlada de las terminasas sobre la superficie. Para ello, las micropalancas de silicio fueron metalizadas, por una de sus caras, con una capa de cromo de 2 nm. Este favorecía la posterior adhesión del oro, que se depositó mediante evaporación térmica formando una capa de 20 nm. A continuación, las micropalancas fueron recubiertas con ditiobis succinimidil propionato (en adelante DSP) para permitir la adhesión de las terminasas. Los grupos tiol del DSP interaccionan covalentemente con el oro generando una monocapa autoensamblada de DSP (Wagner et al., 1996). Esto ofrecía una superficie aplanada para la interacción específica con los grupos amino de las proteínas, actuando el DSP como espaciador entre el oro y las terminasas. La presencia mayoritaria de grupos amino en las histidinas del dominio carboxilo de la gp19 favorecía preferentemente la interacción a través de este dominio. De esta forma pudimos generar una capa de proteínas orientadas sobre el DSP. Asimismo, dado que la actividad ATPasa se localizaba en el dominio amino de la gp19 (Morita et al., 1995b), era esperable que la unión a la superficie de la micropalanca (a través del dominio carboxilo) no afectara a la actividad ATPasa. Por último, hay que tener en cuenta que la terminasa funciona ensamblada a la precabeza, es decir, que incluso *in vivo* existe cierto grado de constricción.

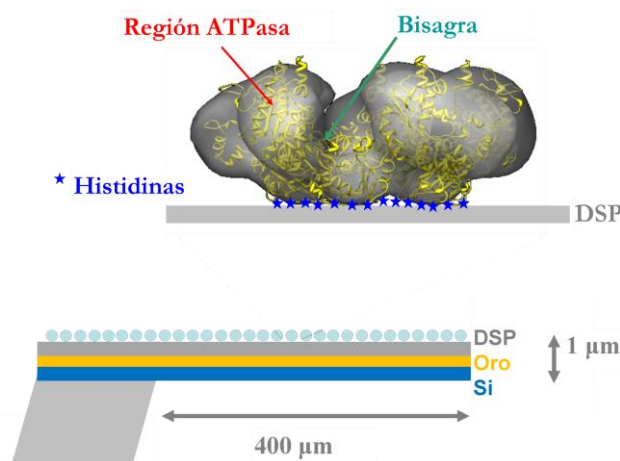


FIGURA R22. Funcionalización de las micropalancas. La parte inferior muestra las dimensiones y esquema de las capas que recubren la micropalanca de silicio: oro, DSP y terminasas. En la parte superior se representa la inmovilización orientada de la gp19. El DSP actúa como espaciador entre el oro y las terminasas que, debido a las histidinas (estrellas), interaccionan preferentemente con el DSP a través del dominio carboxilo.

En la figura R22 se muestra un esquema de la micropalanca de silicio (en azul) con las capas de oro (en amarillo) y DSP (en gris). Sobre ella se depositan las terminasas (en cian), cuya orientación se refleja en la amplificación de la parte superior de la figura. La interacción de la gp19 con el DSP se produce, como hemos

dicho, a través de las histidinas (estrellas), quedando la región bisagra y la ATPasa alejadas de la zona de unión a la superficie.

R5.3. INMOVILIZACIÓN DE LAS TERMINASAS

Dada la tendencia de las terminasas a agregar, caracterizamos su inmovilización en un amplio rango de concentraciones: entre 1 ng/ml y 4 µg/ml. En la figura R23A se muestra la flexión de la micropalanca a lo largo del tiempo durante la inmovilización de tres concentraciones de terminasa. Estas fueron inyectadas en la celda a un flujo constante que permitiera su adhesión a la superficie. Durante todo el experimento se mantenía el flujo de solución de tampón para asegurar la estabilidad de las condiciones químico-físicas. A concentraciones de 1 y 40 ng/ml (curvas azul y negra respectivamente) la inmovilización de gp19 induce una deflexión positiva de la micropalanca (debido a la interacción la capa de oro se expande respecto a la de silicio), que se atribuye a la unión de las terminasas a la superficie funcionalizada. El perfil exponencial de la señal con respecto al tiempo corresponde a una absorción de tipo Langmuir (Berger et al., 1997; Marie et al., 2002), y refleja la disposición en monocapa de las terminasas sobre la superficie. La deflexión aumenta a medida que se va recubriendo la superficie, y llega a un máximo de 25 y 230 nm dependiendo de la concentración de terminasas inyectadas (1 y 40 ng/ml respectivamente). A 4 µg/ml la curva de inmovilización (en rojo) es cualitativamente diferente a las anteriores: la deflexión de la micropalanca cambia de positiva a negativa (compresión de la capa de oro) a los 1500 s. Esto refleja la aparición de fuerzas de interacción atractivas (porque producen compresión de la capa de oro) entre las terminasas. Este perfil de inmovilización se obtuvo para todas las concentraciones superiores a 100 ng/ml ensayadas (200 ng/ml, 400 ng/ml, 1 µg/ml y 4 µg/ml), lo cual sugería que el cambio en la deflexión estaba relacionado con las interacciones que tenían lugar al inmovilizar concentraciones elevadas de terminasa.

En la Figura R23B se representa la flexión final de la micropalanca (el incremento entre su posición inicial y la final en la que se estabiliza) en función de la concentración de terminasa. La curva resultante indica la existencia de dos regímenes de inmovilización claramente diferenciados. Las proteínas se unen de manera dependiente de la concentración hasta que la superficie está completamente cubierta, con el punto de saturación a 230 nm y 40-100 ng/ml. El cálculo teórico del punto de saturación de la micropalanca, teniendo en cuenta la superficie de la misma y las dimensiones de las terminasas, tiene el mismo orden de magnitud que el observado. Sin embargo, a concentraciones de gp19 superiores a 100 ng/ml cambian las interacciones inter-proteicas en el plano, modificando la respuesta de la micropalanca.

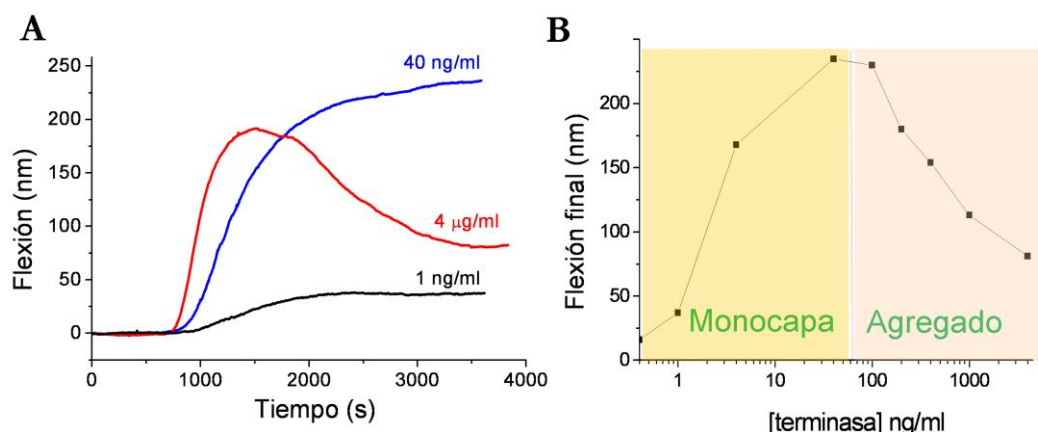


FIGURA R23. Inmovilización de varias concentraciones de terminasa sobre micropalanca recubiertas con DSP. A. Deflexión de la micropalanca durante la inmovilización de gp19 a concentraciones de 1 ng/ml (negra), 40 ng/ml (azul) y 4 µg/ml (roja). Sólo a 4 µg/ml la dirección de la flexión cambia tras alcanzar un máximo a los 1500 s indicando la aparición de fuerzas atractivas. B. Representación de la flexión final de la micropalanca frente a concentraciones de terminasa entre 400 pg/ml y 4 µg/ml. La señal muestra una dependencia logarítmica de la concentración de gp19 inmovilizada. La dirección de la flexión cambia en torno a 40 ng/ml indicando la presencia de dos regímenes: monocapa y agregado.

El proceso de absorción de gp19 a la superficie corresponde, por tanto, a una dependencia no lineal (fractal) de la concentración. Es decir, es proporcional al logaritmo de la concentración, lo que significa que la probabilidad de adhesión de proteínas a un sitio de la superficie no es uniforme, sino que depende de la distancia de los complejos proteicos previamente absorbidos. Las terminasas tenderán a depositarse cerca de las previamente unidas, formando islas que con el tiempo crecerán en lateral rellenando los huecos entre ellas. Dado que la afinidad entre proteínas y DSP es mayor que entre proteínas, se formará una capa bidimensional. A elevadas concentraciones de gp19 las interacciones atractivas entre terminasas favorecerán su reorganización tridimensional. Este modelo de absorción propuesto se ajusta a la isoterma de Freundlich, que describe procesos heterogéneos como la absorción de proteínas, y se caracteriza por alta cooperatividad de unión (Nygren, 1996).

Para comprobar que sendos regímenes de inmovilización estaban relacionados con la diferente distribución de gp19 sobre la superficie tomamos imágenes de AFM a concentraciones de 40 ng/ml y 4 µg/ml (Figura R24). Elegimos estas concentraciones porque presumiblemente a 40 ng/ml encontraríamos una monocapa empaquetada (puesto que está cerca del punto de saturación) mientras que a 4 µg/ml tendría lugar la máxima reorganización en capas de la gp19. Como muestran las imágenes, dependiendo de la concentración de terminasa inmovilizada, ésta forma estructuras bi o tridimensionales sobre la superficie. A 40 ng/ml gp19 se dispone formando una monocapa (Figura R24A) de oligómeros, estructuras redondeadas de 20-30 nm diámetro, distribuidos de forma irregular cubriendo la superficie. Cuando gp19 es inmovilizada a una concentración de 4 µg/ml se dispone formando agregados más grandes (Figura R24B) de tamaños variables (20-200 nm de diámetro) que sugieren la presencia de varias terminasas apiladas. Estos

agregados se hallan rodeados de estructuras de menor tamaño (2-4 nm diámetro), que podrían corresponder a monómeros de la gp19.

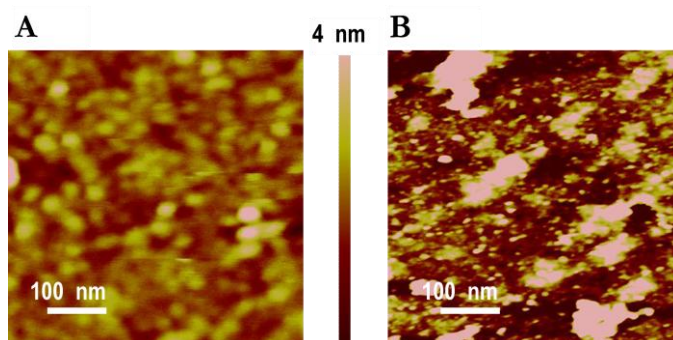


FIGURA R24. Imágenes topográficas obtenidas mediante AFM de terminasas inmovilizadas sobre la capa de DSP. A. gp19 inmovilizada a 40 ng/ml se dispone formando una monocapa de oligómeros empaquetados. B. Tras la inmovilización de gp19 a 4 µg/ml se forman agregados de distintos tamaños que sugieren la presencia de varias terminasas apiladas, rodeadas de monómeros de gp19.

Dada la diferente topografía encontrada en sendos regímenes nos propusimos caracterizar de forma separada la interacción con nucleótidos en cada uno de ellos.

R5.4. INTERACCIÓN CON NUCLEÓTIDOS EN EL RÉGIMEN AGREGADO

La primera parte del protocolo experimental consistía en fluir diferentes nucleótidos que intervienen en el proceso de hidrólisis o bien lo bloquean. Sobre micropalancas funcionalizadas con gp19 se inyectaron: ADP (producto de hidrólisis), ATP y AMP-PNP (análogo no hidrolizable del ATP).

Dado que las micropalancas son sensibles a la absorción, la temperatura y demás propiedades químico-físicas del medio, era necesario realizar un control negativo. Para identificar esos posibles artefactos y efectos no deseados, hicimos medidas diferenciales con micropalancas de referencia funcionalizadas sólo con DSP. Medimos, como control negativo, la flexión de micropalancas desnudas (sin terminasas) ante la inyección de los distintos nucleótidos en función del tiempo (Figura R25A). 200 s después de la entrada del nucleótido a la celda se produce la deflexión positiva de las micropalancas (expansión de la capa de oro) que refleja la absorción de los nucleótidos a la superficie. A medida que se incrementa la concentración del analito aumenta la deflexión, alcanzando un valor máximo de 6-9 nm a los 500 s. La señal es cualitativamente similar para los tres nucleótidos, siendo ligeramente superior en magnitud para el AMP-PNP. La deflexión va disminuyendo a medida que la celda es lavada con solución de tampón, estabilizándose a los 1000 s en los valores iniciales. La completa reversibilidad de la señal indica la absorción física débil de los nucleótidos a la superficie de la micropalanca.

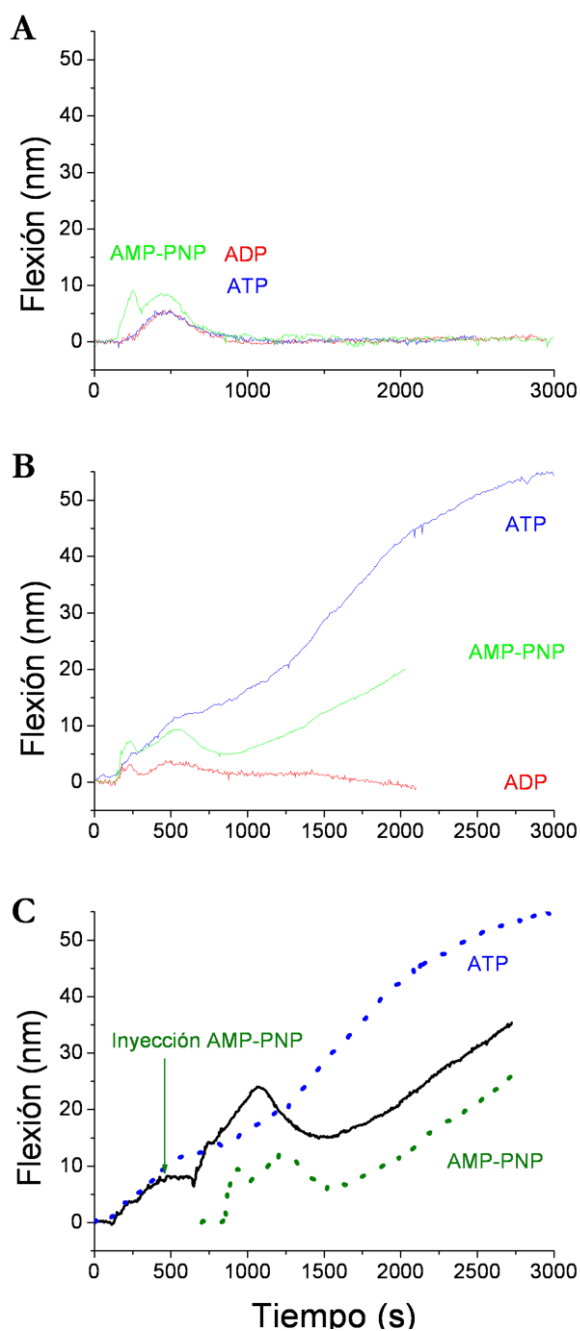


FIGURA R25. Detección nanomecánica de la interacción de los nucleótidos con el DSP y las terminasas inmovilizadas a 4 µg/ml. A. Interacción entre la micropalanca recubierta únicamente con DSP y ATP, ADP y AMP-PNP. La deflexión en respuesta a la inyección de los nucleótidos es reversible y constituye la señal control negativa. B. Deflexión en respuesta a la inyección de nucleótidos sobre micropalancas funcionalizadas con gp19. La flexión irreversible es cualitativamente similar en el ATP y AMP-PNP (aunque la magnitud es mayor en el primero); frente al ADP donde la señal es reversible. La deflexión del cantilever con terminasas frente al ADP es comparable al control negativo, sin embargo para el ATP y el AMP-PNP es significativamente distinta. C. Detección de la interacción de la gp19 con ATP y AMP-PNP inyectados con un intervalo de 500 s. El perfil de deflexión tras la interacción con ATP se transforma en el del AMP-PNP tras la entrada de éste al sistema. Los perfiles de las inyecciones individuales de ATP (azul) y AMP-PNP (verde) se muestran como comparación.

En la figura R24B se muestra la interacción entre las terminasas inmovilizadas a 4 µg/ml y los nucleótidos. La respuesta frente a ADP es reversible y similar al control negativo con DSP, mostrando que la interacción de las terminasas con ADP es insignificante. Esto podría deberse a que: o las terminasas no son capaces de interactuar con el ADP en estas condiciones, o la unión del ADP a las terminasas no provoca ningún tipo de cambio conformacional asociado que podamos detectar. Por el contrario, la respuesta irreversible de la micropalanca ante la inyección de ATP o AMP-PNP es significativamente diferente a la registrada en las micropalancas de referencia (sin terminasas). Frente al ATP y al AMP-PNP la

señal sube, mostrando una deflexión positiva (expansión de la capa de oro) y estabilizándose a los 4000 s. Esto podría reflejar la interacción de gp19 con sendos nucleótidos, y cómo el cambio conformacional de la terminasa genera una tensión en la superficie de la micropalanca, que observamos como deflexión positiva. Dado que la respuesta frente a ATP y AMP-PNP es cualitativamente similar, el cambio conformacional debe achacarse a la unión del nucleótido, y no a un evento de hidrólisis, puesto que sólo el ATP puede ser hidrolizado, no así el AMP-PNP. El cambio conformacional asociado a la unión de ATP ya había sido propuesto para la terminasa gp17 del fago T4, usando una aproximación completamente diferente (Leffers y Rao, 2000). La diferente magnitud de la señal, 42 y 18 nm a los 2000 s para el ATP y AMP-PNP respectivamente, podría reflejar la diversidad de afinidades de unión entre la terminasa y ambos nucleótidos. En otras terminasas como G2P, gp17 y P4 se ha descrito la unión diferencial a distintos nucleótidos, y sus implicaciones en funcionamiento y regulación (Gual et al., 2000; Leffers y Rao, 2000; Mancini et al., 2004).

Para conocer de qué manera la unión de ATP por la terminasa se veía afectada por la presencia de AMP-PNP, medimos la respuesta de la micropalanca ante las inyecciones sucesivas de ambos (Figura R25C). La entrada de AMP-PNP, 500 s después de la inyección de ATP, modifica considerablemente la deflexión de la micropalanca. La curva resultante (en negro) es intermedia entre ambas contribuciones, con una deflexión de 27 nm a los 2500 s (respecto a los 51 nm del ATP y los 21 nm del AMP-PNP, curvas punteadas en azul y verde respectivamente). El perfil de interacción con el ATP se transforma en el perfil de deflexión del AMP-PNP tras la inyección de éste último, apuntando a la unión competitiva de ATP y AMP-PNP por las terminasas a esta concentración.

R5.4.1. Análisis de la interacción con ATP en el régimen Agregado

Un análisis más exhaustivo evidenció la relación existente entre la flexión residual producida durante la inmovilización de las terminasas y la flexión generada en la micropalanca debido a la interacción ATP/gp19 (Figura R26). Llamamos flexión residual a la registrada durante la inmovilización de terminasas a concentraciones elevadas (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml y 4 µg/ml) a partir de los 1500 s aproximadamente, cuando la deflexión pasaba de positiva a negativa hasta estabilizarse (ejemplo en el recuadro inferior). Esta medida indica, como hemos visto, la formación de agregados producto de la reorganización de las terminasas en la superficie durante su inmovilización. La flexión positiva del ATP es la registrada a distintas concentraciones de terminasa tras la inyección del nucleótido (recuadro superior). La correlación lineal entre esta deflexión y la producida durante la formación de los agregados sugiere que es precisamente la disolución de los agregados lo que sucede tras la interacción de éstos con el ATP.

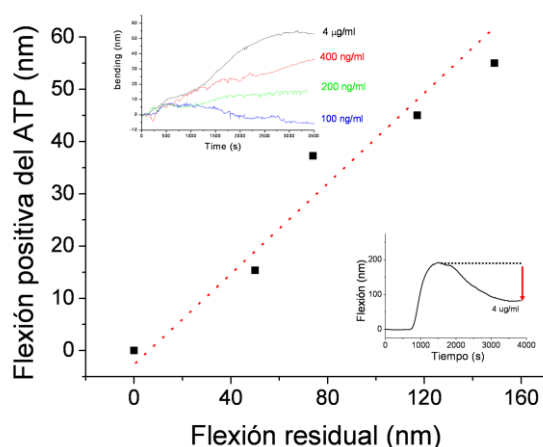


FIGURA R26. Análisis de la interacción con ATP en el régimen agregado. Correlación lineal entre la flexión residual generada en la formación del agregado y la flexión positiva producida por la inyección de ATP. El recuadro inferior inserto muestra como ejemplo la flexión residual (flecha roja) medida durante la inmovilización de gp19 a 4 µg/ml. En el recuadro superior inserto se reflejan las flexiones medidas tras la inyección de ATP a varias concentraciones de terminasa.

Para confirmar esta hipótesis decidimos tomar nuevas imágenes de AFM antes y después de la interacción de las terminasas (a 4 µg/ml) con el ATP (Figura R27). Como reflejan las imágenes topográficas (Figura 27A), antes de la interacción con el ATP (imagen izquierda) encontramos estructuras de gran tamaño y altura (10-30 nm de alto y 20-200 nm de diámetro) que corresponden a agregados de gp19 sobre la superficie. Tras la interacción con el ATP (imagen derecha) hallamos estructuras de menor tamaño y altura (2-8 nm de alto y 10-80 nm de diámetro), que evidencian cambios en la estructura superficial de los agregados. En la Figura R27B se presenta una sección de las áreas indicadas antes (línea azul) y después (línea roja) de la interacción con el ATP, que refleja nuevamente la reducción de los agregados. Estos resultados muestran la permanencia de algunas islas de proteínas tras la exposición al ATP, reforzando la hipótesis de que las terminasas que están interaccionando directamente con la superficie (la capa primaria) no pueden ser desprendidas.

Así, la interacción con el ATP provocaría el cambio conformacional de las terminasas que constituyen los agregados, produciéndose una reorganización de fuerzas en el interior de los mismos. La disminución del número de contactos entre terminasas adyacentes (producto de su cambio conformacional) alteraría no sólo la energía potencial de los agregados, sino también su estructura. En resumen, la deflexión de la micropalanca tras la inyección de ATP y el cambio en la topografía de las terminasas apiladas, reflejan la liberación del estrés acumulado durante la formación de los agregados de gp19.

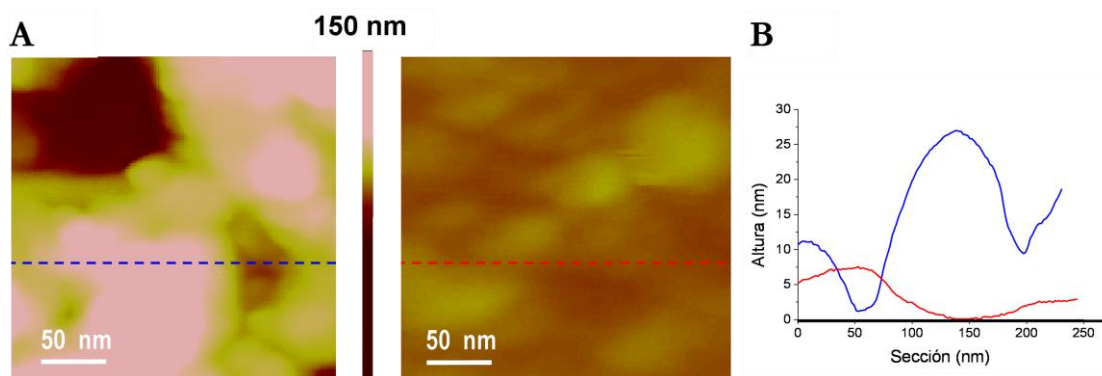


FIGURA R27. Imágenes de AFM tomadas antes y después de la interacción con ATP sugieren el cambio en la estructura superficial de los agregados. A. Antes de la interacción con ATP (izquierda) se aprecian estructuras de gran tamaño y altura; mientras que tras la interacción con ATP (derecha) observamos estructuras de menor tamaño y altura. B. Sección de las áreas indicadas en las imágenes de AFM: antes de la interacción con el ATP las terminasas forman agregados (línea azul) y tras la interacción con el ATP las terminasas se desprenden quedando sólo la capa primaria (línea roja).

R5.5. INTERACCIÓN CON NUCLEÓTIDOS EN EL RÉGIMEN DE MONOCAPA

En la figura R28A se muestra la interacción entre las terminasas inmovilizadas a 40 ng/ml y los nucleótidos ATP, ADP y AMP-PNP. La deflexión registrada tras el ADP y el AMP-PNP es aproximadamente similar al control negativo, reflejando que la interacción de la monocapa con ambos nucleótidos no produce un cambio distinguible de la absorción física inespecífica (ver figura R25A). Esto significa que: o bien las terminasas no son capaces de unir ADP o AMP-PNP en las condiciones ensayadas, o bien la unión del ADP o el AMP-PNP no produce ningún cambio conformacional detectable en la superficie de la micropalanca. Por el contrario, la interacción entre el ATP y las terminasas produce una señal irreversible de deflexión negativa y escalonada. Dado que la gp19 es capaz de unir tanto el ATP como el AMP-PNP (Fujisawa y Yamagishi, 1981), pero que este último no puede ser hidrolizado, asignamos tentativamente esta señal al cambio conformacional producto de la hidrólisis de ATP (Mancini et al., 2004; Sun et al., 2008). Esto sugiere fuertemente la capacidad de nuestro sistema híbrido (bionanomecánico) para transformar energía libre en movimiento.

Como control adicional, tratamos de bloquear esta transformación realizando un ensayo competitivo entre el ATP y el análogo no hidrolizable, AMP-PNP. Como muestra la figura R28B, la respuesta de la gp19 al ATP puede ser detenida por la inyección, en un momento determinado, de AMP-PNP. El primer escalón en la señal de deflexión revela la interacción inicial con el ATP. Tras la inyección de AMP-PNP a los 600 s no se registra ningún cambio conformacional adicional: la respuesta de la micropalanca corresponde a la unión del nucleótido no hidrolizable, es decir, se ha producido el bloqueo de las terminasas.

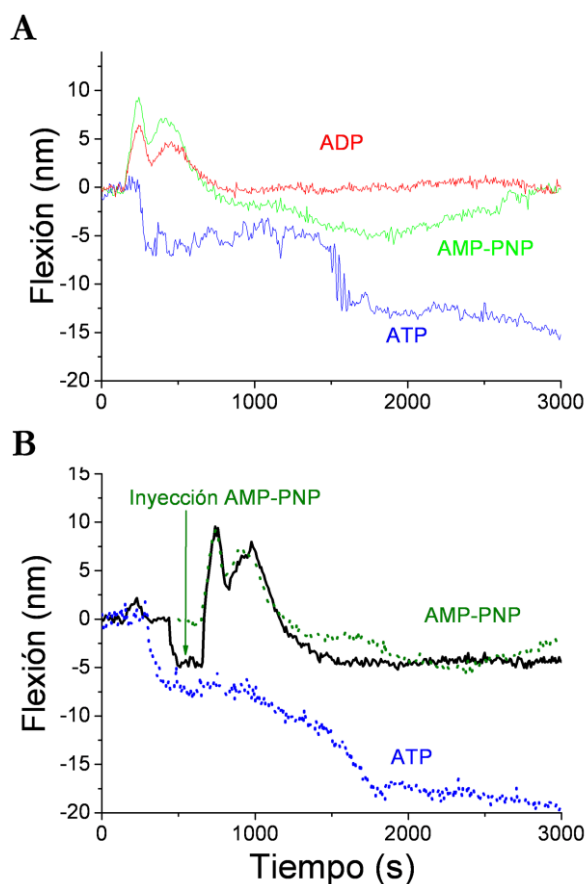


FIGURA R28. Detección nanomecánica de la interacción de los nucleótidos con las terminasas inmovilizadas a 40 ng/ml. A. Las inyecciones de ADP y AMP-PNP provocan respuestas reversibles y similares al control negativo (ver Figura R24A). La señal obtenida frente al ATP es irreversible y escalonada. B. La inyección de AMP-PNP a los 600 s detiene la interacción previa entre el ATP y las terminasas. Tras la inyección de AMP-PNP no se registra ninguna transición adicional. Los perfiles resultantes de las inyecciones individuales de ATP (azul) y AMP-PNP (verde) se muestran como comparación.

R5.5.1. Análisis de interacción con ATP en el régimen de Monocapa

Para comprender la relación entre la flexión en escalones de la micropalanca y la hidrólisis de ATP realizamos ensayos repetitivos de la interacción entre terminasas (inmovilizadas a 40 ng/ml) y ATP (Figura R29). Como muestra la gráfica, la distribución de los escalones (círculos) en condiciones idénticas es aleatoria. La amplitud de estos escalones, 4-10 nm, es aproximadamente tres órdenes de magnitud superior a la que generaría un solo motor (Fuller et al., 2007a; Fuller et al., 2007b; Smith et al., 2001), sugiriendo que las transiciones se deben a la acción de más de una terminasa. Es posible estimar una tasa de transición a partir del incremento de cada escalón y su pendiente: estos parámetros se muestran en el recuadro inserto. Aunque la tasa obtenida, $k \approx 0.04 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$, es relativamente lenta comparada con la que esperaríamos para un solo motor, es comparable a los eventos de unión y disociación de GroES sobre la monocapa de GroEL en presencia de ATP (Yokokawa et al., 2006). Posibles explicaciones serían tanto el anclaje de las terminasas a la micropalanca como las constricciones que ejerce la monocapa en la que están confinadas. Además, el fuerte anclaje de las terminasas a la superficie y el impedimento estérico resultante del empaquetamiento, son responsables del acoplamiento de los motores a través de la superficie. La coordinación se produce porque cuando un motor cambia su estado químico (hidrolizando ATP) y la tensión generada se comunica a través de la micropalanca al resto de terminasas. Este acoplamiento mecano-químico de nuevo sugiere que

estamos ante un fenómeno colectivo, es decir que las transiciones no se deben a cambios en un solo motor. En conclusión, los escalones dependen del número de motores en estado hidrolizable así como de la cooperatividad entre ellos. Por último, una vez la transición tiene lugar, existe un periodo de tiempo antes de que se produzca la siguiente (flecha negra, en la figura). Estos intervalos corresponden al tiempo necesario para que el sistema pueda alcanzar nuevamente el umbral que desencadene otra transición.

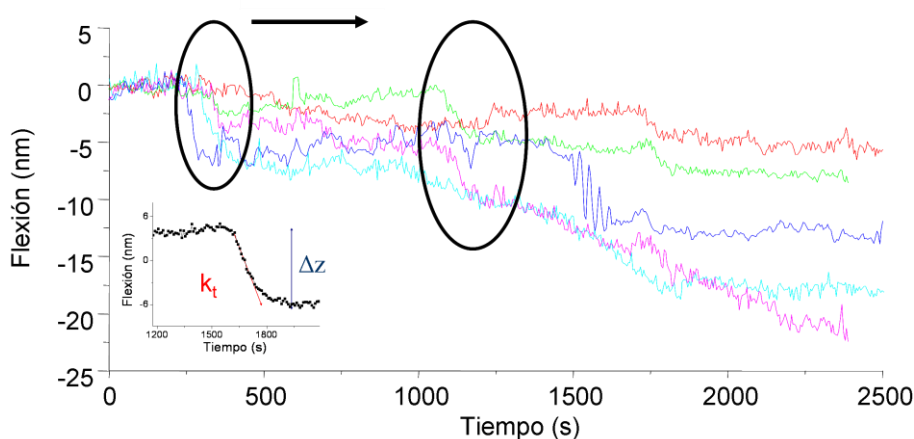


FIGURA R29. Registro de la interacción entre terminasas inmovilizadas a 40 ng/ml y ATP: distintas medidas en idénticas condiciones reflejan la distribución aleatoria de los escalones (cada medida se representa en un color). Los círculos enmarcan dos transiciones consecutivas y la flecha indica el periodo de recuperación del sistema entre un escalón y el siguiente. En el gráfico inserto se muestra un escalón donde figuran los parámetros necesarios (el incremento Δz y la pendiente K_t) para calcular la tasa de transición.

Las imágenes topográficas de AFM de las terminasas inmovilizadas sobre la superficie de oro permiten observar la estructura de la capa antes y después de la interacción con ATP. Esto hizo posible relacionar las medidas de los escalones con los cambios producidos en la monocapa de gp19 como consecuencia de la hidrólisis de ATP. Como muestra la figura R30, los oligómeros de gp19 se desensamblan producto de la hidrólisis de ATP. Antes de la interacción del ATP con las terminasas (inmovilizadas a 40 ng/ml) se aprecia la monocapa de oligómeros (izquierda) descrita anteriormente. Tras la interacción con el ATP los oligómeros dejan de ser visibles: se ha producido una reorganización en el plano de la monocapa (derecha). De hecho, imágenes topográficas y de adhesión muestran la presencia de estructuras de menor tamaño (2-4 nm de diámetro) tras la incubación del ATP, que podrían corresponder a monómeros de gp19. El desensamblaje de los oligómeros en monómeros explicaría también la irreversibilidad de respuesta observada tras la interacción del ATP con la monocapa. Por tanto, la hidrólisis de ATP produciría una liberación abrupta de estrés, que se refleja en el aumento repentino de tensión en la superficie de la micropalanca. La energía generada en ese momento sería tan grande que provocaría el desensamblaje observado de los oligómeros en monómeros.

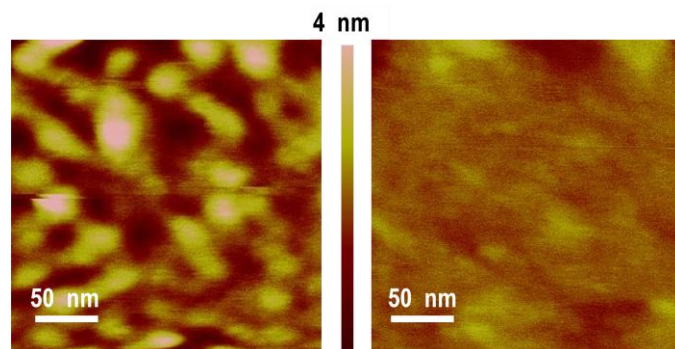


FIGURA R30. Imágenes de AFM de terminasas inmovilizadas a 40 ng/ml antes y después de la incubación con el ATP. Antes de la interacción con el ATP (izquierda) las terminasas forman una monocapa de oligómeros. Tras la incubación con el ATP (derecha) desaparece la monocapa y se aprecian estructuras más pequeñas que podrían corresponder a monómeros de gp19.

Finalmente, las transiciones fueron medidas a diferentes concentraciones de gp19, entre 1 ng/ml y 40 ng/ml (Figura R31A). Los escalones (señalados con flechas) aparecen típicamente en el rango de concentraciones del régimen de monocapa, y su distribución es independiente de la concentración. Resulta difícil correlacionar la amplitud y tasa de estas transiciones con la densidad y confinamiento de las terminasas. Esto podría deberse a que el mecanismo de generación de fuerza en la superficie de la micropalanca está dominado por cambios estructurales aleatorios localizados, y el momento de flexión está relacionado con la posición del grupo de terminasas que cambian conformacionalmente. Es decir, si las terminasas situadas en el extremo más alejado del punto de fijación de la micropalanca sufren un cambio conformacional, éste provocará una flexión mayor que si sucediera en las terminasas localizadas muy cerca del punto de fijación. Además, es interesante señalar que, como muestra la figura R31B, el tiempo medio entre transiciones parece disminuir a medida que aumenta la concentración de proteína (es decir, cuanto más empaquetada está la monocapa). Dado que el impedimento estérico entre proteínas (las constricciones generadas por la acomodación de moléculas adyacentes) aumenta con la concentración, la posibilidad de superar el umbral de energía necesario para que se produzca un cambio conformacional se verá facilitada por el confinamiento de las terminasas. Aunque es necesario un estudio más exhaustivo de este fenómeno, los resultados sugieren que el acoplamiento mecánico está relacionado con las propiedades elásticas de la monocapa.

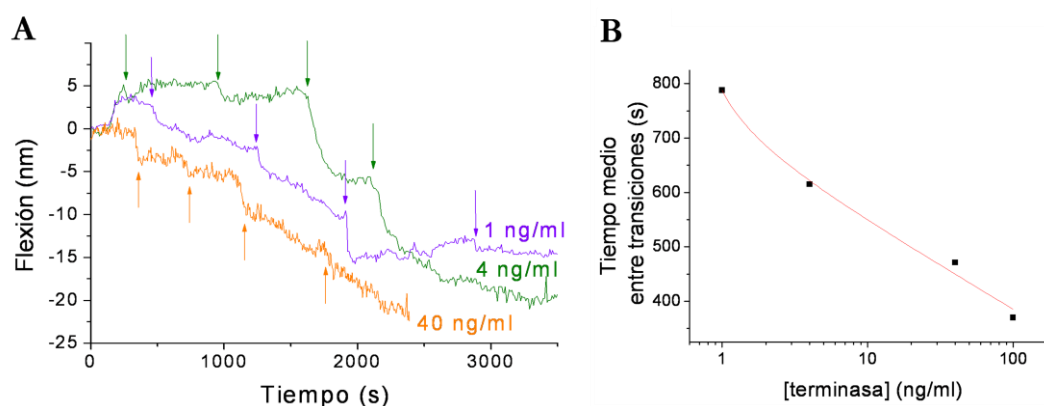


FIGURA R31. Análisis de la interacción entre el ATP y las terminasas inmovilizadas en el rango de concentraciones correspondientes al régimen de monocapa. A. Las cuatro primeras transiciones se marcan con flechas del color correspondiente a cada concentración. La distribución de los escalones es independiente de la concentración de terminasas. B. Tiempo medio entre transiciones representado en función de la concentración de gp19. Este intervalo depende de la concentración de proteína inmovilizada en la superficie de la micropalanca.

Teniendo en cuenta la inestabilidad intrínseca de las terminasas, y la escasa información estructural disponible, el presente trabajo supone un avance importante en la caracterización de la terminasa del fago T7. La descripción de dos estructuras de la terminasa, correspondientes a dos estados conformacionales distintos supone la primera visualización directa del propuesto cambio conformacional. El análisis, mediante micropalanca, de la interacción en superficie de la terminasa con distintos nucleótidos constituye la detección en tiempo real de cambios conformacionales asociados a la hidrólisis de ATP. Se trata por tanto de un estudio multidisciplinar, donde la combinación de técnicas bioquímicas y biofísicas nos ha permitido obtener una imagen razonablemente detallada de la estructura y el funcionamiento de la terminasa gp19. La información estructural permitirá determinar las particularidades del sistema T7 así como las características comunes a otros sistemas descritos, y clarificar en cierta medida (como veremos en la discusión) el mecanismo de empaquetamiento viral. Por otro lado, la aproximación de las micropalanca abre nuevas perspectivas en la aplicación de biosensores nanomecánicos al estudio de motores moleculares con elevada sensibilidad y en tiempo real.

Discusión

D1. ESTRUCTURAS CUATERNARIAS DE LA TERMINASA Y EL COMPLEJO PORTAL: IMPLICACIONES FUNCIONALES

D1.1. RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA TERMINASA MAYOR Y APORTACIONES DEL MODELO ATÓMICO

La caracterización de la terminasa mayor del fago T7 (gp19) muestra las similitudes que existen desde la estructura primaria a la cuaternaria entre terminasas virales e incluso con la amplísima familia de proteínas AAA+ (Davey et al., 2002; Hanson y Whiteheart, 2005). Como se ha descrito en otras proteínas implicadas en la morfogénesis viral, estas semejanzas estructurales sustentan no sólo relaciones evolutivas, sino la conservación de determinados mecanismos funcionales (Cuervo y Carrascosa, 2012a).

El alineamiento de secuencia realizado con la terminasa de T7 y otras ATPasas virales (ver figura R1) muestra la existencia de una baja homología de secuencia y la conservación, en terminasas, helicasas, endonucleasas y translocasas, de determinados motivos de unión a nucleótido: Walker A y B, motivo de unión a adenina y motivo C (Draper y Rao, 2007). Alguno de éstos son característicos de la familia de proteínas AAA+ (Hanson y Whiteheart, 2005), y en gp19 confirman los ensayos de mutagénesis dirigida que identificaban varios residuos implicados en el empaquetamiento del genoma de T3 (Morita et al., 1994). En la gp19, igual que en el resto de terminasas virales, estos motivos se localizaban en el dominio amino o ATPasa (Goetzinger y Rao, 2003; Guo et al., 1987; Hwang y Feiss, 1996; Morita et al., 1995b; Oliveira et al., 2006), mientras que la región nucleasa se ubicaba en el dominio carboxilo. La división funcional en dos dominios (amino/ATPasa y carboxilo/nucleasa) y la comunicación entre ambos (unidos por la región bisagra) podrían tener un sentido regulador de la actividad. Esto se ha sugerido para la terminasa del fago T4, donde el motivo C de acoplamiento entre hidrólisis y traslocación aparece conservado en multitud de proteínas (Draper y Rao, 2007); y en P22, donde los dominios no funcionan separadamente sino que se requiere la comunicación entre ambos (Roy y Cingolani, 2012). Precisamente esta división estructural hizo posible la detección en gp19 de actividad ATPasa (dominio amino) en terminasas ancladas a la superficie de una micropalanca por el extremo carboxilo (Mertens et al., 2012b).

La obtención del modelo atómico de gp19 mostraba un plegamiento de tipo Rossmann en la región ATPasa, igual al descrito para la terminasa del fago T4 (Sun et al., 2008). Esta conservación de plegamiento no puede achacarse exclusivamente a la influencia del molde, ya que este motivo está presente en multitud de proteínas que unen e hidrolizan nucleótidos (Hanson y Whiteheart, 2005). Además, una parte del dominio amino (y de la región bisagra) difería notablemente del molde (ver figura R12). Asimismo la región nucleasa, pese a la baja homología de secuencia, presentaba un plegamiento de tipo RNasa H/integrasa conservado en las terminasas de los virus T4, SPP1, HCMV y P22 (Nadal et al., 2010; Roy y Cingolani, 2012; Smits et al., 2009; Sun et al., 2008; Sun et al., 2007). La cristalización del dominio nucleasa de la terminasa de P22 permitió localizar como residuo activo el Aspartato (Asp) 321 (Roy y Cingolani, 2012). Este era el único residuo conservado en las cuatro nucleasas cristalizadas, frente a la variable posición y frecuencia de otros residuos propuestos. Su conservación en el modelo atómico de T7 (Asp 312) sustenta adicionalmente la localización de la región nucleasa propuesta. Finalmente la región bisagra, formada mayoritariamente por bucles, presentaba un porcentaje considerable de prolinas (Pro) y glicinas (Gly) casi idéntico en el caso de los fagos T4 y T7 (11 y 12 %, respectivamente) y notablemente mayor en P22 (27%). La abundancia de estos residuos confería cierta flexibilidad a la región bisagra, que se convertía en idónea para soportar cambios intra-moleculares, como los propuestos para la terminasa de T4 (Sun et al., 2008).

La reconstrucción 3D del oligómero purificado de la gp19 es la primera estructura de terminasa multimérica obtenida por métodos directos. A esto hay que añadir que se trata de la proteína completa, en ausencia de deleciones y mutaciones; y cuyo pentámero posee actividad ATPasa. Dado que tanto la gp19 como la gp17 del fago T4 tienen tamaños muy similares (67 y 70 kDa respectivamente) y que ambas forman pentámeros, era esperable que tuvieran dimensiones parecidas (162 x 65 Å la gp19 y 160 x 75 Å la gp17). Asimismo, ambas traslocan ADN bicatenario, por lo que sus canales tienen un diámetro también similar (37 Å en gp19 y 40 Å en gp17) y suficiente para el paso de los 23 Å de anchura del ácido nucleico (Vlieghe et al., 1999). La terminasa P4, del fago Φ 12, tiene sin embargo un tamaño inferior (331 residuos frente a los 587 de la gp19) y pese a formar un hexámero sus dimensiones (95 x 55 Å) son menores que las del pentámero de gp19. Además, la P4 transloca ARN monocatenario, lo que justifica su canal más estrecho (25-21 Å). De cualquier forma, debido a sus dimensiones la gp19 sobresaldría parcialmente de la precabeza, cuya cavidad pentamérica presenta un diámetro de 95-100 Å y una altura de 40-45 Å (Agirrezabala et al., 2005a). Frente a un mayor internamiento de la terminasa, una posición más externa podría facilitar el desprendimiento una vez completado el empaquetamiento.

A pesar de ensamblarse como pentámeros en la precabeza (Simpson et al., 2000; Sun et al., 2008), la mayoría de las terminasas existen como monómeros en solución (Leffers y Rao, 2000; Nadal et al., 2010; Nemecek et al., 2007). La controversia sobre la estequiometría del pRNA (Ding et al., 2011; Shu et al., 2007), que en el fago Φ 29 actúa unido a la terminasa, y el estado hexamérico de la ATPasa empaquetadora del fago Φ 12 (Mancini et al., 2004), enfatizaron la importancia de la oligomerización en esta familia de proteínas. La terminasa de T7 presenta el mismo

orden de simetría que el vértice pentamérico de la precabeza, con la que interacciona a través del conector dodecamérico. Además interacciona con el ADN bicatenario, con pseudo simetría 10. Ya en 1978 se sugirió la importancia de estos acoples y desacoples de simetría en el mecanismo de traslocación: el ajuste de simetrías entre el conector (simetría de orden 12) y la cola (simetría de orden 6) garantizaba la estabilidad de la unión en el virión maduro (Hendrix, 1978). Siguiendo este razonamiento, el acople entre la terminasa y el vértice de la precabeza (ambas con simetría pentamérica) podría estabilizar la unión a la procápside, contrarrestando el desajuste con el conector. Asimismo, el desacople de simetrías (entre conector y terminasa, y entre el conector y el ADN) podría contribuir de alguna manera a la transitoriedad de estas interacciones, evitando el posible estancamiento del ADN y asegurando la finalización del proceso de empaquetamiento.

Aunque sería lógico considerar la estructura de la terminasa en el complejo portal como la forma “funcional”, la actividad asociada a la terminasa oligomérica aislada y el ajuste del modelo atómico en el volumen de microscopía, sugieren que la estructura 3D de la terminasa aislada también podría tener un papel funcional. Teniendo en cuenta la determinación de la tasa de hidrólisis en la terminasa del fago T3 (Morita et al., 1993) nuestros análisis de actividad, lejos de pretender ser cuantitativos, han permitido asociar la actividad ATPasa de gp19 a su estado oligomérico. En otras ATPasas de la familia tipo recA se había descrito que la actividad ATPasa del oligómero era mayor que la del monómero. Se propuso que aunque la unión del nucleótido se producía en una misma subunidad, la hidrólisis requería subunidades adyacentes (Ye et al., 2004). Sería necesaria sin embargo una caracterización más exhaustiva de la actividad de gp19, para determinar si es su caso.

Precisamente por su actividad dual (ATPasa y nucleasa) y por la transitoriedad de la interacción con la precabeza, las terminasas son proteínas altamente inestables y tendentes a agregar con facilidad (Hamada et al., 1986a; Morita et al., 1994; Nadal et al., 2010; Rao y Feiss, 2008). Esto ha condicionado, en el presente trabajo, tanto el grado de pureza como la concentración de la terminasa, limitando los análisis funcionales. Para poder abordar este problema nos propusimos una aproximación biofísica no convencional al estudio de la agregación de la gp19, usando la técnica de micropalancas en régimen agregado (Mertens et al., 2012a). Se realizó un análisis detallado del proceso de agregación de la gp19, mediante la inmovilización de concentraciones superiores a 40 ng/ml sobre micropalancas funcionalizadas con DSP (ver apartado R5.3). A concentraciones elevadas de proteína se producían fuerzas atractivas entre las moléculas de gp19, que pasaba de estar organizada en una monocapa sobre la superficie a formar agregados de gran tamaño, como muestran las imágenes de AFM (ver Figura R24B). Dado que las fuerzas entre las proteínas y el DSP eran mayores que las fuerzas entre proteínas, las islas de gp19 eran características de concentraciones elevadas (régimen agregado) y producto de una reorganización de la monocapa debida a las fuerzas intermoleculares. La interacción de estos agregados de gp19 con el ATP y el AMP-PNP producía una flexión genuina en la micropalanca, que no sucedía con el ADP y se asignaba tentativamente a la unión de sendos nucleótidos (no a la hidrólisis, ya que el AMP-PNP no es hidrolizable). La visualización mediante AFM de la gp19 tras la interacción con ATP mostraba estructuras de menor tamaño y altura, sugiriendo la

disolución de los agregados producto de la interacción con el nucleótido (ver Figura R27A). Es importante puntualizar que no existe ninguna prueba de que esta desagregación genere ensamblados funcionales. Básicamente, los ensayos con micropalanca en el régimen agregado permiten detectar, mediante una técnica novedosa y de gran sensibilidad, la tendencia a agregar de la gp19. En ellos mimetizamos el proceso de agregación, durante la inmovilización sobre la superficie, y la posterior desagregación producto de la interacción con el nucleótido. Sin embargo, la importancia de estos experimentos reside no tanto en la detección de la interacción con ATP (no olvidemos que estamos en un contexto de agregación de gp19) sino de la visualización, en tiempo real y con una alta sensibilidad, del proceso de agregación y desagregación de la terminasa.

D1. 2. RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DEL COMPLEJO PORTAL Y SEGMENTACIÓN DE LA TERMINASA.

La determinación de la estructura 3D del complejo portal, formado por la terminasa y el conector, revelaba no sólo el desacople de simetrías existente entre los dos componentes, sino la continuidad del canal a lo largo de la estructura y la orientación de la terminasa dentro del complejo. Como el primer punto se ha revisado en el apartado anterior, simplemente añadiremos que aunque el desajuste de simetrías entre conector y precabeza fue utilizado principalmente para apoyar la hipótesis de la existencia de la rotación del conector durante la traslocación, los experimentos en $\Phi 29$ y T4 descartan esta posibilidad (Baumann et al., 2006; Hugel et al., 2007).

Por otro lado, la estructura del complejo portal mostraba un canal continuo y variable en diámetro a lo largo del eje longitudinal del complejo. El diámetro mínimo de este canal se encuentra en el extremo correspondiente a la terminasa y tiene una anchura de 30 Å en su región más estrecha, garantizando la ausencia de impedimentos estéricos a la traslocación del ADN. En la región de las alas, el canal del conector presenta un diámetro máximo de 55 Å. La anchura media del canal del conector permitiría el paso fluido del ácido nucleico evitando la interacción estrecha de éste con el conector y el consiguiente estancamiento del proceso de traslocación. La estructura del conector de T7 resuelta por criome mostraba un canal de 33 Å de diámetro en el extremo correspondiente al tallo, que concuerda con el medido en la interfase del complejo portal, y de 85 Å en la región de la corona (Agirrezabala et al., 2005b). La diferencia de diámetro en la corona, unida a la desaparición de la misma en la reconstrucción del conector aislado, podría sugerir eventualmente cierta flexibilidad conformacional en esa región.

En $\Phi 29$, las paredes electronegativas del conector “repelen” el ácido nucleico, evitando los posibles choques y favoreciendo el desplazamiento coaxial del ADN por el canal (Guasch et al., 2002). Tanto el diámetro del canal, como sus paredes mayoritariamente electronegativas son características conservadas en numerosos conectores virales (Cuervo y Carrascosa, 2012b). En T7 el canal del complejo portal supone la continuación del canal formado por el core y el conector (Agirrezabala et al., 2005a). En el fago P22, donde no existe el core, el canal

continuo hacia el interior de la precabeza estaría formado por una estructura en forma de barril de 40 Å de diámetro, que ocupa una posición equivalente (Olia et al., 2011). Ambas estructuras, el core de T7 y el barril del conector de P22, además de presentar canales semejantes (35 y 40 Å de diámetro respectivamente) están implicadas en el mecanismo de eyección, lo que refuerza el paralelismo entre ambas. En el otro extremo del canal, interaccionando con la terminasa mayor, se situaría la terminasa menor, encargada de reconocer y unir la molécula de ADN (Rao y Feiss, 2008). Los modelos propuestos de envoltura del ácido nucleico sobre la terminasa menor sugieren una interacción no coaxial entre las terminasas mayor y menor (Buttner et al., 2012; Sun et al., 2011). Sería esperable que este tipo de interacciones de la terminasa menor con el ADN y con la terminasa mayor estuvieran relacionadas con sus funciones de reconocimiento del ADN y de regulación de la actividad de la terminasa mayor, respectivamente.

Por último, la estructura segmentada de la terminasa en el complejo portal sugería la orientación de ésta en el complejo, que fue posteriormente confirmada con su ajuste al modelo atómico (ver Figura R19). Este ajuste permitió localizar en el dominio amino de la terminasa de T7 la interacción con el conector, de acuerdo con lo propuesto para T4 (Hegde et al., 2012; Sun et al., 2008). Sin embargo inicialmente tanto en el fago T3 como en T4 se había sugerido la implicación de ambos dominios en la interacción con el conector (Kanamaru et al., 2004; Morita et al., 1995a) proponiéndose después en T4 que ésta residía en el dominio carboxilo de la terminasa (Dixit et al., 2011), como sucedía en el fago λ (Yeo y Feiss, 1995a; Yeo y Feiss, 1995b).

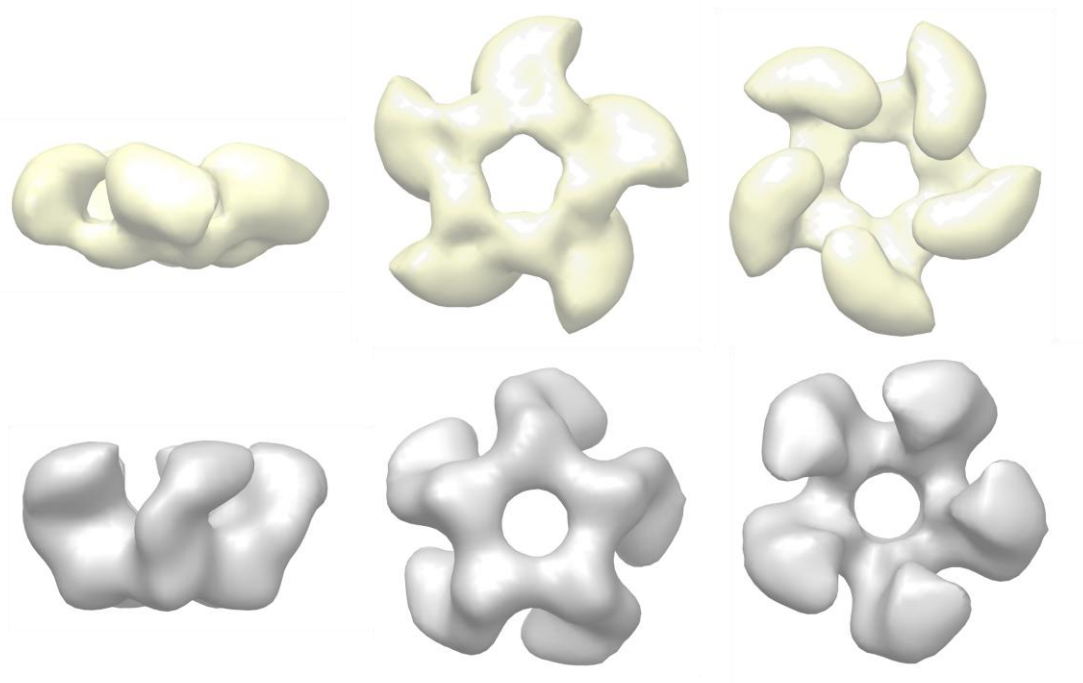


FIGURA D1. Comparación de las dos conformaciones de la terminasa en tres orientaciones distintas. El volumen amarillo corresponde a la terminasa aislada y el gris a la densidad de la terminasa segmentada del complejo portal.

Finalmente, el resultado más revelador de la segmentación de la terminasa es la existencia de un cambio conformacional basado en la reordenación de los

monómeros. Las dos conformaciones de terminasa descritas (aislada y segmentada del complejo) se comparan en la figura D1. El incremento en altura y la compactación del canal en la conformación del complejo se deben a un cambio en la posición de los lóbulos de la terminasa, que siguen manteniendo cierta vorticidad. Aunque no podemos descartar la presencia de cambios adicionales intra-dominio como los propuestos para las terminasas de T4 y Φ 12 (Mancini et al., 2004; Sun et al., 2008), éstos no parecen responsables de las diferencias morfológicas presentadas a esta resolución. Las dos conformaciones de la terminasa de T7 configuran dos entornos electrostáticos diferentes para su potencial interacción con el ADN a través del canal (ver figura R21A). Mientras el canal de la terminasa aislada presenta una gran superficie electropositiva, en canal de la terminasa ensamblada en el conector es más electronegativo, en consistencia con una interacción fluida con el ADN. La región ATPasa se encuentra, en ambas conformaciones, formando parte de una sola subunidad, igual que en la terminasa del fago T4 y en FtsK, una ATPasa hexamérica traslocadora de ADN bicatenario durante la división celular (Massey et al., 2006; Sun et al., 2008). Sin embargo, la localización de las regiones ATPasa en la interfase de las subunidades (aunque con variaciones en la orientación) se encuentra en la ATPasa empaquetadora del fago Φ 12 y en numerosas ATPasas de la familia AAA+ (Davey et al., 2002; Mancini et al., 2004; Ye et al., 2004). En la gp19 se mantiene en ambas conformaciones: la accesibilidad de la región ATPasa en el exterior de los lóbulos, lo que facilitaría la unión e hidrólisis del ATP, y la orientación de la región nucleasa hacia el canal, como se esperaría de la interacción con el ADN (Figura D2). Los entornos electrostáticos y la ubicación de las regiones catalíticas en ambas conformaciones dan lugar a dos estados funcionales tentativamente implicados en la traslocación secuencial del ADN, como discutiremos en el siguiente apartado.

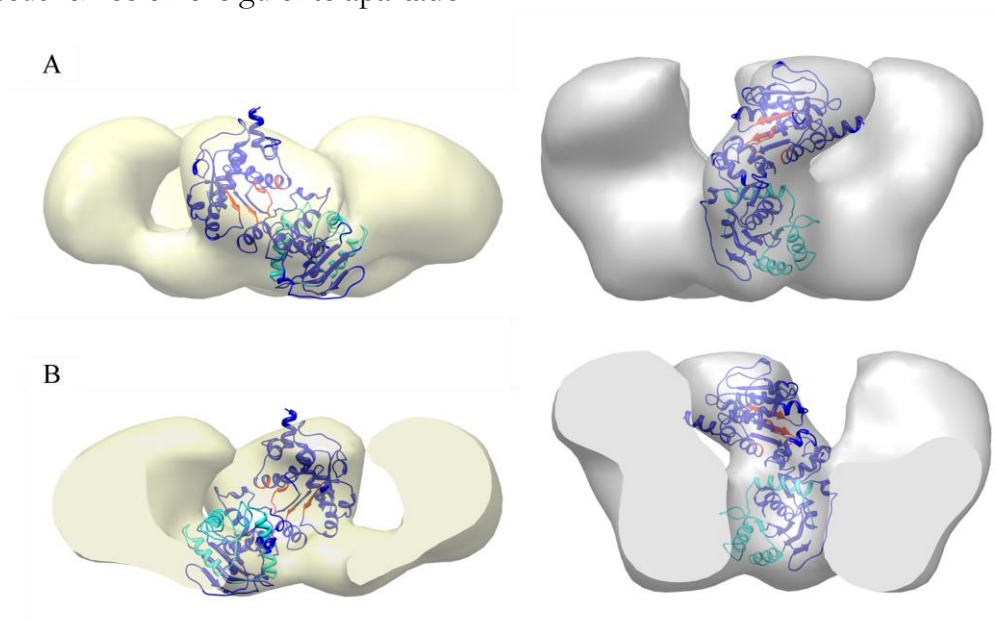


FIGURA D2. Localización de las regiones catalíticas de gp19 en las dos conformaciones. A. Encaje del modelo atómico de gp19 en el mapa de ME de la terminasa aislada (en amarillo) y segmentada del complejo (en gris) en vista lateral. B. Corte longitudinal de los volúmenes en vista lateral. Los motivos ATPasa se muestran en rojo y la región nucleasa en cian.

D2. CAMBIO CONFORMACIONAL DE LA TERMINASA.

El encaje del modelo atómico de la gp19 en los volúmenes correspondientes a las dos conformaciones de la terminasa revelaba un cambio de cuerpo rígido en la posición de los monómeros. Utilizando el programa CHIMERA generamos una trayectoria hipotética para este cambio conformacional (ver video suplementario). Aunque el movimiento de las cinco subunidades se muestra simultáneamente para facilitar la visualización del cambio global, es igualmente posible que el cambio conformacional de las subunidades sea asincrónico, como sucede en las subunidades de la chaperonina CCT (Munoz et al., 2011). La simulación propuesta es hipotética y sólo pretende reflejar la ausencia de un movimiento drástico en el paso de una conformación a otra. Sin embargo, lo novedoso del cambio conformacional propuesto reside en que se trata de un cambio en la topología de los monómeros y no exclusivamente de un cambio intra-monomérico de flexión entre los dos dominios, como se había descrito en las terminasas de los fagos $\Phi 12$ y T4 (Mancini et al., 2004; Sun et al., 2008) y en otras ATPasas hexaméricas como FtsK, TrwB (implicada en la traslocación de ADN durante la conjugación bacteriana) y HslU (encargada de la traslocación de péptidos hacia cámaras proteolíticas) (Bochtler et al., 2000; Gomis-Ruth et al., 2001; Massey et al., 2006; Sousa et al., 2000).

En el caso de la ATPasa hexamérica del fago $\Phi 12$, el bucle P (perteneciente al motivo Walker A) pasaba de una posición hacia arriba a una hacia abajo en presencia de dos análogos diferentes de ATP. Este cambio conformacional se debía a la hidrólisis del ATP y generaba, mediante un movimiento de palanca, el desplazamiento del ARN hacia el interior de la cabeza (Mancini et al., 2004). En el caso de la terminasa del fago T4, se propuso la existencia de dos conformaciones, relajada y tensa, que correspondían respectivamente al volumen de criome (obtenido mediante la extracción por segmentación del volumen de la precabeza) y a la estructura cristalográfica del monómero de gp17. El encaje entre ambas sólo era posible desplazando un dominio con respecto al otro y flexionando la región bisagra. Las fuerzas electrostáticas de atracción y repulsión entre ambos dominios, debidas a las cargas de los productos de reacción, dirigían el cambio conformacional provocando la traslocación del ADN. La ATPasa empaquetadora del fago $\Phi 12$ interacciona con varios vértices de la cápsida para traslocar los tres precursores genómicos de ARN monocatenario (mientras que la gp19 trasloca ADN bicatenario) y presenta simetría hexamérica (frente a la pentamérica de la gp19). Estas diferencias entre la gp19 y la P4 (de $\Phi 12$) podrían explicar la diferencia de sus cambios conformacionales. Sin embargo, en el caso de las terminasas de los fagos T7 y T4, las similitudes en cuanto a genoma, simetría y dimensiones son considerables, por lo que cabría esperar un cambio conformacional semejante. Curiosamente, los experimentos de pinzas ópticas con la terminasa del fago T4 mostraban variaciones considerables en parámetros como la velocidad y la procesividad, que llevaron a los autores a sugerir la existencia de varios estados conformacionales, activos e interconvertibles, implicados en la traslocación del ADN (Fuller et al., 2007a). Estos cambios conformacionales podrían eventualmente incluir transiciones inter-monoméricas como las demostradas en T7. La coexistencia de movimientos de cuerpo rígido entre dominios y de cambios conformacionales

intra-dominio ya había sido sugerida en la helicasa monomérica PcrA (Velankar et al., 1999). Además, la caracterización estructural de los dos estados conformacionales de gp19 (relacionados mediante cambios inter-monoméricos) no excluye la existencia de cambios intra-monoméricos adicionales que, en las condiciones ensayadas y a la resolución obtenida (20-30 Å), pudieran estar quedando enmascarados. Para poder estudiar este problema se realizaron experimentos de micropalancas en régimen de monocapa, que abrían la posibilidad de detectar la eventual presencia de cambios intra-monoméricos.

En los ensayos de micropalancas con la monocapa de gp19 en presencia de ATP (ver apartado R5.5 y figura R29) se detectaba la presencia de escalones asociados a eventos de hidrólisis. La amplitud de los escalones (muy superior a la que generaría un solo motor) sugería que estábamos ante un fenómeno colectivo, en el que la unión a la superficie producía el acoplamiento de los motores. Por otro lado, la determinación de la tasa de transición más lenta de lo esperable para un solo motor, podía explicarse debido a la constricción que ejercía el anclaje a la superficie y al impedimento estérico ocasionado por el empaquetamiento de la monocapa. En estas condiciones asumíamos que sin el constreñimiento de la superficie, la gp19 podría ejecutar su cambio conformacional de forma desacoplada. En multitud de ATPasas se había relacionado el cambio conformacional con eventos químicos como la unión del ATP (en motores tipo recA como la F₁ATPasa), su hidrólisis (como en la P4 de Φ 12 y la kinesina implicada en la contracción muscular) o la liberación de los productos (como en la helicasa Urv y la traslocasa FtsK) (Abrahams et al., 1994; Lee y Guo, 2006; Mancini et al., 2004; Massey et al., 2006; Menz et al., 2001; Rice et al., 1999). La vinculación de las transiciones observadas en las micropalancas con cambios intra-monoméricos producto de la hidrólisis de ATP abriría la posibilidad de que el cambio inter-monomérico no estuviera originado por un fenómeno químico, sino por la unión física del conector. Es decir, la ausencia de conector en los experimentos de micropalancas estaría impidiendo la realización del cambio conformacional inter-monomérico (pues éste requeriría la interacción con el conector). Sin embargo las imágenes de AFM, que muestran el desensamblaje de los oligómeros de gp19 tras la interacción con el ATP (ver Figura R30), ofrecen una nueva interpretación. En ausencia del conector, la energía generada tras la hidrólisis del ATP era tan grande que provocaba el desensamblaje de los oligómeros en monómeros. Es decir, sin la estabilización que proporcionaría la unión al conector, los oligómeros se desensamblan producto de la liberación abrupta de estrés que provoca la hidrólisis. Estaríamos observando, por tanto, el cambio inter-monomérico de la terminasa que al no estar unida al conector, se desensambla. Una manera de completar este estudio consistiría en realizar estos ensayos con los complejos terminasa/conector, para saber si en presencia de conector se produce el desensamblaje del oligómero de gp19. Dado que la terminasa interacciona con el conector a través de su dominio amino, la formación del complejo no debería afectar a la unión a la superficie, que se realiza a través de las histidinas presentes en el extremo carboxilo de la terminasa. Sin embargo, el que los experimentos de micropalancas reflejen un fenómeno colectivo, en los que el cambio conformacional se detecta de manera indirecta y asociado a un evento químico (unión e hidrólisis de nucleótido) no mecánico (de interacción con el conector), y en los que se está

produciendo una constricción en el lado opuesto al que ejercería la precabeza *in vivo*, impone prudencia a la hora de determinar la naturaleza del cambio conformacional observado. De hecho, pensamos que es muy posible que se estén dando los dos tipos de cambios conformacionales, y que lo observado experimentalmente corresponda a la suma de ambos.

D3. MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN DEL ADN

Aunque los modelos de traslocación de ADN fueron propuestos históricamente en base a resultados bioquímicos y estructurales (ver apartado I4), el creciente desarrollo de las pinzas ópticas aplicadas al estudio del empaquetamiento ha proporcionado novedosas y rompedoras aportaciones.

Los experimentos de molécula única con $\Phi29$, λ y T4 demostraron la elevadísima procesividad de sus motores, que empaquetaban miles de pb de forma continua aunque con pausas y resbalones. De hecho, a la capacidad de los motores de parar, resbalar y cambiar su velocidad se le había otorgado un significado biológico basado en el acoplamiento de procesos que sucedían en el mismo ADN sustrato, como la transcripción, recombinación y reparación del mismo (Chemla y Smith, 2012). En $\Phi29$ se había mostrado que la traslocación del ADN sucedía en algún paso intermedio entre la hidrólisis del ATP y la liberación del P_i , antes de la liberación del ADP (Chemla et al., 2005). La aparición de las pinzas de alta resolución permitió determinar que la unión de ATP sucedía exclusivamente durante las pausas, y que la traslocación del ADN tenía un paso de 10 pb, que posteriormente se reveló compuesto de cuatro pasos consecutivos de 2'5 pb (Moffitt et al., 2009). La diferencia respecto a los 2 pb por molécula de ATP hidrolizada estimados inicialmente en $\Phi29$ y T3 (Guo et al., 1987; Morita et al., 1993) se justificaba por la falta de suficiente precisión de los experimentos bioquímicos que consideraban la actividad ATPasa basal de complejos no funcionales o la hidrólisis fútil por parte de proteínas activas (Chemla y Smith, 2012). Los resultados de molécula única contradecían además la idea clásica de una subunidad uniendo, hidrolizando y traslocando ADN, por la de un motor uniendo varias moléculas de ATP en un periodo de pausa para después traslocar el ADN durante una fase de “empuje”. A continuación se determinó que la interacción entre la terminasa y el ADN cambiaba a lo largo del ciclo mecano-químico dando lugar a dos tipos de contacto durante los periodos de pausa (en los que se producía la unión de ATP) y de empuje (en los que se traslocaban 10 pb en pasos de 2'5 pb). En las pausas los contactos de la terminasa con la hebra 5'-3' de ADN eran esenciales y de tipo electrostático, probablemente generando un entorno estable para la unión del nucleótido. Durante la traslocación del ADN los contactos de la terminasa con los fosfatos eran más débiles y transitorios, favoreciendo la rápida encapsidación del ADN. La existencia de dos tipos de contactos revelaba por tanto la naturaleza secuencial de la traslocación del ADN (Aathavan et al., 2009). Esto concuerda con las dos conformaciones descritas en T7: el estado aislado de la terminasa presentaba un canal electropositivo, donde presumiblemente la interacción con el ADN sería más fuerte y podría corresponder al estado de pausa; la conformación en el

complejo, con un canal esencialmente electronegativo, sustentaría una interacción más débil que podría equipararse con la propuesta en la fase de empuje o traslocación del ADN. De hecho, la existencia de dos tipos de contactos (fuerte y débil) entre la FtsK y el ADN fue clave en la propuesta del mecanismo de traslocación de este motor (Massey et al., 2006).

También mediante pinzas ópticas se determinaron dos tipos de interacción de la terminasa de $\Phi 29$ con el ATP, que contribuían a la activación alostérica de subunidades adyacentes (Moffitt et al., 2009; Moffitt et al., 2010). La existencia de dos estados de unión al nucleótido (activo e inactivo) se había sugerido para la ATPasa de $\Phi 12$, y su vinculación con el cambio conformacional fue propuesto inicialmente en la terminasa de T4 (Leffers y Rao, 2000; Mancini et al., 2004). Estos resultados señalan además la cooperatividad existente entre subunidades, que había sido descrita en ATPasas hexaméricas como FtsK (donde subunidades individuales no podían hidrolizar ATP independientemente del resto de subunidades) o P4 (donde la unión/hidrólisis/liberación del nucleótido sucedía de forma secuencial y acoplada implicando varias subunidades al mismo tiempo) (Mancini et al., 2004; Massey et al., 2006). En la terminasa de T4 la sincronización de la hidrólisis entre una subunidad y la siguiente se llevaba a cabo a través del ADN, gracias al acople de simetrías entre éste y la terminasa (Sun et al., 2008). Es decir que la propia estructura del ADN contribuía a la cooperación entre las 5 subunidades. En el caso de la gp19, un cambio inter-monomérico como el propuesto, tanto si se realiza de un modo concertado o sincronizado, requiere si no cooperatividad, al menos cierta coordinación entre subunidades. Los últimos trabajos del grupo de Bustamante (comunicación personal) sugieren la existencia de una subunidad “especial”, estructuralmente idéntica a las otras, que adquiere su función por la posición que ocupa respecto al ADN. Esta subunidad también hidroliza el ATP, pero esta liberación de energía no se emplea en traslocar el ADN sino en reiniciar el ciclo haciendo rotar el ácido nucleico.

Un punto esencial en los modelos de traslocación es la rotación o bien del conector o bien del ácido nucleico (Hendrix, 1998). Los primeros modelos desestimaron la rotación del ADN debido a que su curvatura (al interactuar con las paredes internas de la precabeza) y retorcimiento (ocasionado por su eventual rotación durante el empaquetamiento) introducirían tensiones intolerables dentro de la precabeza (Guasch et al., 2002). Esto sumado al desacople de simetría, llevó a Hendrix a proponer la rotación del conector (Hendrix, 1978) asumida en multitud de modelos (Guasch et al., 2002; Lebedev et al., 2007; Simpson et al., 2000). Una vez demostrada la ausencia de rotación del conector en los sistemas $\Phi 29$ y T4 (Baumann et al., 2006; Hugel et al., 2007) cobraron relevancia los modelos centrados en las terminasas (Sun et al., 2008; Williams et al., 2008). Sin embargo, el modelo propuesto para la ATPasa empaquetadora del fago $\Phi 12$ no contemplaba la rotación relativa del ADN o de la proteína, sino que se apoyaba en las interacciones cooperativas entre sitios activos adyacentes de las subunidades. Esto aseguraría la apropiada sincronización de la hidrólisis y la traslocación de ARN (Mancini et al., 2004). Por el contrario, recientes experimentos de pinzas ópticas con precabezas de $\Phi 29$ demostraban la rotación del ADN mediante el giro de una microesfera unida a la cadena de ADN que está siendo empaquetado en una precabeza inmovilizada.

Esto se correspondía con el giro de 14° de la molécula de ADN que realizaba la subunidad “especial” para posicionar el ADN nuevamente en fase tras la traslocación (Carlos Bustamante, comunicación personal). En el mecanismo de traslocación de FtsK, la rotación del ADN aseguraba que éste quedara en fase con la siguiente subunidad de la ATPasa y garantizaba la progresión del ciclo (Massey et al., 2006). En este sentido, un cambio conformacional como el propuesto para la terminasa de T7 (ver video suplementario) podría acompañar de alguna manera la rotación del ADN. Sin embargo, esto no deja de ser una especulación, ya que sería igualmente posible que el ADN no rotara al entrar en la precabeza sino que se deslizara excéntrico al canal y de manera fluida. Según esta hipótesis los cambios conformacionales de la terminasa actuarían simplemente como tope para evitar que el ADN resbalara fuera de la precabeza. Esta función de “válvula de no retorno” ya había sido propuesta para el conector de $\Phi 29$ (Morais et al., 2008).

Como hemos comentado en los párrafos precedentes, se han postulado distintos tipo de interacciones entre la terminasa y el ATP, así como entre la terminasa y el ADN (contactos iónicos fuerte durante las pausas y contactos débiles y transitorios durante el empuje del ADN). También se ha reportado la existencia de cooperatividad entre subunidades durante la unión e hidrólisis del ATP, y la implicación de una de las subunidades (la subunidad “especial”) en la reiniciación del ciclo de hidrólisis y rotación del ADN. Estos resultados conforman una imagen esencialmente dinámica del proceso de traslocación, durante el cual se producen multitud de interacciones diferentes entre los componentes implicados. Es factible pensar que estos distintos tipos de interacción conlleven cambios estructurales. Es decir, la terminasa multimérica no es en absoluto una molécula rígida, sino un anillo dinámico que varía conformacionalmente al interactuar con moléculas tan diversas como el ATP y los productos de hidrólisis, el ADN y el conector. La interacción con el ATP y la hidrólisis/liberación de productos podrían estar eventualmente soportadas por cambios intra-moleculares en la terminasa. Esto concordaría con lo propuesto para la ATPasa de $\Phi 12$, donde se observaban estructuras diferentes en presencia de distintos nucleótidos y cambios locales en residuos concretos del sitio de unión a nucleótido (Mancini et al., 2004). Podría explicar también la naturaleza del cambio conformacional detectado mediante micropalanca en régimen de monocapa, condicionado por la hidrólisis del nucleótido. Por otra parte, variaciones más dramáticas como la traslocación del ADN o su eventual rotación, podrían deberse a un cambio inter-monómero similar al mostrado. Las dos conformaciones presentadas podrían estar reflejando dos estados o pasos de la traslocación secuencial del ADN. La actividad asociada al oligómero de la terminasa purificada (conformación aislada) y la interacción con el conector (conformación segmentada del complejo) sugieren que ambas conformaciones son genuinas y que por tanto podrían estar implicadas en el empaquetamiento. Es posible asimismo que este cambio conformacional pueda estar relacionado con un carácter regulador del proceso, tanto del mencionado acoplamiento entre hidrólisis y traslocación, como de la influencia de otros factores (como el grado de llenado de la precabeza) en la dinámica del empaquetamiento.

Como hemos descrito, el mecanismo de empaquetamiento de DNA en virus presenta diversos aspectos de interés general, dados los paralelismos existentes entre terminasas, helicasas y otras proteínas motoras, aunque dista de ser entendido en su totalidad. Esto, sumado a las diferencias propias de cada sistema, lo convierten en un proceso enormemente complejo. Es evidente que para avanzar en su comprensión es necesario llevar a cabo estudios que combinen información estructural (de alta y media resolución) y funcional (como las aportaciones de las pinzas ópticas y micropalancas), con la caracterización bioquímica, lo que permitirá en un futuro obtener una imagen detallada de estos importantes procesos.

Conclusiones

1. La reconstrucción tridimensional de la terminasa mayor del fago T7 muestra la existencia de simetría pentamérica y la presencia de un canal lo suficientemente ancho para acomodar ADN bicatenario. La actividad ATPasa del oligómero y la exactitud del ajuste del modelo atómico en el volumen de microscopía sugieren fuertemente la relevancia de la estructura presentada.
2. La estructura del complejo portal purificado resuelto por microscopía electrónica revela la orientación de la terminasa en el complejo terminasa/conector y una conformación diferente de ésta cuando se encuentra unida al conector.
3. Ambas conformaciones de la terminasa (aislada y formando complejo) presentan su región nucleasa orientada hacia el canal electronegativo, lo que sugiere la implicación del canal en la traslocación del ADN. Además, la accesibilidad de la región ATPasa en ambas conformaciones favorecería la unión e hidrólisis de ATP.
4. El cambio conformacional de la terminasa podría tener lugar sin necesidad de un cambio entre las posiciones de los dos dominios de los monómeros, como demuestra el ajuste del modelo atómico de gp19 en el volumen de la terminasa segmentado del complejo. Este cambio podría estar implicado en la traslocación secuencial del ADN, pudiendo ser las conformaciones mostradas dos pasos del mecanismo de empaquetamiento.
5. La inmovilización de terminasas en la superficie de las micropalancas muestra dos regímenes distintos, monocapa y agregado, dependiendo de la concentración de gp19 inyectada en el sistema.
6. La considerable sensibilidad del sistema de micropalancas permite distinguir la interacción de la terminasa con distintos nucleótidos. Encontramos cambios conformacionales significativos tras la interacción con el ATP. El tipo de interacción de la terminasa con el ATP está condicionado por la reorganización bidimensional o tridimensional de ésta sobre la superficie.

Conclusiones

7. El régimen de monocapa muestra una respuesta escalonada frente al ATP que indica una liberación acoplada del estrés tensil acumulado por las terminasas durante la hidrólisis de ATP. Esta liberación provoca la desestabilización de los oligómeros de gp19.
8. En el régimen agregado el cambio conformacional se relaciona con la unión de ATP o de AMP-PNP. El desensamblaje de los agregados de gp19 se debe a la interacción con el ATP.

Bibliografía

- Athavan, K., Politzer, A. T., Kaplan, A., Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., y Bustamante, C. (2009). Substrate interactions and promiscuity in a viral DNA packaging motor. *Nature* *461*, 669-673.
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., y Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* *370*, 621-628.
- Adams, M. H. (1950). *Bacteriophages*, Vol (New York: Wiley-Interscience Publishers, Inc.).
- Agirrezabala, X., Martin-Benito, J., Caston, J. R., Miranda, R., Valpuesta, J. M., y Carrascosa, J. L. (2005a). Maturation of phage T7 involves structural modification of both shell and inner core components. *Embo J* *24*, 3820-3829.
- Agirrezabala, X., Martin-Benito, J., Valle, M., Gonzalez, J. M., Valencia, A., Valpuesta, J. M., y Carrascosa, J. L. (2005b). Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8Å resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. *J Mol Biol* *347*, 895-902.
- Agirrezabala, X., Velazquez-Muriel, J. A., Gomez-Puertas, P., Scheres, S. H., Carazo, J. M., y Carrascosa, J. L. (2007). Quasi-atomic model of bacteriophage t7 procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure* *15*, 461-472.
- Aksyuk, A. A., y Rossmann, M. G. (2011). Bacteriophage assembly. *Viruses* *3*, 172-203.
- Alcorlo, M., Gonzalez-Huici, V., Hermoso, J. M., Meijer, W. J., y Salas, M. (2007). The phage phi29 membrane protein p16.7, involved in DNA replication, is required for efficient ejection of the viral genome. *J Bacteriol* *189*, 5542-5549.
- Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K., y Toda, A. (2001). A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12468-12472.
- Arlett, J. L., Myers, E. B., y Roukes, M. L. (2011). Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nat Nanotechnol* *6*, 203-215.
- Baker, M. L., Jiang, W., Rixon, F. J., y Chiu, W. (2005). Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J Virol* *79*, 14967-14970.
- Bamford, D. H., Grimes, J. M., y Stuart, D. I. (2005). What does structure tell us about virus evolution? *Curr Opin Struct Biol* *15*, 655-663.

- Baumann, R. G., Mullaney, J., y Black, L. W. (2006). Portal fusion protein constraints on function in DNA packaging of bacteriophage T4. *Mol Microbiol* *61*, 16-32.
- Beck, P. J., Gonzalez, S., Ward, C. L., y Molineux, I. J. (1989). Sequence of bacteriophage T3 DNA from gene 2.5 through gene 9. *J Mol Biol* *210*, 687-701.
- Berger, R., Delamarche, E., Lang, H. P., Gerber, C., Gimzewski, J. K., Meyer, E., y Güntherodt, H. J. (1997). Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold. *Science* *276*, 2021-2024.
- Binnig, G., Quate, C. F., y Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* *56*, 930-933.
- Black, L. W. (1981). In vitro packaging of bacteriophage T4 DNA. *Virology* *113*, 336-344.
- Black, L. W. (1995). DNA packaging and cutting by phage terminases: control in phage T4 by a synaptic mechanism. *Bioessays* *17*, 1025-1030.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., y Huber, R. (2000). The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* *403*, 800-805.
- 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.
- Braun, T., Ghatkesar, M. K., Backmann, N., Grange, W., Boulanger, P., Letellier, L., Lang, H. P., Bietsch, A., Gerber, C., y Hegner, M. (2009). Quantitative time-resolved measurement of membrane protein-ligand interactions using microcantilever array sensors. *Nat Nanotechnol* *4*, 179-185.
- Brussow, H., y Hendrix, R. W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell* *108*, 13-16.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., y Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* *5*, 376-379.
- Burg, T. P., Godin, M., Knudsen, S. M., Shen, W., Carlson, G., Foster, J. S., Babcock, K., y Manalis, S. R. (2007). Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* *446*, 1066-1069.
- Buttner, C. R., Chechik, M., Ortiz-Lombardia, M., Smits, C., Ebong, I. O., Chechik, V., Jeschke, G., Dykeman, E., Benini, S., Robinson, C. V., *et al.* (2012). Structural basis for DNA recognition and loading into a viral packaging motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 811-816.
- Cardarelli, L., Lam, R., Tuite, A., Baker, L. A., Sadowski, P. D., Radford, D. R., Rubinstein, J. L., Battaile, K. P., Chirgadze, N., Maxwell, K. L., y Davidson, A. R. (2010). The crystal structure of bacteriophage HK97 gp6: defining a large family of head-tail connector proteins. *J Mol Biol* *395*, 754-768.
- Carrascosa, J. L. V., J.M. (1999). Bacteriophage connectors: structural features of a DNA traslocating motor. *Recent Res Devel Virol* *1*, 449-465.

- Casjens, S., Wyckoff, E., Hayden, M., Sampson, L., Eppler, K., Randall, S., Moreno, E. T., y Serwer, P. (1992). Bacteriophage P22 portal protein is part of the gauge that regulates packing density of intravirion DNA. *J Mol Biol* 224, 1055-1074.
- Casjens, S. R. (2011). The DNA-packaging nanomotor of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* 9, 647-657.
- Cerritelli, M. E., Conway, J. F., Cheng, N., Trus, B. L., y Steven, A. C. (2003). Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. *Adv Protein Chem* 64, 301-323.
- Cerritelli, M. E., y Studier, F. W. (1996). Purification and characterization of T7 head-tail connectors expressed from the cloned gene. *J Mol Biol* 258, 299-307.
- Crowther, R. A., Amos, L. A., Finch, J. T., De Rosier, D. J., y Klug, A. (1970). Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs. *Nature* 226, 421-425.
- Cue, D., y Feiss, M. (1997). Genetic evidence that recognition of cosQ, the signal for termination of phage lambda DNA packaging, depends on the extent of head filling. *Genetics* 147, 7-17.
- Cuervo, A., y Carrascosa, J. L. (2012a). Bacteriophages: Structure. eLS.
- Cuervo, A., y Carrascosa, J. L. (2012b). Viral connectors for DNA encapsulation. *Curr Opin Biotechnol* 23, 529-536.
- Cuervo, A., Vaney, M. C., Antson, A. A., Tavares, P., y Oliveira, L. (2007). Structural rearrangements between portal protein subunits are essential for viral DNA translocation. *J Biol Chem* 282, 18907-18913.
- Chacon, P., y Wriggers, W. (2002). Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J Mol Biol* 317, 375-384.
- Chemla, Y. R., Aathavan, K., Michaelis, J., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., y Bustamante, C. (2005). Mechanism of force generation of a viral DNA packaging motor. *Cell* 122, 683-692.
- Chemla, Y. R., y Smith, D. E. (2012). Single-molecule studies of viral DNA packaging. *Adv Exp Med Biol* 726, 549-584.
- Chen, D. H., Baker, M. L., Hryc, C. F., DiMaio, F., Jakana, J., Wu, W., Dougherty, M., Haase-Pettingell, C., Schmid, M. F., Jiang, W., *et al.* (2010). Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1355-1360.
- Chen, G. Y., Thundat, T., Wachter, E. A., y Wurmack, R. J. (1995). Adsorption-induced surface stress and its effects on resonance frequency of microcantilevers. *Journal of Applied Physics* 77, 3618-3622.
- Davey, M. J., Jeruzalmi, D., Kuriyan, J., y O'Donnell, M. (2002). Motors and switches: AAA+ machines within the replisome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 826-835.
- Davis, R. W., y Hyman, R. W. (1971). A study in evolution: the DNA base sequence homology between coliphages T7 and T3. *J Mol Biol* 62, 287-301.
- de Beer, T., Fang, J., Ortega, M., Yang, Q., Maes, L., Duffy, C., Berton, N., Sippy, J., Overduin, M., Feiss, M., y Catalano, C. E. (2002). Insights into

- specific DNA recognition during the assembly of a viral genome packaging machine. *Mol Cell* *9*, 981-991.
- de Haas, F., Paatero, A. O., Mindich, L., Bamford, D. H., y Fuller, S. D. (1999). A symmetry mismatch at the site of RNA packaging in the polymerase complex of dsRNA bacteriophage phi6. *J Mol Biol* *294*, 357-372.
 - Ding, F., Lu, C., Zhao, W., Rajashankar, K. R., Anderson, D. L., Jardine, P. J., Grimes, S., y Ke, A. (2011). Structure and assembly of the essential RNA ring component of a viral DNA packaging motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 7357-7362.
 - Dixit, A., Ray, K., Lakowicz, J. R., y Black, L. W. (2011). Dynamics of the T4 bacteriophage DNA packasome motor: endonuclease VII resolvase release of arrested Y-DNA substrates. *J Biol Chem* *286*, 18878-18889.
 - Dokland, T. (1999). Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell Mol Life Sci* *56*, 580-603.
 - Dong, M., Husale, S., y Sahin, O. (2009). Determination of protein structural flexibility by microsecond force spectroscopy. *Nat Nanotechnol* *4*, 514-517.
 - Draper, B., y Rao, V. B. (2007). An ATP hydrolysis sensor in the DNA packaging motor from bacteriophage T4 suggests an inchworm-type translocation mechanism. *J Mol Biol* *369*, 79-94.
 - Fernandez, J. J., Luque, D., Caston, J. R., y Carrascosa, J. L. (2008). Sharpening high resolution information in single particle electron cryomicroscopy. *J Struct Biol* *164*, 170-175.
 - Fokine, A., Leiman, P. G., Shneider, M. M., Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Steven, A. C., Black, L. W., Mesyanzhinov, V. V., y Rossmann, M. G. (2005). Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7163-7168.
 - Frackman, S., Siegele, D. A., y Feiss, M. (1985). The terminase of bacteriophage lambda. Functional domains for cosB binding and multimer assembly. *J Mol Biol* *183*, 225-238.
 - Fu, C. Y., Uetrecht, C., Kang, S., Morais, M. C., Heck, A. J., Walter, M. R., y Prevelige, P. E., Jr. (2011). A docking model based on mass spectrometric and biochemical data describes phage packaging motor incorporation. *Mol Cell Proteomics* *9*, 1764-1773.
 - Fujisawa, H., Kimura, M., y Hashimoto, C. (1990). In vitro cleavage of the concatemer joint of bacteriophage T3 DNA. *Virology* *174*, 26-34.
 - Fujisawa, H., Miyazaki, J. I., y Minagawa, T. (1978). In vitro packaging of phage T3 DNA. *Virology* *87*, 394-400.
 - Fujisawa, H., y Morita, M. (1997). Phage DNA packaging. *Genes Cells* *2*, 537-545.
 - Fujisawa, H., Shibata, H., y Kato, H. (1991). Analysis of interactions among factors involved in the bacteriophage T3 DNA packaging reaction in a defined in vitro system. *Virology* *185*, 788-794.
 - Fujisawa, H., y Yamagishi, M. (1981). Studies on factors involved in in vitro packaging of phage T3 dna. *Prog Clin Biol Res* *64*, 239-252.

- Fuller, D. N., Raymer, D. M., Kottadiel, V. I., Rao, V. B., y Smith, D. E. (2007a). Single phage T4 DNA packaging motors exhibit large force generation, high velocity, and dynamic variability. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 16868-16873.
- Fuller, D. N., Raymer, D. M., Rickgauer, J. P., Robertson, R. M., Catalano, C. E., Anderson, D. L., Grimes, S., y Smith, D. E. (2007b). Measurements of single DNA molecule packaging dynamics in bacteriophage lambda reveal high forces, high motor processivity, and capsid transformations. *J Mol Biol* *373*, 1113-1122.
- Gimzewski, J. K., Gerber, C., Meyer, E., y Schlittler, R. R. (1994). Observation of a chemical reaction using a micromechanical sensor. *Chemical Physics Letters* *217*, 589-594.
- Goetzinger, K. R., y Rao, V. B. (2003). Defining the ATPase center of bacteriophage T4 DNA packaging machine: requirement for a catalytic glutamate residue in the large terminase protein gp17. *J Mol Biol* *331*, 139-154.
- Gomis-Ruth, F. X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., y Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* *409*, 637-641.
- Gonzalez-Huici, V., Salas, M., y Hermoso, J. M. (2004). The push-pull mechanism of bacteriophage O29 DNA injection. *Mol Microbiol* *52*, 529-540.
- Gonzalez-Huici, V., Salas, M., y Hermoso, J. M. (2006). Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage phi29 DNA ejection. *Gene* *374*, 19-25.
- Grimes, S., y Anderson, D. (1989). In vitro packaging of bacteriophage phi 29 DNA restriction fragments and the role of the terminal protein gp3. *J Mol Biol* *209*, 91-100.
- Grimes, S., Ma, S., Gao, J., Atz, R., y Jardine, P. J. (2011). Role of phi29 connector channel loops in late-stage DNA packaging. *J Mol Biol* *410*, 50-59.
- Gual, A., Camacho, A. G., y Alonso, J. C. (2000). Functional analysis of the terminase large subunit, G2P, of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *J Biol Chem* *275*, 35311-35319.
- Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Ruth, F. X., Valpuesta, J. M., Sousa, N., Carrascosa, J. L., y Coll, M. (2002). Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. *J Mol Biol* *315*, 663-676.
- Guex, N., y Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* *18*, 2714-2723.
- Guo, P., Peterson, C., y Anderson, D. (1987). Prohead and DNA-gp3-dependent ATPase activity of the DNA packaging protein gp16 of bacteriophage phi 29. *J Mol Biol* *197*, 229-236.
- Hamada, K., Fujisawa, H., y Minagawa, T. (1986a). A defined in vitro system for packaging of bacteriophage T3 DNA. *Virology* *151*, 119-123.

- Hamada, K., Fujisawa, H., y Minagawa, T. (1986b). Overproduction and purification of the products of bacteriophage T3 genes 18 and 19, two genes involved in DNA packaging. *Virology* *151*, 110-118.
- Hanson, P. I., y Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 519-529.
- Harding, N. E., Ito, J., y David, G. S. (1978). Identification of the protein firmly bound to the ends of bacteriophage phi 29 DNA. *Virology* *84*, 279-292.
- Hashimoto, C., y Fujisawa, H. (1988). Packaging and transduction of non-T3 DNA by bacteriophage T3. *Virology* *166*, 432-439.
- Hegde, S., Padilla-Sanchez, V., Draper, B., y Rao, V. B. (2012). Portal-large terminase interactions of the bacteriophage T4 DNA packaging machine implicate a molecular lever mechanism for coupling ATPase to DNA translocation. *J Virol* *86*, 4046-4057.
- Hendrix, R. W. (1978). Symmetry mismatch and DNA packaging in large bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 4779-4783.
- Hendrix, R. W. (1998). Bacteriophage DNA packaging: RNA gears in a DNA transport machine. *Cell* *94*, 147-150.
- Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol* *61*, 471-480.
- Hess, H., Bachand, G. D., y Vogel, V. (2004). Powering nanodevices with biomolecular motors. *Chem Eur J* *10*, 2110-2116.
- Hingorani, M. M., y O'Donnell, M. (2000). A tale of toroids in DNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 22-30.
- Hohn, B. (1983). DNA sequences necessary for packaging of bacteriophage lambda DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 7456-7460.
- Hugel, T., Michaelis, J., Hetherington, C. L., Jardine, P. J., Grimes, S., Walter, J. M., Falk, W., Anderson, D. L., y Bustamante, C. (2007). Experimental Test of Connector Rotation during DNA Packaging into Bacteriophage varphi29 Capsids. *PLoS Biol* *5*, e59.
- Hwang, Y., y Feiss, M. (1996). Mutations affecting the high affinity ATPase center of gpA, the large subunit of bacteriophage lambda terminase, inactivate the endonuclease activity of terminase. *J Mol Biol* *261*, 524-535.
- Ibarra, B., Caston, J. R., Llorca, O., Valle, M., Valpuesta, J. M., y Carrascosa, J. L. (2000). Topology of the components of the DNA packaging machinery in the phage phi29 prohead. *J Mol Biol* *298*, 807-815.
- Isidro, A., Henriques, A. O., y Tavares, P. (2004a). The portal protein plays essential roles at different steps of the SPP1 DNA packaging process. *Virology* *322*, 253-263.
- Isidro, A., Santos, M. A., Henriques, A. O., y Tavares, P. (2004b). The high-resolution functional map of bacteriophage SPP1 portal protein. *Mol Microbiol* *51*, 949-962.
- Jiang, W., Chang, J., Jakana, J., Weigele, P., King, J., y Chiu, W. (2006). Structure of epsilon15 bacteriophage reveals genome organization and DNA packaging/injection apparatus. *Nature* *439*, 612-616.

- Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M. L., Prevelige, P. E., Jr., y Chiu, W. (2003). Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol* *10*, 131-135.
- Johnson, J. E., y Chiu, W. (2007). DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr Opin Struct Biol* *17*, 237-243.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., y Thornton, J. M. (1992). A new approach to protein fold recognition. *Nature* *358*, 86-89.
- Kainov, D. E., Tuma, R., y Mancini, E. J. (2006). Hexameric molecular motors: P4 packaging ATPase unravels the mechanism. *Cell Mol Life Sci* *63*, 1095-1105.
- Kanamaru, S., Kondabagil, K., Rossmann, M. G., y Rao, V. B. (2004). The functional domains of bacteriophage t4 terminase. *J Biol Chem* *279*, 40795-40801.
- Kang, S., Poliakov, A., Sexton, J., Renfrow, M. B., y Prevelige, P. E., Jr. (2008). Probing conserved helical modules of portal complexes by mass spectrometry-based hydrogen/deuterium exchange. *J Mol Biol* *381*, 772-784.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M. M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., *et al.* (2008). GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat Methods* *5*, 53-55.
- Lander, G. C., Tang, L., Casjens, S. R., Gilcrease, E. B., Prevelige, P., Poliakov, A., Potter, C. S., Carragher, B., y Johnson, J. E. (2006). The structure of an infectious P22 virion shows the signal for headful DNA packaging. *Science* *312*, 1791-1795.
- Lebedev, A. A., Krause, M. H., Isidro, A. L., Vagin, A. A., Orlova, E. V., Turner, J., Dodson, E. J., Tavares, P., y Antson, A. A. (2007). Structural framework for DNA translocation via the viral portal protein. *Embo J* *26*, 1984-1994.
- Lee, T. J., y Guo, P. (2006). Interaction of gp16 with pRNA and DNA for genome packaging by the motor of bacterial virus phi29. *J Mol Biol* *356*, 589-599.
- Leffers, G., y Rao, V. B. (2000). Biochemical characterization of an ATPase activity associated with the large packaging subunit gp17 from bacteriophage T4. *J Biol Chem* *275*, 37127-37136.
- Lhuillier, S., Gallopin, M., Gilquin, B., Brasiles, S., Lancelot, N., Letellier, G., Gilles, M., Dethan, G., Orlova, E. V., Couprie, J., *et al.* (2009). Structure of bacteriophage SPP1 head-to-tail connection reveals mechanism for viral DNA gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 8507-8512.
- Lin, H., y Black, L. W. (1998). DNA requirements in vivo for phage T4 packaging. *Virology* *242*, 118-127.
- Lin, H., Rao, V. B., y Black, L. W. (1999). Analysis of capsid portal protein and terminase functional domains: interaction sites required for DNA packaging in bacteriophage T4. *J Mol Biol* *289*, 249-260.
- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R., y Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* *128*, 82-97.

- Llorca, O. (2005). Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. *Acta Pharmacol Sin* 26, 1153-1164.
- Maluf, N. K., Yang, Q., y Catalano, C. E. (2005). Self-association properties of the bacteriophage lambda terminase holoenzyme: implications for the DNA packaging motor. *J Mol Biol* 347, 523-542.
- Malys, N., Chang, D. Y., Baumann, R. G., Xie, D., y Black, L. W. (2002). A bipartite bacteriophage T4 SOC and HOC randomized peptide display library: detection and analysis of phage T4 terminase (gp17) and late sigma factor (gp55) interaction. *J Mol Biol* 319, 289-304.
- Mancini, E. J., Kainov, D. E., Grimes, J. M., Tuma, R., Bamford, D. H., y Stuart, D. I. (2004). Atomic snapshots of an RNA packaging motor reveal conformational changes linking ATP hydrolysis to RNA translocation. *Cell* 118, 743-755.
- Manne, V., Rao, V. B., y Black, L. W. (1982). A bacteriophage T4 DNA packaging related DNA-dependent ATPase-endonuclease. *J Biol Chem* 257, 13223-13232.
- Marabini, R., y Carazo, J. M. (1994). Pattern recognition and classification of images of biological macromolecules using artificial neural networks. *Biophys J* 66, 1804-1814.
- Marabini, R., Masegosa, I. M., San Martin, M. C., Marco, S., Fernandez, J. J., de la Fraga, L. G., Vaquerizo, C., y Carazo, J. M. (1996). Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol* 116, 237-240.
- Marie, R., Jensenius, H., Thaysen, J., Christensen, C. B., y Boisen, A. (2002). Adsorption kinetics and mechanical properties of thiol-modified DNA-oligos on gold investigated by microcantilever sensors. *Ultramicroscopy* 91, 29-36.
- Massey, T. H., Mercogliano, C. P., Yates, J., Sherratt, D. J., y Lowe, J. (2006). Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* 23, 457-469.
- Matsuo-Kato, H., Fujisawa, H., y Minagawa, T. (1981). Structure and assembly of bacteriophage T3 tails. *Virology* 109, 157-164.
- Melero, R., Buchwald, G., Castano, R., Raabe, M., Gil, D., Lazaro, M., Urlaub, H., Conti, E., y Llorca, O. (2012). The cryo-EM structure of the UPF-EJC complex shows UPF1 poised toward the RNA 3' end. *Nat Struct Mol Biol* 19, 498-505, S491-492.
- Menz, R. I., Walker, J. E., y Leslie, A. G. (2001). Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell* 106, 331-341.
- Mertens, J., Alvarez, M., y Tamayo, J. (2005). Real-time profile of microcantilevers for sensing applications. *Applied Physics Letters* 87, 234102-234101.
- Mertens, J., Dauden, M. I., Carrascosa, J. L., y Tamayo, J. (2012a). Interaction of viral ATPases with nucleotides measured with a microcantilever. *Sensors and Actuators b Chem.*

- Mertens, J., Dauden, M. I., Carrascosa, J. L., y Tamayo, J. (2012b). Stepwise motion of a microcantilever driven by the hydrolysis of viral ATPases. *Nanotechnology* *23*, 015501.
- Mertens, J., Rogero, C., Calleja, M., Ramos, D., Martin-Gago, J. A., Briones, C., y Tamayo, J. (2008). Label-free detection of DNA hybridization based on hydration-induced tension in nucleic acid films. *Nat Nanotechnol* *3*, 301-307.
- Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Aathavan, K., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., y Bustamante, C. (2009). Intersubunit coordination in a homomeric ring ATPase. *Nature* *457*, 446-450.
- Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., y Bustamante, C. (2010). Mechanistic constraints from the substrate concentration dependence of enzymatic fluctuations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 15739-15744.
- Molineux, I. J. (2001). No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Mol Microbiol* *40*, 1-8.
- Moody, M. F. (1999). Geometry of phage head construction. *J Mol Biol* *293*, 401-433.
- Morais, M. C., Choi, K. H., Koti, J. S., Chipman, P. R., Anderson, D. L., y Rossmann, M. G. (2005). Conservation of the capsid structure in tailed dsDNA bacteriophages: the pseudoatomic structure of phi29. *Mol Cell* *18*, 149-159.
- Morais, M. C., Koti, J. S., Bowman, V. D., Reyes-Aldrete, E., Anderson, D. L., y Rossmann, M. G. (2008). Defining molecular and domain boundaries in the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Structure* *16*, 1267-1274.
- Morita, M., Tasaka, M., y Fujisawa, H. (1993). DNA packaging ATPase of bacteriophage T3. *Virology* *193*, 748-752.
- Morita, M., Tasaka, M., y Fujisawa, H. (1994). Analysis of functional domains of the packaging proteins of bacteriophage T3 by site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* *235*, 248-259.
- Morita, M., Tasaka, M., y Fujisawa, H. (1995a). Analysis of the fine structure of the prohead binding domain of the packaging protein of bacteriophage T3 using a hexapeptide, an analog of a prohead binding site. *Virology* *211*, 516-524.
- Morita, M., Tasaka, M., y Fujisawa, H. (1995b). Structural and functional domains of the large subunit of the bacteriophage T3 DNA packaging enzyme: importance of the C-terminal region in prohead binding. *J Mol Biol* *245*, 635-644.
- Mukhopadhyay, R., Sumbayev, V. V., Lorentzen, M., Kjems, J., Andreasen, P. A., y Besenbacher, F. (2005). Cantilever sensor for nanomechanical detection of specific protein conformations. *Nano Lett* *5*, 2385-2388.
- Munoz, I. G., Yebenes, H., Zhou, M., Mesa, P., Serna, M., Park, A. Y., Bragado-Nilsson, E., Beloso, A., de Carcer, G., Malumbres, M., *et al.* (2011). Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 14-19.
- Nadal, M., Mas, P. J., Blanco, A. G., Arnan, C., Sola, M., Hart, D. J., y Coll, M. (2010). Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 16078-16083.

- Ndieyira, J. W., Watari, M., Barrera, A. D., Zhou, D., Vogtli, M., Batchelor, M., Cooper, M. A., Strunz, T., Horton, M. A., Abell, C., *et al.* (2008). Nanomechanical detection of antibiotic-mucopeptide binding in a model for superbug drug resistance. *Nat Nanotechnol* *3*, 691-696.
- Nemecek, D., Gilcrease, E. B., Kang, S., Prevelige, P. E., Jr., Casjens, S., y Thomas, G. J., Jr. (2007). Subunit conformations and assembly states of a DNA-translocating motor: the terminase of bacteriophage P22. *J Mol Biol* *374*, 817-836.
- Nemecek, D., Lander, G. C., Johnson, J. E., Casjens, S. R., y Thomas, G. J., Jr. (2008). Assembly architecture and DNA binding of the bacteriophage P22 terminase small subunit. *J Mol Biol* *383*, 494-501.
- Newcomb, W. W., Juhas, R. M., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Burch, A. D., Weller, S. K., y Brown, J. C. (2001). The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol* *75*, 10923-10932.
- Norman, L. L., y Badia, A. (2009). Redox actuation of a microcantilever driven by a self-assembled ferrocenylundecanethiolate monolayer: an investigation of the origin of the micromechanical motion and surface stress. *J Am Chem Soc* *131*, 2328-2337.
- Nygren, H. (1996). Attractive adsorbate interaction in biological surface reactions. *Biophys Chem* *61*, 73-84.
- Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y., y Walz, T. (2004). Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biol Proced Online* *6*, 23-34.
- Olia, A. S., Prevelige, P. E., Jr., Johnson, J. E., y Cingolani, G. (2011). Three-dimensional structure of a viral genome-delivery portal vertex. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 597-603.
- Oliveira, L., Alonso, J. C., y Tavares, P. (2005). A defined in vitro system for DNA packaging by the bacteriophage SPP1: insights into the headful packaging mechanism. *J Mol Biol* *353*, 529-539.
- Oliveira, L., Cuervo, A., y Tavares, P. (2010). Direct interaction of the bacteriophage SPP1 packaging ATPase with the portal protein. *J Biol Chem* *285*, 7366-7373.
- Oliveira, L., Henriques, A. O., y Tavares, P. (2006). Modulation of the viral ATPase activity by the portal protein correlates with DNA packaging efficiency. *J Biol Chem* *281*, 21914-21923.
- Orlova, E. V., Dube, P., Beckmann, E., Zemlin, F., Lurz, R., Trautner, T. A., Tavares, P., y van Heel, M. (1999). Structure of the 13-fold symmetric portal protein of bacteriophage SPP1. *Nat Struct Biol* *6*, 842-846.
- Orlova, E. V., Gowen, B., Droge, A., Stiege, A., Weise, F., Lurz, R., van Heel, M., y Tavares, P. (2003). Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 Å resolution by cryo-electron microscopy. *Embo J* *22*, 1255-1262.
- Pascual-Montano, A., Donate, L. E., Valle, M., Barcena, M., Pascual-Marqui, R. D., y Carazo, J. M. (2001). A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particle images. *J Struct Biol* *133*, 233-245.

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., y Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Rao, V. B., y Black, L. W. (2010). Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virology* 7, 356.
- Rao, V. B., y Feiss, M. (2008). The bacteriophage DNA packaging motor. *Annu Rev Genet* 42, 647-681.
- Rentas, F. J., y Rao, V. B. (2003). Defining the bacteriophage T4 DNA packaging machine: evidence for a C-terminal DNA cleavage domain in the large terminase/packaging protein gp17. *J Mol Biol* 334, 37-52.
- Rice, G., Tang, L., Stedman, K., Roberto, F., Spuhler, J., Gillitzer, E., Johnson, J. E., Douglas, T., y Young, M. (2004). The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7716-7720.
- Rice, S., Lin, A. W., Safer, D., Hart, C. L., Naber, N., Carragher, B. O., Cain, S. M., Pechatnikova, E., Wilson-Kubalek, E. M., Whittaker, M., *et al.* (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402, 778-784.
- Rickgauer, J. P., Fuller, D. N., Grimes, S., Jardine, P. J., Anderson, D. L., y Smith, D. E. (2008). Portal motor velocity and internal force resisting viral DNA packaging in bacteriophage phi29. *Biophys J* 94, 159-167.
- Rossmann, M. G., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., y Leiman, P. G. (2004). The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol* 14, 171-180.
- Rossmann, M. G., y Rao, V. B. (2012). Viruses: sophisticated biological machines. *Adv Exp Med Biol* 726, 1-3.
- Roy, A., y Cingolani, G. (2012). Structure of p22 headful packaging nuclease. *J Biol Chem* 287, 28196-28205.
- Sahin, O., Magonov, S., Su, C., Quate, C. F., y Solgaard, O. (2007). An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. *Nat Nanotechnol* 2, 507-514.
- Salas, M., Mellado, R. P., y Vinuela, E. (1978). Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage phi29. *J Mol Biol* 119, 269-291.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sao-Jose, C., de Frutos, M., Raspaud, E., Santos, M. A., y Tavares, P. (2007). Pressure built by DNA packing inside virions: enough to drive DNA ejection in vitro, largely insufficient for delivery into the bacterial cytoplasm. *J Mol Biol* 374, 346-355.
- Scheres, S. H., Gao, H., Valle, M., Herman, G. T., Eggermont, P. P., Frank, J., y Carazo, J. M. (2007). Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nat Methods* 4, 27-29.

- Scheres, S. H., Valle, M., y Carazo, J. M. (2005a). Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. *Bioinformatics* 21 *Suppl* 2, ii243-244.
- Scheres, S. H., Valle, M., Nunez, R., Sorzano, C. O., Marabini, R., Herman, G. T., y Carazo, J. M. (2005b). Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. *J Mol Biol* 348, 139-149.
- Scholz, T., Vicary, J. A., Jeppesen, G. M., Ulcinas, A., Horber, J. K., y Antognozzi, M. (2011). Processive behaviour of kinesin observed using micro-fabricated cantilevers. *Nanotechnology* 22, 095707.
- Serwer, P. (1976). Internal proteins of bacteriophage T7. *J Mol Biol* 107, 271-291.
- Shibata, H., Fujisawa, H., y Minagawa, T. (1987a). Characterization of the bacteriophage T3 DNA packaging reaction in vitro in a defined system. *J Mol Biol* 196, 845-851.
- Shibata, H., Fujisawa, H., y Minagawa, T. (1987b). Early events in DNA packaging in a defined in vitro system of bacteriophage T3. *Virology* 159, 250-258.
- Shu, D., Zhang, H., Jin, J., y Guo, P. (2007). Counting of six pRNAs of phi29 DNA-packaging motor with customized single-molecule dual-view system. *Embo J* 26, 527-537.
- Shu, W., Liu, D., Watari, M., Riener, C. K., Strunz, T., Welland, M. E., Balasubramanian, S., y McKendry, R. A. (2005). DNA molecular motor driven micromechanical cantilever arrays. *J Am Chem Soc* 127, 17054-17060.
- Simpson, A. A., Tao, Y., Leiman, P. G., Badasso, M. O., He, Y., Jardine, P. J., Olson, N. H., Morais, M. C., Grimes, S., Anderson, D. L., *et al.* (2000). Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature* 408, 745-750.
- Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L., y Bustamante, C. (2001). The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413, 748-752.
- Smits, C., Chechik, M., Kovalevskiy, O. V., Shevtsov, M. B., Foster, A. W., Alonso, J. C., y Antson, A. A. (2009). Structural basis for the nuclease activity of a bacteriophage large terminase. *EMBO Rep* 10, 592-598.
- Soding, J., Biegert, A., y Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 33, W244-248.
- Sorzano, C. O., Bilbao-Castro, J. R., Shkolnisky, Y., Alcorlo, M., Melero, R., Caffarena-Fernandez, G., Li, M., Xu, G., Marabini, R., y Carazo, J. M. (2010). A clustering approach to multireference alignment of single-particle projections in electron microscopy. *J Struct Biol* 171, 197-206.
- Sorzano, C. O., Marabini, R., Velazquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J. R., Scheres, S. H., Carazo, J. M., y Pascual-Montano, A. (2004). XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* 148, 194-204.

- Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S., y McKay, D. B. (2000). Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* *103*, 633-643.
- Speir, J. A., y Johnson, J. E. (2012). Nucleic acid packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol* *22*, 65-71.
- Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L., y Conway, J. F. (2005). Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 227-236.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., y Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* *185*, 60-89.
- Sun, S., Gao, S., Kondabagil, K., Xiang, Y., Rossmann, M. G., y Rao, V. B. (2011). Structure and function of the small terminase component of the DNA packaging machine in T4-like bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sun, S., Kondabagil, K., Draper, B., Alam, T. I., Bowman, V. D., Zhang, Z., Hegde, S., Fokine, A., Rossmann, M. G., y Rao, V. B. (2008). The structure of the phage t4 DNA packaging motor suggests a mechanism dependent on electrostatic forces. *Cell* *135*, 1251-1262.
- Sun, S., Kondabagil, K., Gentz, P. M., Rossmann, M. G., y Rao, V. B. (2007). The structure of the ATPase that powers DNA packaging into bacteriophage T4 procapsids. *Mol Cell* *25*, 943-949.
- Sun, S., Rao, V. B., y Rossmann, M. G. (2010). Genome packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol* *20*, 114-120.
- Tang, J., Lander, G. C., Olia, A. S., Li, R., Casjens, S., Prevelige, P., Jr., Cingolani, G., Baker, T. S., y Johnson, J. E. (2011). Peering down the barrel of a bacteriophage portal: the genome packaging and release valve in p22. *Structure* *19*, 496-502.
- Tavares, P., Santos, M. A., Lurz, R., Morelli, G., de Lencastre, H., y Trautner, T. A. (1992). Identification of a gene in *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 determining the amount of packaged DNA. *J Mol Biol* *225*, 81-92.
- Thuman-Commike, P. A., y Chiu, W. (2000). Reconstruction principles of icosahedral virus structure determination using electron cryomicroscopy. *Micron* *31*, 687-711.
- Trus, B. L., Cheng, N., Newcomb, W. W., Homa, F. L., Brown, J. C., y Steven, A. C. (2004). Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* *78*, 12668-12671.
- Valpuesta, J. M., Fernandez, J. J., Carazo, J. M., y Carrascosa, J. L. (1999). The three-dimensional structure of a DNA translocating machine at 10 Å resolution. *Structure* *7*, 289-296.
- Valpuesta, J. M., Fujisawa, H., Marco, S., Carazo, J. M., y Carrascosa, J. L. (1992). Three-dimensional structure of T3 connector purified from overexpressing bacteria. *J Mol Biol* *224*, 103-112.
- Valpuesta, J. M., Sousa, N., Barthelemy, I., Fernandez, J. J., Fujisawa, H., Ibarra, B., y Carrascosa, J. L. (2000). Structural analysis of the bacteriophage T3 head-to-tail connector. *J Struct Biol* *131*, 146-155.

- van Heel, M., Orlova, E. V., Dube, P., y Tavares, P. (1996). Intrinsic versus imposed curvature in cyclical oligomers: the portal protein of bacteriophage SPP1. *Embo J* 15, 4785-4788.
- Veesler, D., y Cambillau, C. (2011). A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 423-433, first page of table of contents.
- Velankar, S. S., Soutanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S., y Wigley, D. B. (1999). Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 97, 75-84.
- Viani, M. B., Pietrasanta, L. I., Thompson, J. B., Chand, A., Gebeshuber, I. C., Kindt, J. H., Richter, M., Hansma, H. G., y Hansma, P. K. (2000). Probing protein-protein interactions in real time. *Nat Struct Biol* 7, 644-647.
- Vlieghe, D., Turkenburg, J. P., y Van Meervelt, L. (1999). B-DNA at atomic resolution reveals extended hydration patterns. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1495-1502.
- Wagner, P., Hegner, M., Kernen, P., Zaugg, F., y Semenza, G. (1996). Covalent immobilization of native biomolecules onto Au(111) via N-hydroxysuccinimide ester functionalized self-assembled monolayers for scanning probe microscopy. *Biophys J* 70, 2052-2066.
- Wickham, S. F., Endo, M., Katsuda, Y., Hidaka, K., Bath, J., Sugiyama, H., y Turberfield, A. J. (2011). Direct observation of stepwise movement of a synthetic molecular transporter. *Nat Nanotechnol* 6, 166-169.
- Wikoff, W. R., Duda, R. L., Hendrix, R. W., y Johnson, J. E. (1998). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the dsDNA bacteriophage HK97 mature empty capsid. *Virology* 243, 113-118.
- Wikoff, W. R., y Johnson, J. E. (1999). Virus assembly: Imaging a molecular machine. *Curr Biol* 9, R296-300.
- Williams, R. S., Williams, G. J., y Tainer, J. A. (2008). A charged performance by gp17 in viral packaging. *Cell* 135, 1169-1171.
- Wriggers, W., Milligan, R. A., y McCammon, J. A. (1999). Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J Struct Biol* 125, 185-195.
- Wu, H., Sampson, L., Parr, R., y Casjens, S. (2002). The DNA site utilized by bacteriophage P22 for initiation of DNA packaging. *Mol Microbiol* 45, 1631-1646.
- Yang, Q., y Catalano, C. E. (2003). Biochemical characterization of bacteriophage lambda genome packaging in vitro. *Virology* 305, 276-287.
- Ye, J., Osborne, A. R., Groll, M., y Rapoport, T. A. (2004). RecA-like motor ATPases--lessons from structures. *Biochim Biophys Acta* 1659, 1-18.
- Yehle, C. O. (1978). Genome-linked protein associated with the 5' termini of bacteriophage phi29 DNA. *J Virol* 27, 776-783.
- Yeo, A., y Feiss, M. (1995a). Mutational analysis of the prohead binding domain of the large subunit of terminase, the bacteriophage lambda DNA packaging enzyme. *J Mol Biol* 245, 126-140.

- Yeo, A., y Feiss, M. (1995b). Specific interaction of terminase, the DNA packaging enzyme of bacteriophage lambda, with the portal protein of the prohead. *J Mol Biol* *245*, 141-150.
- Yokokawa, M., Wada, C., Ando, T., Sakai, N., Yagi, A., Yoshimura, S. H., y Takeyasu, K. (2006). Fast-scanning atomic force microscopy reveals the ATP/ADP-dependent conformational changes of GroEL. *Embo J* *25*, 4567-4576.
- Zhao, H., Finch, C. J., Sequeira, R. D., Johnson, B. A., Johnson, J. E., Casjens, S. R., y Tang, L. (2010). Crystal structure of the DNA-recognition component of the bacterial virus Sf6 genome-packaging machine. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 1971-1976.

Abreviaturas

2D Bidimensional

3D Tridimensional

Å Amstrong

aa Aminoácido

AAA+ Familia de ATPasas Asociadas con Actividades celulares

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADP Adenosin difosfato

AFM Microscopía de Fuerzas Atómicas

AMP-PNP Adenosin-5'-[(β,γ)-imido]trifosfato

ARN Ácido ribonucleico

Asp Aspartato

ATP Adenosin trifosfato

ATPasa Adenosin trifosfatasa

bp Par de bases

Cdom Dominio Carboxilo

crioME Criomicroscopía electrónica

CTF Función de transferencia de contraste

DMSO Dimetil sulfóxido

DNasa Desoxirribonucleasa

dNTP Nucleótidos trifosfato

DO Densidad Óptica

DSP Ditiobis succinimidil propionato

DTT Ditioneitol

E.Coli *Escherichia Coli*

EDTA Ácido etilendiaminotetracético
FSC Coeficiente de correlación cruzado
Gly Glicina
gpX Producto del gen X
HCMV Citomegalovirus Humano
His Histidina
HSV1 Virus herpes simple tipo 1
h.p.i. Horas post inducción
IPTG Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb Kilo pares de bases
kDa Kilo Dalton
LB Luria-Bertrani
ME Microscopía electrónica
mUA Mili unidades de absorbancia
Ndom Dominio amino
NTPasas Nucleótido trifosfatasa
P Precipitado (ensayos expresión)
PAGE Electroforesis en Geles de Poli Acrilamida
PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
pfu unidad formadora de placa
Pi Fosfato inorgánico, producto de la hidrólisis del ATP
Pro Prolina
px Píxel/píxeles
RNasa Riobonucleasa
RMN Resonancia magnética Nuclear
r.p.m Revoluciones por minuto
SB Sobrenadante (ensayos expresión)
SRH Segunda Región de Homología (en proteínas AAA+)
SDS Dodecil sulfato sódico
TLC Cromatografía en capa fina

Artículos publicados