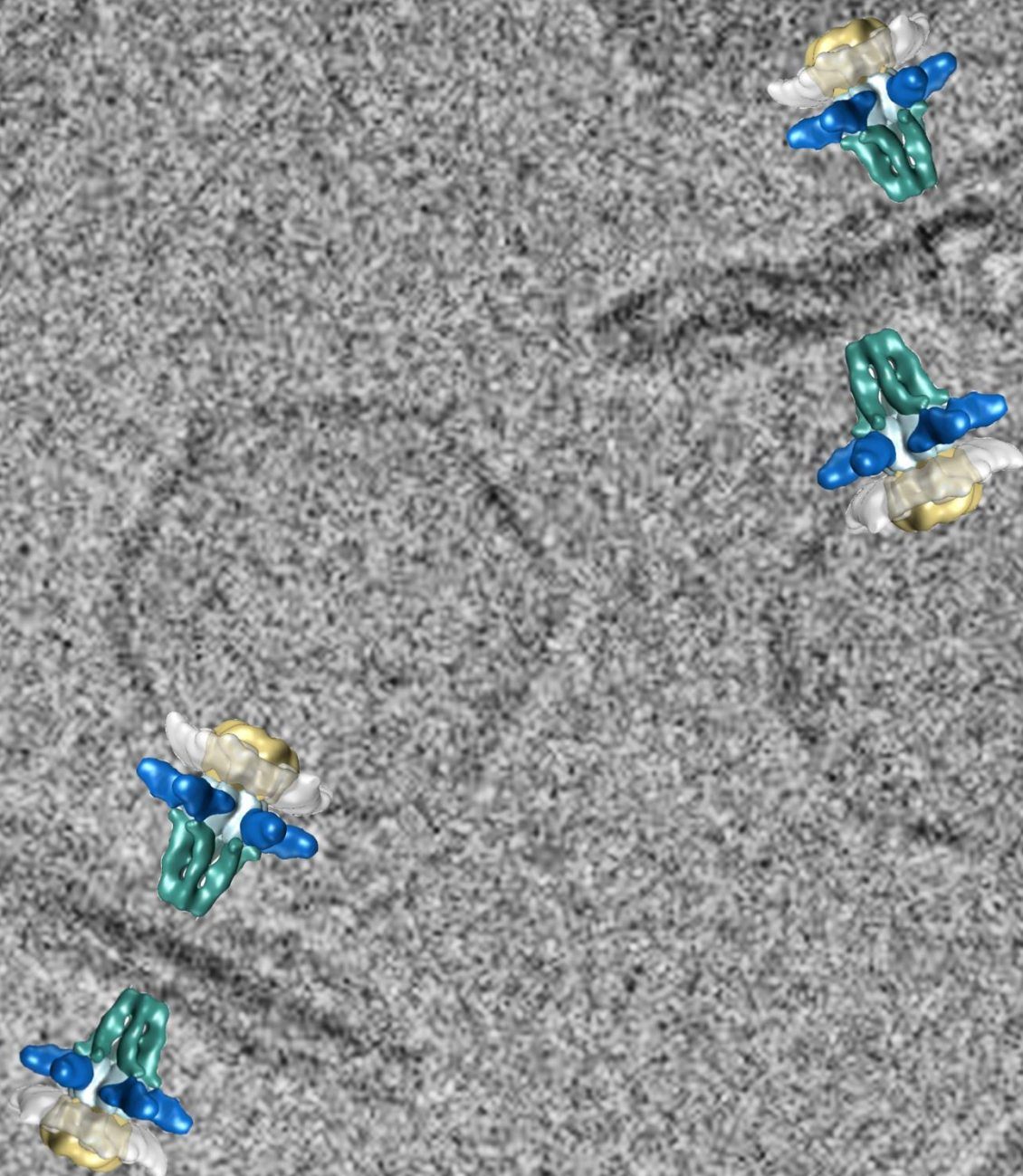


Mecanismos moleculares implicados en la infección del bacteriófago T7

Tesis Doctoral: Verónica González García

Directores: Prof. José.L.Carrascosa y Dra. Ana Cuervo





Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**Mecanismos moleculares implicados en la infección del
bacteriófago T7**

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas por:

Verónica González García

Marzo 2014

Directores de Tesis:

Prof. José L. Carrascosa

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

Dra. Ana Cuervo

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (C.N.B.-C.S.I.C.) bajo la dirección conjunta del Prof. José López Carrascosa y la Dra. Ana Cuervo Gaspar

ABREVIATURAS	5
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	7
SUMMARY / RESUMEN	9
1.INTRODUCCIÓN	11
1.1. <u>Características generales de los fagos con cola, Orden <i>Caudovirales</i>.</u>	12
1.2. <u>Mecanismos de infección de los <i>Caudovirales</i></u>	15
1.2.1. Receptores bacterianos	16
1.2.1.1 Bacterias Gram(+)	18
1.2.1.2 Bacterias Gram(-).	20
1.2.2 <u>La cola en los <i>Caudovirales</i></u>	22
1.2.2.1 Apéndices especializados en el reconocimiento del receptor	22
1.2.2.2 Complejo de la cola en cada familia de los <i>Caudovirales</i> .	23
1.3. <u>El fago T7</u>	26
1.3.1 Estructura del bacteriofago T7	26
1.3.2 Ciclo infectivo de T7	27
1.3.2.1 Reconocimiento del receptor e Internalización del genoma de T7	27
1.3.2.2 Morfogénesis de las partículas virales.	29
1.4. <u>Microscopía electrónica de transmisión en el estudio de partículas virales</u>	30
2. OBJETIVOS	33
3. MÉTODOS	34
3.1. <u>Preparación de muestras biológicas.</u>	34
3.1.1 Amplificación y purificación de bacteriofagos.	34
3.1.2 Titulación de los fagos.	34
3.1.3. Extracción de ADN viral	34
3.1.4 Purificación de los complejos de la cola y la cabeza viral a partir de partículas infectivas de T7.	34
3.1.5 Purificación de envueltas bacterianas de <i>E. coli</i> BL21.	35
3.1.6 Producción de minicélulas de <i>E. coli</i> .	35
3.1.7 Producción de anticuerpos contra la cápsida de T7.	36
3.2. <u>Expresión y purificación de las proteínas.</u>	36
3.2.1 Purificación de gp15	37
3.2.2 Purificación de gp16	38
3.2.3 Purificación del complejo formado por 15 y 16	39
3.3. <u>Análisis bioquímicos.</u>	39
3.3.1 Análisis de proteínas por electroforesis y Western Blot.	39
3.3.2 Cuantificación de proteínas mediante por el método de Bradford.	40
3.3.3 Ensayo de interacción VOPBA	41
3.3.4 Ensayo de actividad transglicosilasa (zimograma).	41
3.3.5 Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído..	42
3.3.6 Grafix.	42
3.3.7 Digestión del ADN viral con la enzima <i>Bst</i> BI	43

3.4. <u>Ensayos de adsorción e infectividad para el bacteriófago T7.</u>	43
3.4.1 Ensayos de adsorción de fagos a envueltas de <i>E.coli</i> .	43
3.4.2 Curva de crecimiento del fago T7.	44
3.4.3 Curva de inactivación del fago T7 incubado en presencia de LPS <i>rough</i> de <i>E. coli</i> .	44
3.4.4 Ensayos de protección del ADN viral frente a la digestión por DNasa I.	45
3.4.5 Cinética de la eyección del genoma de T7 <i>in vitro</i> mediante ensayos de fluorescencia.	46
3.5. <u>Análisis bioinformáticos para las proteínas del núcleo proteico.</u>	46
3.6. <u>Microscopía electrónica.</u>	47
3.6.1 Preparación de la muestra para su observación por ME.	47
3.6.2 Reconstrucción tridimensional de partículas individuales.	47
3.6.3 Reconstrucción 3D de fagos T7 adsorbidos a envueltas bacterianas mediante tomografía electrónica.	49
4. RESULTADOS	52
4.1. <u>Adsorción de T7 a la superficie bacteriana</u>	51
4.1.1 Adsorción de T7 a envueltas bacterianas purificadas.	51
4.1.2 Componentes proteicos de la pared participan en la adsorción.	53
4.2. <u>Eyección del genoma de T7 <i>in vitro</i>.</u>	56
4.2.1 El fago T7 eyecta su genoma en presencia de los LPS de <i>E. coli</i> DH100.	56
4.2.2 Cinética de la eyección en presencia de LPS	58
4.2.3 Los fagos se unen de manera irreversible a los LPS de cepas <i>rough</i> de <i>E. coli</i> mediante sus fibras.	59
4.3 <u>Análisis mediante crío–microscopía electrónica de los cambios conformacionales que se producen en el fago T7 tras la eyección de su genoma.</u>	61
4.3.1 Análisis mediante crío-tomografía electrónica de fagos adsorbidos a envueltas bacterianas.	61
4.3.2 Reconstrucción tridimensional de la cola en su conformación abierta mediante crío-microscopía electrónica.	62
4.3.3 Cambios conformacionales en el complejo de la cola tras la eyección del genoma viral.	65
4.4. <u>Estudio de las proteínas del núcleo proteico, implicadas en la translocación del genoma viral.</u>	67
4.4.1 El complejo del núcleo se desensambla tras ser eyectado a través de la cola	67
4.4.2 Análisis bioinformático de gp15 y gp16.	69
4.4.3 Purificación y expresión de las proteínas solubles del núcleo gp15 y gp16	73
4.4.4 Detección de la actividad transglicosilasa de la proteína gp16 recombinante.	77
4.4.5 Caracterización estructural de la proteína gp16 mediante ME	78
4.4.5 Gp15 y gp16 interaccionan <i>in vitro</i> .	83

5. DISCUSIÓN	85
5.1. Reconocimiento del receptor	86
5.1.1 El reconocimiento del receptor desencadena la unión irreversible del fago a la envuelta y la eyección completa de su genoma	86
5.1.2 Las porinas OmpA y OmpF de la membrana externa participan en la adsorción a la superficie bacteriana.	87
5.1.3 Los LPS de cepas <i>rough</i> de <i>E. coli</i> son el receptor del fago T7 y desencadenan la eyección del genoma <i>In vitro</i> .	88
5.2. Cambios estructurales observados en el virión T7 tras el reconocimiento del receptor.	89
5.2.1 El complejo del núcleo no se localiza en el interior de la cabeza del fago T7 tras la eyección del genoma	92
5.2.2 : Las fibras cambian de orientación tras interactuar con los LPS de cepas <i>rough</i> y dicho cambio provoca la apertura del canal de la cola.	94
5.3. Modelo propuesto del mecanismo de infección del fago T7.	97
6. CONCLUSIONES	99
7. BIBLIOGRAFÍA	100

Abreviaturas

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A	Absorbancia
Å	Angstrom.
aa	Aminoácido.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosina-5'- trifosfato (<i>Adenosine-5'- TriPhosphate</i>).
B-ME	<i>Beta</i> -mercapto-etanol.
BrEt	Bromuro de etidio.
crioME	Criomicroscopía electrónica.
C-terminal	Extremo carboxilo terminal.
CTF	Función de transferencia de contraste (<i>Contrast Transfer Function</i>).
DO	Densidad óptica.
e⁻	Electrones
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylen Diamine Tetraacetic Acid</i>).
EMAN	Programa informático (<i>Electron micrograph analysis</i>).
EMDB	<i>Electron Microscopy Data Bank</i>
FSC	Coeficiente de correlación en el espacio de Fourier (<i>Fourier Shell Correlation</i>).
HEPES	Ácido N--2--hidroxietilpiperacín--N'--2--etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IPTG	Isopropil---Beta---D---tiogalactopiranosido.
kDa	Kilo Dalton.
LPS	Lipopolisacáridos.

ME	Microscopía electrónica.
m.o.i.	Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity Of Infection</i>).
MW	Masa molecular (<i>Molecular Weight</i>).
nm	Nanómetro.
N-terminal	Extremo amino terminal.
OMP	Proteína de la membrana externa de Bacterias Gram (-) (<i>Outer Membrane Protein</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>).
Pb	Par de bases.
PG	Péptidoglicano.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PTA	Ácido fosfotúngstico.
p/v	Peso / volumen
RBD	Dominio de union al receptor (<i>Receptor Binding Domain</i>).
RMN	Resonancia magnética nuclear.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SPIDER	Programa informático (<i>System for Processing Image Data in Electron Microscopy and Related Fields</i>).
TAE	Tampón <u>T</u> ris- <u>A</u> cetato- <u>E</u> DTA.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina
TMS	Tampón <u>T</u> ris- <u>M</u> agnesio- <u>S</u> al (NaCl).
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano.
VOPBA	Ensayo de interacción virus-proteínas (<i>Virus Overlay Protein Binding Assay</i>).
v/v	Volumen / volumen.
Xmipp	Programa informático (<i>X-window based microscopy image processing package</i>).

Índice de figuras

INTRODUCCIÓN:

Fig. 1. 1: Familias del orden Caudovirales	13
Fig. 1.2: Curva de crecimiento de un fago lítico	14
Fig. 1.3: Adaptación de los fagos con cola a los cambios de sus receptores bacterianos.	16
Fig. 1.4: Esquema de las envueltas Gram (+) y Gram (-).	17
Fig. 1.5: Estructura de un lipopolisacárido.	20
Fig. 1.6: Estructura de algunas proteínas integrales de la membrana externa (OMPs) tipo barril.	21
Fig. 1.7: Ejemplos de apéndices implicados en la infección	22
Fig. 1.8: Cola de siphovirus.	23
Fig. 1.9. Cola de myovirus.	24
Fig. 1.10: Estructura de la cola en podovirus.	25
Fig. 1.11: Estructura del fago T7.	26
Fig. 1.12: Estructura cristalográfica del extremo distal de la fibra.	27
Fig. 1.13: Complejo de adsorción del fago T7.	28
Fig. 1. 14: Ruta de ensamblaje de las partículas virales del fago T7.	29
Fig. 1.15: Microscopio electrónico de transmisión.	31
Fig. 1.16: esquema del procesamiento por el método de partículas individuales	32
Tabla1: Recopilación de bacteriófagos y sus correspondientes receptores bacterianos.	19

RESULTADOS

Fig. 4.1 Adsorción del fago T7 a la envuelta bacteriana de <i>E.coli</i> .	52
Fig. 4.2 Gradiente isopícnico al 22% (p/v) de las envueltas incubadas junto con las partículas virales.	53
Fig. 4.3: Análisis VOPBA del fago T7 frente a las proteínas de la envuelta de <i>E.coli</i> .	54
Fig. 4.4. Las ausencia de porinas en el mutante <i>E. coli</i> BL21 (DE3) $\Delta OmpA \Delta OmpF \Delta OmpC$ implica una disminución en la adsorción de T7 respecto de la cepa <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	56
Fig. 4.5: Inactivación de los viriones de T7 en presencia de los LPS de <i>E. coli</i> DH100.	57
Fig. 4.6: Eyección del genoma de T7 en presencia de los LPS de <i>E. coli</i> DH100.	58
Fig. 4.7: Estudio cinético de la eyección de T7 en presencia de LPS de <i>E.coli</i> .	59
Fig. 4.8: Los fagos T7 interaccionan con los LPS de cepas rough de <i>E. coli</i> mediante sus fibras.	61

Fig. 4.9: Análisis mediante crío-tomografía electrónica de fagos adsorbidos a envueltas bacterianas	62
Fig. 4.10: Procesamiento de partículas individuales de fagos T7 adsorbidos a LPS de <i>E. coli</i> /EH100.	64
Fig. 4.11: Reconstrucción tridimensional de la conformación abierta de la cola del fago T7 obtenido por crío-microscopía electrónica.	65
Fig. 4.12: Cambios estructurales en el complejo de la cola tras la eyección del genoma de T7.	67
Fig. 4.13: El complejo del núcleo no se localiza ni en las colas ni en las cabezas de partículas virales que han eyectado su genoma tras recibir un tratamiento combinado de calor y EDTA.	68
Fig. 4.14 El complejo del núcleo no se detecta en los viriones de T7 que eyectan el su genoma tras interactuar con los LPS.	70
Fig. 4.15: Análisis bioinformático de gp15.	71
Fig. 4.16: Análisis bioinformático de gp16.	72
Fig. 4.17: Alineamiento de secuencia múltiple para gp16.	73
Fig. 4.18: Purificación de gp15.	75
Fig. 4.19: Ensayo indirecto de la interacción de gp15 con el ADN de T7.	76
Fig. 4.20: Purificación de gp16	77
Fig. 4.21: Ensayo de la actividad transglicosilasa de la proteína gp16 recombinante.	78
Fig. 4.22: Estudio del estado oligomérico de la proteína gp16 expresada in vitro mediante Grafix	79
Fig. 4.23: Reconstrucción del dímero de la proteína gp16.	80
Fig. 4.24: Reconstrucción del modelo 3D final del dímero de la proteína gp16.	81
Fig. 4.25 Fig. 4.24: Ajuste del modelo atómico predicho con Raptor X a nuestro modelo 3D de gp16 obtenido por ME	82
Fig. 4.26: Purificación del complejo formado por gp15 y gp16.	84

DISCUSIÓN

Figura 5.1: Alineamiento múltiple de secuencias para el extremo C-terminal de la fibra de Yephphi y sus proteínas homólogas en fagos del grupo de T7.	89
Figura 5.2: Válvula del conducto de la cola de los fagos del grupo T7.	92
Figura 5.3: El complejo del núcleo de T7 adopta conformaciones muy diferentes.	93
Figura 5.4: Ejemplo de podovirus con una estructura tubular en el interior de la cabeza.	94
Figura 5.5: Posible localización de las proteínas gp15 y gp16 en el espacio periplásmico tras la eyección.	97
Figura 5.6: Modelo propuesto para la infección del fago T7.	99

Summary

Among bacteriophages, T7 is one of the most well characterized viruses at both the genetic and structural level. However, the molecular mechanisms by which T7 ejects its genome into bacterial cytoplasm remained unclear. T7 belongs to the *Podoviridae* family of bacteriophages and presents a short non-contractile tail with six fibers specialized in receptor recognition. As in other podoviruses, the T7 tail is not long enough to cross the envelope of its Gram(-) host. In order to eject the phage genome into the cell, other phage proteins must assist the process. The goal of this thesis is to characterize at structural and functional level, the T7 complexes implicated in the phage infection of *Escherichia coli* and to describe the mechanism of the process.

Using cryo-electron microscopy as well as biochemical and microbiological approaches, we have described the first steps of T7 infection and the main conformational changes in T7 virions during viral genome delivery. The work shown here reveals that T7 particles interact with outer membrane proteins OmpA and OmpF in the adsorption process and LPS from rough strains of *E. coli* trigger viral DNA ejection in absence of cytoplasmic pressure. Comparison between the 3D reconstruction of the tail complex in the post-ejected conformation, determined by electron microscopy in this thesis, and the 3D model of the tail from infective particles, determined previously in our lab, allowed us to define in detail the conformational changes needed for DNA delivery. The most striking differences are the change in the orientation of the fibers from upwards to downwards conformation and the opening of the ejection channel by untwist of the tail nozzle domain.

The results accomplished in this thesis reveal more similarities with the infection of other podoviruses and provide a complete snapshot of T7 infection pathway.

Resumen

El virus T7 es uno de los bacteriófagos más estudiados, tanto a nivel genético como estructural. Sin embargo, todavía no se había caracterizado el mecanismo de infección por el cual T7 introduce su genoma de forma segura en el citoplasma de su bacteria hospedadora. El fago T7 pertenece a la familia *Podoviridae* y posee una cola corta no contráctil, con seis fibras especializadas en el reconocimiento del receptor. Como en otros podovirus, la longitud de la cola del fago T7 no le permite atravesar la envuelta de su bacteria hospedadora. El objetivo de esta tesis es caracterizar a nivel estructural y funcional los elementos de T7 implicados en la infección de *Escherichia coli*, así como describir el mecanismo de este proceso.

Para la realización de la tesis doctoral se han utilizado técnicas tan diversas y complementarias como la crío-microscopía electrónica, técnicas bioquímicas y técnicas microbiológicas. La integración de la información recogida nos ha permitido describir con detalle los primeros pasos de la infección de T7 así como caracterizar los cambios conformacionales que se producen en las partículas virales tras la eyección de su genoma. Los datos presentados en esta tesis indican que el fago T7 interacciona con las proteínas OmpA y OmpF cuando se adsorbe a la envuelta bacteriana y que los LPS de cepas *rough* de *E. coli* desencadenan la eyección del genoma viral en ausencia de presión citoplasmática. La comparación entre la reconstrucción tridimensional de la cola de fagos T7 antes y después de la eyección del genoma viral nos ha permitido definir en detalle los cambios conformacionales necesarios para la internalización del genoma. Las diferencias más notables son el cambio en la orientación de las fibras y la apertura del canal de la cola debido a un cambio conformacional en los monómeros de la proteína gp12 que forman el conducto.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral revelan más similitudes entre los complejos implicados en la infección de los podovirus y nos permiten tener una visión completa del mecanismo de infección del fago T7.

Introducción

1.1. Características generales de los fagos con cola, Orden *Caudovirales*.

1.2. Mecanismos de infección de los *Caudovirales*.

1.2.1. Receptores bacterianos.

1.2.1.1 Bacterias Gram(+).

1.2.1.2 Bacterias Gram(-).

1.2.2 La cola en los *Caudovirales*.

1.2.2.1 Apéndices especializados en el reconocimiento del receptor.

1.2.2.2 Complejo de la cola en cada familia de los *Caudovirales*.

1.3. El fago T7

1.3.1 Estructura del bacteriofago T7.

1.3.2 Ciclo infectivo de T7

1.3.2.1 Reconocimiento del receptor e Internalización del genoma de T7.

1.3.2.2 Morfogénesis de las partículas virales.

1.4. Microscopía electrónica de transmisión para el estudio de partículas virales.

1.1. Características generales de los fagos con cola, Orden Caudovirales.

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Comparten con el resto de los virus, una completa dependencia de la célula huésped, tanto para la replicación de su genoma como para la producción de una nueva progenie viral a lo largo de su ciclo infectivo. Fuera de la célula huésped, el genoma viral está protegido por una cápsida proteica y a la combinación de ambos elementos se le denomina nucleocápsida. Otras estructuras adicionales propias de cada virus se encuentran asociadas a la nucleocápsida y el conjunto constituye el virión o partícula viral infectiva. Atendiendo a las características morfológicas del virión y al tipo de ácido nucleico que presenta, los fagos se han clasificado recientemente en 14 familias. De los fagos conocidos hasta la fecha, sólo un 3,6% presentan morfología pleomórfica o filamentosa, mientras que aproximadamente un 96% de los fagos poseen una cola y una cápsida icosaédrica (Ackermann, 2007). Todos los fagos con cola se clasifican dentro del orden de los Caudovirales y se caracterizan además por estar dotados de ADN de doble hebra.

Atendiendo a la morfología de la cola de los Caudovirales, podemos agrupar a sus miembros en tres familias (Fig.1.1): un 25% corresponde a la familia *Myoviridae*, cuyos fagos presentan colas largas contráctiles; un 61% a la familia *Siphoviridae*, que se caracteriza por tener colas largas no contráctiles y el 14% restante a la familia *Podoviridae*, con colas cortas no contráctiles (Orlova 2012). En todos los Caudovirales podemos distinguir tres elementos estructurales comunes (Cuervo y Carrascosa 2012):

-CÁPSIDA POLIÉDRICA: Está constituida por unidades estructurales repetitivas de pentámeros y hexámeros de la misma proteína, denominadas capsómeros. En la mayoría de los bacteriófagos los capsómeros se ensamblan formando un icosaedro. Los pentámeros se localizan en cada uno de los 12 vértices del icosaedro. Los hexámeros en las caras y en las aristas. En algunos casos, a la proteína mayoritaria de la cápsida se le pueden asociar otras proteínas para estabilizar las conexiones entre los capsómeros. En el proceso de morfogénesis de las cápsidas intervienen proteínas de andamiaje, aunque estas proteínas no están presentes en el virión maduro. Además, durante la maduración de la cabeza, los capsómeros experimentan cambios conformacionales, lo que incrementa la estabilidad de la cápsida madura.

-CONECTOR O COMPLEJO PORTAL: Se trata de un dodecámero, participa tanto en la morfogénesis viral como en la eyección del genoma durante la infección. Durante la morfogénesis, se ensambla en uno de los vértices de la cápsida inmadura (precabeza). Posteriormente el complejo terminasa se ensamblará temporalmente al conector para la translocación activa del genoma en el interior de la cápsida. Tras el empaquetamiento del ADN la terminasa se disocia del conector y finaliza el proceso de maduración de

la precabeza, que pasa a denominarse cabeza madura. El ADN del interior de la cápsida madura se encuentra altamente condensado en un estado cuasi-cristalino, lo que provoca una enorme presión en el interior de la cabeza (Fig. 1.1).

-COLA: Consta de un conducto central al que se asocian apéndices especializados en el reconocimiento de la bacteria hospedadora (fibras o espículas). La cola se ensambla al conector una vez ha terminado el proceso de empaquetamiento y a lo largo de ambos complejos se dispone un canal central que permanece cerrado en el virión maduro, evitando así la salida espontánea del genoma por la diferencia de presión con el exterior. Una vez la cola reconoce el receptor de la superficie de la bacteriana, se producen cambios conformacionales tanto en las proteínas de la cola que inducen la apertura del canal central y la posterior conducción del genoma viral al interior del citoplasma bacteriano durante la infección.

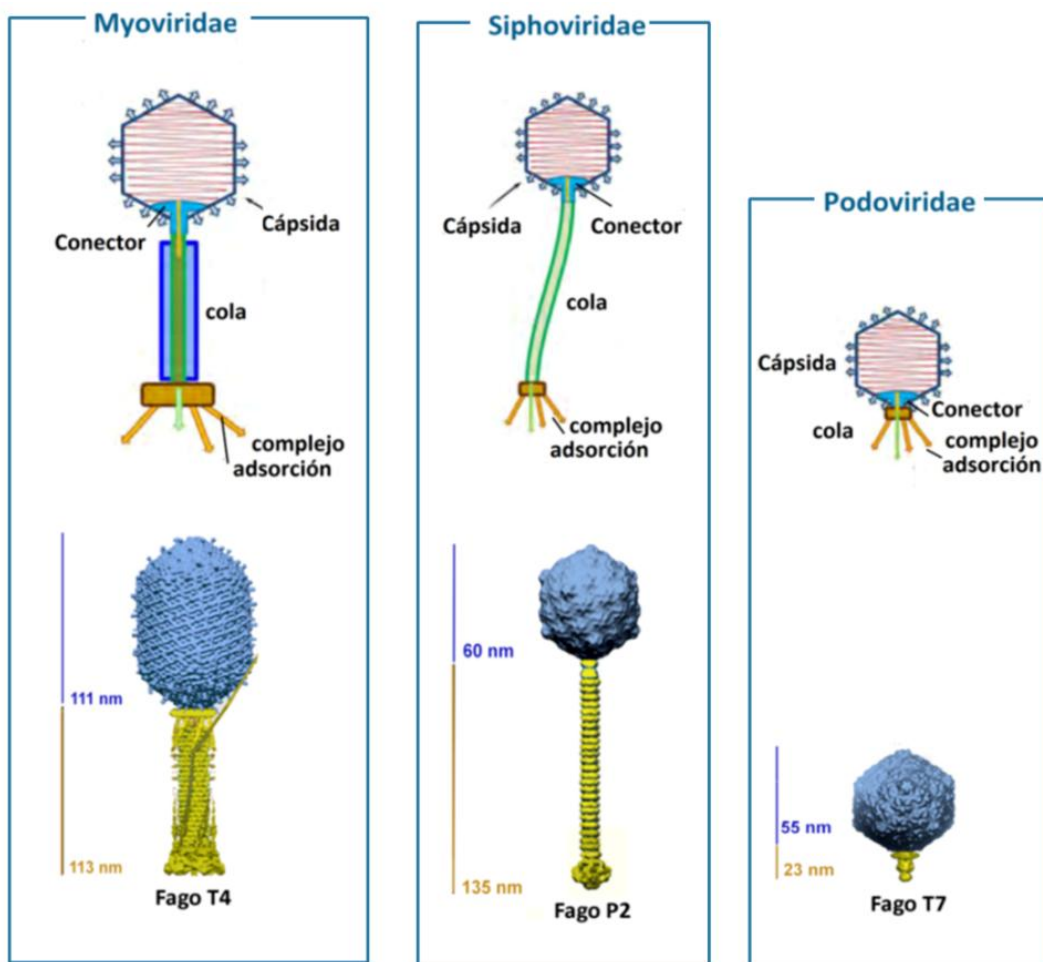


Figura 1. 1: Familias del orden Caudovirales. Se muestra un miembro representativo de cada una de las tres familias de fagos con cola. En la parte superior aparecen de forma esquemática las estructuras comunes de los fagos con cola modificado de Orlova (2012). Abajo el modelo resuelto por criomicroscopía electrónica de cada fago (en el caso del fago T4 y el fago P2 los modelos proceden de Veessler y Cambillau (2011); el modelo del fago T7 procede de Agirrezabala et al. (2005).

Los bacteriófagos también pueden clasificarse en función del tipo de ciclo vital que presenten. Los fagos líticos emplean la maquinaria bacteriana para amplificar su genoma y producir nuevas partículas virales, que son liberadas tras provocar la lisis de la bacteria (Fig.1.2). Los fagos lisogénicos pueden permanecer en un estado de latencia (profago) en su ciclo infectivo, de modo que integran su genoma en el cromosoma bacteriano o éste se mantiene en forma de plásmido en el interior de la bacteria. Cuando la bacteria con el profago es sometida a agentes de estrés, se activan determinados genes virales que provocan que el fago inicie su ciclo lítico, multiplicándose dentro de la bacteria y provocando finalmente su lisis. Independientemente del tipo de ciclo que presenten, se produce continua transferencia de genes entre genomas virales de diferentes especies de bacteriófagos, así como entre los fagos y sus bacterias hospedadoras. Por ejemplo, fagos que presentan ciclos líticos pueden, por error, internalizar en su cápsida algún fragmento de ADN de la bacteria infectada e inyectarlo en una nueva bacteria en el siguiente ciclo infectivo. Si la nueva bacteria no es lisada, puede recombinar el nuevo fragmento adquirido.

En los ciclos lisogénicos también se pueden producir errores. A veces, el genoma del fago lisogénico arrastra consigo alguno de los genes bacterianos adyacentes a su punto de integración cuando se activa a ciclo lítico. De este modo, mediante alineamientos de secuencia aminoacídica, se ha detectado que los fagos con cola comparten numerosos genes relacionados con la replicación de su genoma con bacterias, plásmidos y transposones (Krupovič y Bamford, 2010).

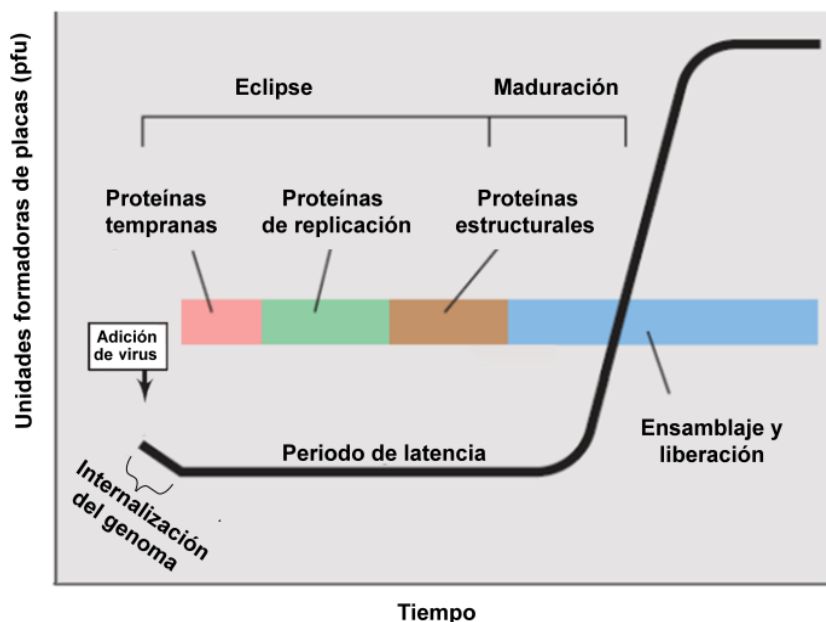


Figura 1.2: Curva de crecimiento de un fago lítico. La internalización del genoma viral conlleva una inactivación de los viriones y una caída inicial del título viral. Los primeros genes en internalizarse y expresarse son los genes tempranos y codifican para proteínas implicadas en el inicio de la infección. A continuación se expresan los genes implicados en la replicación del genoma viral. Por último, los genes tardíos codifican para el ensamblaje de las partículas infectivas y su liberación al medio extracelular. Al tiempo transcurrido entre el inicio de la infección y la aparición de la primera progenie viral se le denomina periodo de latencia. Figura procedente de Madigan et al. (2008).

Como consecuencia de la transferencia horizontal de genes y la elevada tasa de mutación que presentan tanto los fagos como sus bacterias receptoras, existe una enorme divergencia genética entre los miembros de los Caudovirales (Casjens 2005, Ackermann 2009). Los mecanismos de defensa bacterianos frente a la infección por bacteriófagos ejercen a su vez una presión selectiva que favorece dicha divergencia genética (Estrela et al. 1991). No obstante, las estructuras proteicas evolucionan más lentamente que sus secuencias aminoacídicas. Estudios comparativos entre las diferentes estructuras virales resueltas hasta la fecha han permitido trazar diferentes linajes virales, en los que sus miembros comparten dominios de plegamiento proteico (Bamford et al., 2005). Así, los miembros del orden Caudovirales pertenecen al linaje tipo HK97 junto a los herpesvirus (familia de virus animales). En todos ellos, la proteína mayoritaria de la cápsida presenta la misma unidad básica de plegamiento tipo HK97. Además, la mayoría de los miembros del linaje HK97 presentan un complejo de translocación del genoma viral al interior de la cápsida (el complejo portal) que conserva una arquitectura dodecamérica (Veesler y Cambillau 2011). El hecho de que virus que pertenecen al mismo linaje infecten hospedadores de diferentes dominios filogenéticos sugiere que los virus existían antes de la diversificación celular del último ancestro común (LUCA) (Bamford et al., 2005).

1.2. Mecanismos de infección de los Caudovirales.

Las bacterias se protegen del medio que las rodea a través de su envuelta, que es su estructura más externa y supone a su vez una barrera frente a la infección por bacteriófagos. La envuelta se dispone alrededor de la membrana citoplasmática y está constituida por polímeros que la otorgan gran rigidez y la hacen a su vez impermeable a la mayoría de los solutos. Además, en la periferia de la membrana citoplasmática se localizan nucleasas que degradarán aquellos ácidos nucleicos exógenos que no estén protegidos. Por tanto, el transporte de ácidos nucleicos a través de la envuelta bacteriana requiere de complejos proteicos especializados.

Los bacteriófagos han solucionados estos obstáculos de diferentes maneras. Por ejemplo, los fagos filamentosos Ff y CTX ϕ utilizan los pili de *Escherichia coli* como receptor y el complejo TolQRA de la membrana citoplasmática para translocar su genoma (Rakonjac et al., 2011). El fago icosaédrico ϕ X174 no tiene cola y parece eyectar la proteína H de la cabeza para asistir la translocación del genoma viral al citoplasma de *E. coli* (Sun et al., 2014). No obstante, la estrategia más común que emplean los bacteriófagos para internalizar su genoma es utilizar una cola (Letellier et al. 2007). Los fagos con cola presentan genomas de mayor tamaño que los fagos icosaédricos o filamentosos, lo que supone una ventaja evolutiva (Davidson et al. 2012). El genoma en estos fagos se halla altamente condensado en el interior de la cabeza y la cola desarrolla una doble función. Por una parte, cierra el canal del conector, evitando la salida del genoma viral al exterior cuando la partícula viral todavía no ha

contactado con la bacteria receptora. Por otra parte, cuando el complejo de la cola reconoce específicamente la superficie de la bacteria hospedadora, abre dicho canal e internaliza de una forma segura el genoma viral al citoplasma bacteriano.

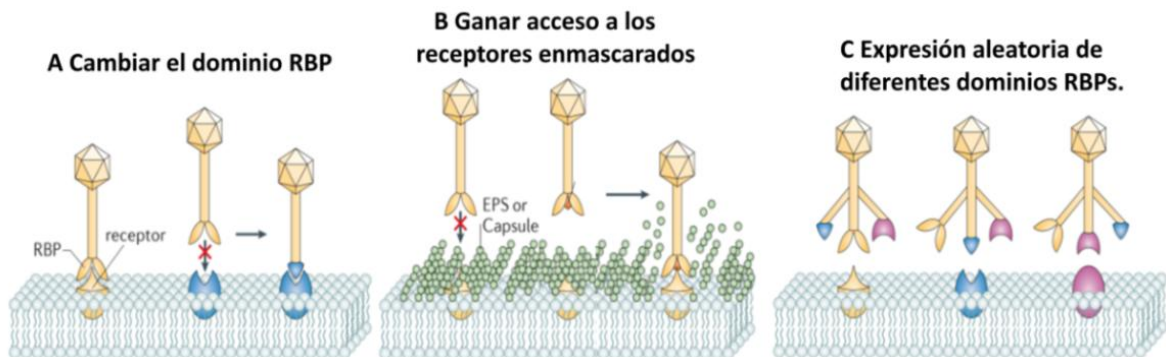


Figura 1.3: Adaptación de los fagos con cola a los cambios de sus receptores bacterianos. **A)** La bacteria hospedadora modifica el receptor del virus y el fago modifica su RBD. **B)** La bacteria encubre el receptor y el fago adquiere una nueva actividad enzimática que le permite acceder al receptor. **C)** El fago presenta una batería de RBDs para que sea posible el reconocimiento del hospedador en cada momento. Figura modificada de Samson et al. (2013)

1.2.1 Receptores bacterianos.

Cuando los fagos del orden Caudovirales llegan a la superficie de su bacteria hospedadora, se asocian primero de forma reversible a un “receptor primario” específico y después a un dominio de unión irreversible localizado en ese mismo receptor o en un “receptor secundario” (Letellier et al., 2004). A este proceso se le denomina adsorción y se cree que es llevado a cabo por el complejo de la cola. La adsorción reversible permite al virión realizar la búsqueda del dominio de unión irreversible en un área concreto de la superficie bacteriana, lo cual acelera el proceso de infección. La adsorción irreversible se produce a consecuencia de una serie de cambios conformacionales en el virión, que permiten la translocación del genoma viral al interior de la bacteria. Por tanto, una vez se da la adsorción irreversible, ya no se puede recuperar la partícula viral infectiva de la superficie bacteriana (Casjens y Molineux 2012).

Cada fago infecta únicamente a una o muy pocas especies de bacterias. Pese a la gran especificidad que presentan por su bacteria hospedadora, el rango de hospedadores para cada fago pueda cambiar con el tiempo. Los fagos y sus bacterias hospedadoras están en una continua co-evolución, de modo que las bacterias desarrollan mecanismos de defensa frente a los fagos y éstos a su vez mecanismos para evadir dichas defensas (Brüssow et al. 2004). Esto se debe principalmente a la transferencia horizontal de genes y a la elevada tasa de mutación que presentan tanto fagos como bacterias. A nivel de la adsorción, existe una presión selectiva a favor de las bacterias que modifican los receptores de sus bacteriófagos. A su vez, aquellos fagos que modifican su dominio de unión al

receptor (RBD) y reconocen un nuevo receptor, pueden de nuevo llevar a cabo la infección (Fig. 1.3.A). Otras bacterias encubren el receptor, como por ejemplo aquellas que desarrollan una cápsula o expresan exopolisacáridos (EPS) en su superficie. Por su parte, los fagos pueden adquirir una nueva actividad enzimática por transferencia horizontal o por mutación que les permita degradar dichas moléculas y acceder hasta su receptor (Fig. 1.3.B; Samson et al., 2013). Por último, los fagos pueden presentar una batería de RBDs para que sea posible el reconocimiento del hospedador en diferentes condiciones, ya que bajo agentes de estrés o en diferentes fases de crecimiento, las bacterias pueden cambiar las moléculas que presentan en su superficie (Fig. 1.3.C). Así por ejemplo, el fago KIF pertenece al grupo del fago T7 y ha desarrollado actividad endo-neuraminidasa en las fibras de la cola, que reconocen y degradan la capsula externa tipo K1 que sintetizan algunas cepas de *E. coli* (Samson et al. 2013).

En general, cualquier molécula de la envuelta bacteriana es candidata a convertirse en receptor para un determinado bacteriófago. Así, existen receptores de naturaleza proteica, lipídica e incluso azúcares. Atendiendo a la estructura y a la composición de la envuelta, las bacterias pueden clasificarse como bacterias Gram (-) y bacterias Gram (+). Dependiendo del tipo de envuelta, los fagos con cola adoptan diferentes mecanismos para reconocer la superficie bacteriana y translocar su genoma. A continuación se describen las características de cada tipo de envuelta y los tipos de receptores que presentan.

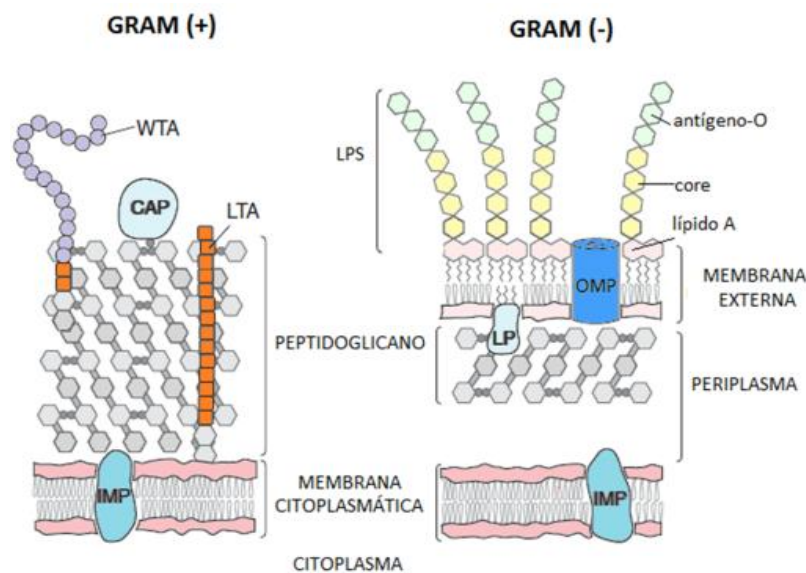


Figura 1.4: Esquema de las envolturas Gram (+) y Gram (-). En ambos casos, la membrana citoplasmática está compuesta por fosfolípidos y proteínas (IMP) y se rodea de una capa de peptidoglicano (PG), aunque esa capa es mucho más gruesa en las bacterias Gram (+), que además presentan proteínas periféricas covalentemente unidas (CAP), ácidos teicoicos (WTA) y ácidos lipoteicoicos (LTA). Las bacterias Gram (-) presentan una membrana externa extra cubriendo a la capa de PG, en la que se localizan los lipopolisacáridos (LPS) y proteínas integrales de la membrana externa (OMP). Las lipoproteínas (LP) se unen tanto a la membrana externa como a la capa de PG. Figura adaptada de Silhavy, Kahne et al. (2010).

1.2.1.1 Bacterias Gram (+)

La envuelta de las bacterias Gram (+) consiste en una gruesa capa de peptidoglycano (PG), de 30 a 100 nm de espesor, que rodea a la membrana citoplasmática. El PG es un polisacárido complejo cuyo esqueleto se compone de unidades repetitivas de N-acetil-2-D-glucosamina y ácido N-acetil murámico al que se unen cadenas laterales de péptidos constituidos por L-alanina, D-alanina, ácido-D-glutámico y lisina o ácido diaminopimérico (DAP). Las cadenas de PG se conectan entre sí mediante enlaces peptídicos entre aminoácidos de sus cadenas laterales. Este entrecruzamiento otorga gran rigidez a la pared. Embebidos en la capa de PG se encuentran los ácidos teicoicos (WTA), que se unen mediante enlaces covalentes al ácido murámico. Se trata de polímeros con grupos fosfato que confieren una carga negativa a la superficie bacteriana. Los ácidos lipoteicoicos (LTA) conectan la capa de PG con la membrana plasmática. En menor proporción también encontramos proteínas asociadas a la capa de PG. Por último, rodeando la pared de PG puede existir una cápsula de polisacáridos adicional (Silhavy et al., 2010; Madigan et al., 2008).

Los fagos que infectan bacterias Gram (+) pueden utilizar peptidoglicano, ácidos teicoicos o proteínas expuestas en la superficie como receptor (Vinga, et al., 2006). En general, emplean los constituyentes glucídicos de estas estructuras como receptor. Por ejemplo, el fago A511 que infecta *Listeria monocytogenes* utiliza las moléculas de N-acetil-2-D-glucosamina del PG como moléculas receptoras (tabla1; Wendlinger et al., 1996). Los fagos ϕ 25 y ϕ 29 infectan *Bacillus subtilis* y emplean el ácido teicoico mayoritario de la pared (poly-[glicerol-fosfato]) como receptor (tabla1; Young 1967). No obstante, bacterias de *B. subtilis* en fase L, que carecen de pared, son susceptibles de infectarse por ϕ 29, lo que sugiere que podría existir una segunda fase de reconocimiento y adsorción a nivel de la membrana plasmática (Jacobson y Landman 1977). El fago SPP1 también infecta *B. subtilis* y emplea el ácido teicoico como receptor primario, pero la adsorción irreversible tiene lugar cuando se asocia a la proteína de membrana YueB (tabla1; São-José et al., 2004). Otros fagos que también presentan un receptor proteico son ϕ 2 (Pip) y γ (GamR). Los receptores de naturaleza proteica en bacterias Gram (+) pueden mediar tanto la adsorción de tipo reversible (p.ej: GamR) como la adsorción irreversible (en los casos de YueB y Pip).

Además de lo ya mencionado, algunos fagos con cola pueden utilizar el flagelo de bacterias Gram (+) móviles como receptor. Por ejemplo, el fago PBS1 se adsorbe de manera reversible al filamento y de forma irreversible al cuerpo basal del flagelo (Lindberg 1973).

	Bacteria hospedadora	Fago	Receptor primario	Receptor secundario	Familia
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	T4	LPS (<i>E. coli</i> B), OmpC (<i>E. coli</i> K-12)	LPS	Myoviridae
		K20	LPS	OmpF	Myoviridae
		T2	LPS	OmpF	Myoviridae
		T-Par (Ox2,K3,M1, Tull)	LPS/OmpA	OmpA	Myoviridae
		TLS	LPS	ToIC	Siphoviridae
		T5	LPS	FhuA	Siphoviridae
		Rtp	LPS	LPS	Siphoviridae
		BF23	BtuB	BtuB	Siphoviridae
		T1	FhuA	FhuA	Siphoviridae
		λ	LamB/OmpC	LamB/OmpC	Siphoviridae
		φX174	LPS	LPS	Microviridae
		M13	Pili	ToIA	Inoviridae
		f1	Pili	ToIA	Inoviridae
		fd	Pili	ToIA	Inoviridae
		MS2	Pili	Pili	Leviviridae
		Qb	Pili	Fosfolípidos	Leviviridae
<i>Salmonella typhimurium</i>	P22	LPS	LPS	Podoviridae	
	ε15	LPS	LPS	Podoviridae	
	Gifsy-1, Gifsy-2	Ompc	OmpC	Siphoviridae	
<i>Pseudomonas syringae</i>	φ13	LPS	LPS	Cystoviridae	
	Φ6	Pili	Fosfolípidos	Cystoviridae	
<i>Yersinia pestis</i>	Yep-phi	LPS/OmpF, Ail	LPS	Podoviridae	
Gram (+)	<i>Bacillus subtilis</i>	φ25	Ac. teicoicos	Ac. teicoicos	Myoviridae
		φ29	Ac. teicoicos	Posible receptor de Mb. citoplasmática	Podoviridae
		φ3T	Ac. teicoicos	Ac. teicoicos	Siphoviridae
		SPP1	Ac. teicoicos	YueB	Siphoviridae
	<i>Listeria monocytogenes</i>	A511	PG	PG	Myoviridae
<i>Lactococcus lactis</i>	c2	PG	Pip	Siphoviridae	

Tabla1: Recopilación de bacteriófagos y sus correspondientes receptores bacterianos. A continuación se listan las referencias utilizadas para esta recopilación: T4 (Yu y Mizushima,1982; Mosig y Eiserling 2006),K20 (Traurig y Misra 1999), T2,T-par(Yu et al. 1981), TLS (German y Misra 2001),T5 (Heller y Braun 1982), Rtp (Wietzorrek et al. 2006), BF23 (Heller y Schwarz 1985), T1 (Letellier et al. 2004), λ (Ryter et al. 1975), φX174 (Feige y Stirm 1976), M13, f1, fd (Webster 1996), MS2, Qb (van Duin 1988), P22 (Steinbacher et al. 1996), ε15 (Chang et al. 2010), Gifsy-1, Gifsy-2 (Ho y Slauch 2001), φ13 (Qiao et al. 2000), φ6 (Romantschuk y Bamford 1985), Yep-phi (Zhao et al., 2013), φ25, φ29 (Young 1967),φ3T (Estrela et al. 1991), SPP1 (São-José et al. 2004), A511 (Wendlinger et al. 1996), c2 (Geller et al. 1993).

1.2.1.2 Bacterias Gram (-):

En las bacterias Gram (-) la capa de peptidoglicano es mucho más fina (de 2,5 a 7,5 nm de espesor) respecto a las Gram (+), pero compensan esta pérdida de rigidez con una membrana externa adicional que aísla a la bacteria del medio externo. La membrana externa es una bicapa asimétrica compuesta por fosfolípidos en su cara interna, lipopolisacáridos (LPS) en su cara externa así como proteínas integrales y periféricas. (Fig.1.4).

Los lipopolisacáridos (LPS) son glicolípidos complejos que se anclan a la membrana externa mediante su porción lipídica (lipido A) mientras que la región hidrofílica (compuesta por una cadena de oligosacáridos) está expuesta al medio externo (Fig.1.5). La parte glucídica varía mucho de una especie a otra pero mantiene la estructura de un núcleo glucídico interno formado por una secuencia corta de heptosas, hexosas y N-acetil-glucosamina que conecta con el lípido A mediante dos o tres moléculas de cetodesoxioctanato (KDO). Al núcleo se puede unir un polisacárido ramificado (antígeno-O) constituido por repeticiones de cuatro o cinco hexosas.

Las cepas de Gram (-) pueden ser clasificadas como *smooth* (lisas) o *rough* (rugosas) por la presencia o ausencia del antígeno-O (Lindberg 1973). Debido a sus grupos fosfato, los LPS proporcionan carga negativa a la superficie bacteriana. Pueden asociarse a cationes divalentes (p.ej.: Mg^{2+} , Ca^{2+}) que neutralizan sus cargas. Esto facilita la unión fuerte entre los LPS, sobre todo mediada por los grupos acilo de las ácidos grasos saturados. Dicha unión fuerte entre las moléculas de LPS hace que la membrana externa sea muy impermeable a moléculas hidrofóbicas (Nikaido 2003).

Las proteínas integrales de la membrana externa (OMPs) otorgan una permeabilidad selectiva a la membrana. Pueden ser porinas, por las que pueden difundir moléculas hidrofílicas de hasta de 700 daltons, (p.ej.: OmpC, OmpF, PhoE); transportadores específicos (p.ej.: LamB, FhuA) o tener otras funciones, como OmpA, que es una proteína estructural que participa en la estabilización de la membrana externa. Casi todas las porinas son barriles- β formados por láminas- β antiparalelas que forman un poro interno central de carácter muy hidrofílico (Fig. 1.6). Algunas OMPs se encuentran en

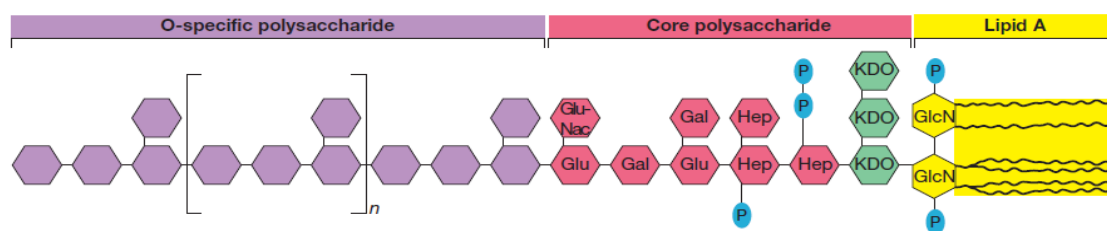


Figura 1.5: Estructura de un lipopolisacárido. Los lipopolisacáridos (LPS) son glicolípidos complejos. La porción lipídica (lipido A) consta de dos moléculas de glucosamina-fosfato unidas a ácidos grasos. El disacárido se une a su vez al núcleo glucídico del LPS (core) por medio de dos o tres moléculas de cetodesoxioctanato (KDO). Al núcleo se puede unir también un oligosacárido ramificado (antígeno O). Figura tomada de Madigan et al. 2008.

la membrana en forma mayoritariamente monomérica (p.ej.: OmpA), Otras OMPs se hayan formando trímeros en la membrana, como por ejemplo OmpF. Cada porina presenta afinidad por determinados solutos (Silhavy et al., 2010; Fig.1.6). En la membrana externa también podemos encontrar lipoproteínas, que presentan un dominio lipídico de anclaje a la cara interna de la membrana externa. Un ejemplo es la lipoproteína de Braun (Braun and Sieglin, 1970), que establece uniones entre la membrana externa y la fina capa de peptidoglicano.

Al espacio comprendido entre la membrana externa y la membrana citoplasmática se le denomina espacio periplásmico o periplasma. En él se localiza la fina capa de PG y otras proteínas como nucleasas, chaperonas y proteínas de los sistemas transportadores.

Los fagos que infectan bacterias Gram (-) pueden utilizar LPS y porinas como receptores primarios o secundarios. Por ejemplo, el fago T4 emplea OmpC como receptor primario y LPS como receptor secundario cuando infecta bacterias *E. coli* K-12 (tabla 1; Mosig y Eiserling, 2006). En cambio, el fago T5 usa LPS como receptor primario y FhuA, como receptor secundario (Heller y Braun 1982).

Los fagos que se unen a los LPS pueden reconocer de forma específica el antígeno-O en las cepas *smooth* (que varía mucho de una cepa a otra). Así, el fago P22 se adsorbe de forma irreversible al antígeno-O y lo hidroliza mientras que el fago T5 interacciona con el antígeno-O de forma reversible.

Los fagos que infectan cepas *rough* suelen reconocer el núcleo de oligosacáridos y tienen un espectro de bacterias hospedadoras más amplio, ya que es una región mucho más conservada (Letellier et al. 2007). Ejemplos de fagos con afinidad por el núcleo de oligosacáridos son los fagos ϕ X174 (Feige y Stirm 1976) y Yep-phi (Zhao et al., 2013).

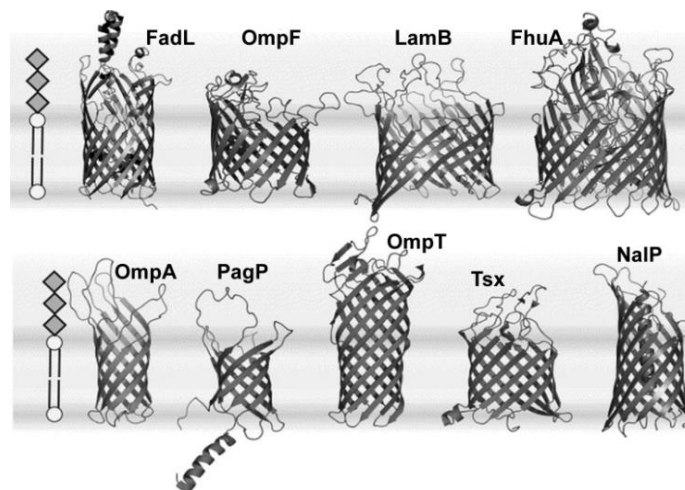


Figura 1.6: Estructura de algunas proteínas integrales de la membrana externa (OMPs) tipo barril- β . Los dominios barril- β de estas OMPs tienen un número par de láminas antiparalelas transmembrana: 8 para OmpA, 8 para PagP, 10 para OmpT, 12 para Tsx y NalP, 14 para FadL, 16 para OmpF, 18 para LamB y 22 para FhuA. OmpA es una proteína estructural y un canal iónico para pequeñas moléculas hidrófilas. PagP es una transferasa de grupos palmitoílo. OmpT es una proteasa. Tsx es un canal para nucleósidos. NalP es un autotransportador. FadL es un transportador de ácidos grasos de cadena larga. OmpF es un poro para la difusión de pequeñas moléculas hidrófilas. LamB es una porina específica para el transporte de maltosa. FhuA es un transportador activo para el ferricromo. Figura adaptada de Kleinschmidt (2006).

1.2.2 La cola de los *Caudovirales*.

La cola es la estructura especializada en mediar el reconocimiento de la superficie bacteriana, por unión a un receptor específico, e internalizar el genoma viral hasta el citoplasma bacteriano. Como se aprecia en la tabla 1, fagos que pertenecen a la misma familia e infectan a bacterias de la misma especie pueden utilizar diferentes receptores para su adsorción. Por ejemplo, los fagos BF23 y T1 son siphovirus que infectan *E. coli* y tienen como receptores BtuB y FhuA, respectivamente. Por el contrario, fagos de diferente familia pueden utilizar el mismo componente de la superficie bacteriana como receptor. Éste es el caso de los fagos $\phi 25$ (*Myoviridae*) y $\phi 29$ (*Podoviridae*), que utilizan los ácidos teicoicos de *B. subtilis* como receptor. No obstante, los fagos con cola que pertenecen a la misma familia presentan una morfología de la cola común que determina su mecanismo de infección.

1.2.2.1 Apéndices especializados en el reconocimiento del receptor.

Las colas presentan apéndices especializados en la adsorción a la superficie bacteriana que cuando son responsables de mediar la adsorción irreversible, se conocen como RBPs (*Receptor Binding Proteins*). Las RBPs pueden consistir en fibras o espículas o formar parte de estructuras más complejas, como las placas basales de los myovirus. Pese a la gran divergencia de las secuencias aminoacídicas que codifican para las RBPs, estos apéndices presentan semejanzas estructurales. En general son homotrimeros ricos en láminas β , con una forma alargada, que presentan regiones flexibles e interacciones hidrofóbicas entre sus monómeros (Fig. 1.7.A; Letellier et al. (2007). La mayoría se ensamblan al conducto de la cola por su extremo N-terminal, mientras que el dominio de unión al receptor (RBD) se localiza en el extremo C-terminal. Existen también otros tipos de apéndices relacionados con la adsorción formados por trímeros de hélices- α superenrolladas, como por ejemplo la aguja del fago P22 (fig. 1.7.B, Xiang y Rossmann, 2011). A continuación se describen las principales características de las colas en cada una de las tres familias.

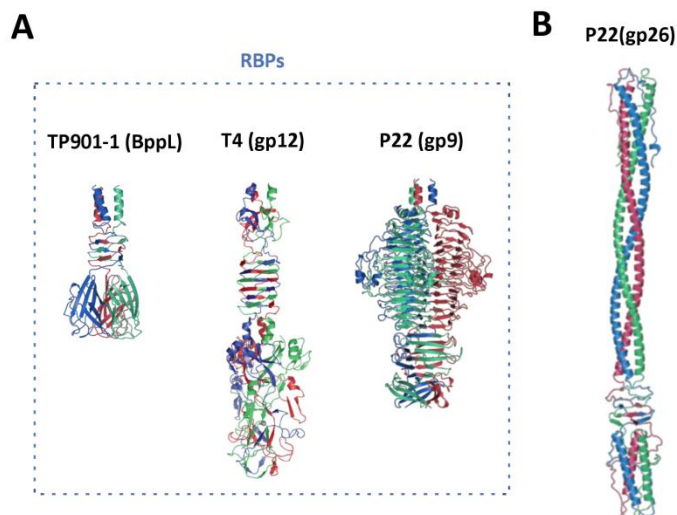


Figura 1.7: Ejemplos de apéndices implicados en la infección. A) Se muestran un ejemplo de proteínas de unión al receptor (RBPs) para cada familia de Caudovirales: trímero de BppL del fago TP901-1 (*Siphoviridae*; PDB: 2FOC), el extremo C-terminal del trímero de gp12 del fago T4 (*Myoviridae*; PDB: 1pdi) y el extremo C-terminal del trímero de gp9 del fago P22 (*Podoviridae*; PDB: 2XC1). **B)** Aguja del fago P22 (trímero de gp26, PDB: 2POH) como ejemplo de apéndice formado por hélices- α superenrolladas.

1.2.2.2 Complejo de la cola en cada familia de *Caudovirales*.

1.2.2.2.1 SIPHOVIRIDAE:

Los siphovirus se unen a una gran variedad de moléculas de las envueltas bacterianas, mayoritariamente proteínas, LPS y ácidos teicoicos. Los dominios de unión al receptor (RBD) suelen localizarse en largas fibras que se ensamblan en el extremo apical del conducto de la cola. Los fagos que reconocen proteínas, como por ejemplo SPP1 y T5 presentan una fibra con un RBD en el extremo del conducto de la cola. Otros siphovirus presentan aparatos de adsorción más complejos. Los siphovirus que infectan bacterias lácticas Gram (+), como por ejemplo aquellos que infectan a la bacteria *Lactococcus lactis*, presentan una "placa basal" similar a la de los myovirus con numerosas RBPs asociadas (tabla 1, Fig. 1.8.B).

El conducto de la cola de los siphovirus es largo y flexible y de longitud variable (puede tener hasta 150 nm de longitud). La regulación de su longitud es llevada a cabo por la proteína TMP ("tape measure protein") que se localiza en el canal interno de dicho conducto, sobre la que se van ensamblando los anillos hexaméricos de proteína TTP ("tail tube protein"), que es la proteína mayoritaria de la cola (Fig. 1.8.C). Sólo se conoce la ruta de ensamblaje para el fago λ , pero la conservación en la ordenación de genes para las proteínas de la cola de los siphovirus, sugiere que puede ser común a otros miembros de la familia *Siphoviridae*. Así, primero se formará el complejo de adsorción (TTC, "tail tip complex") al que se asociará la proteína TMP, sobre la que se ensamblarán las subunidades de TTP hasta alcanzar el extremo de TMP. La proteína TrP ("Tail terminator protein")

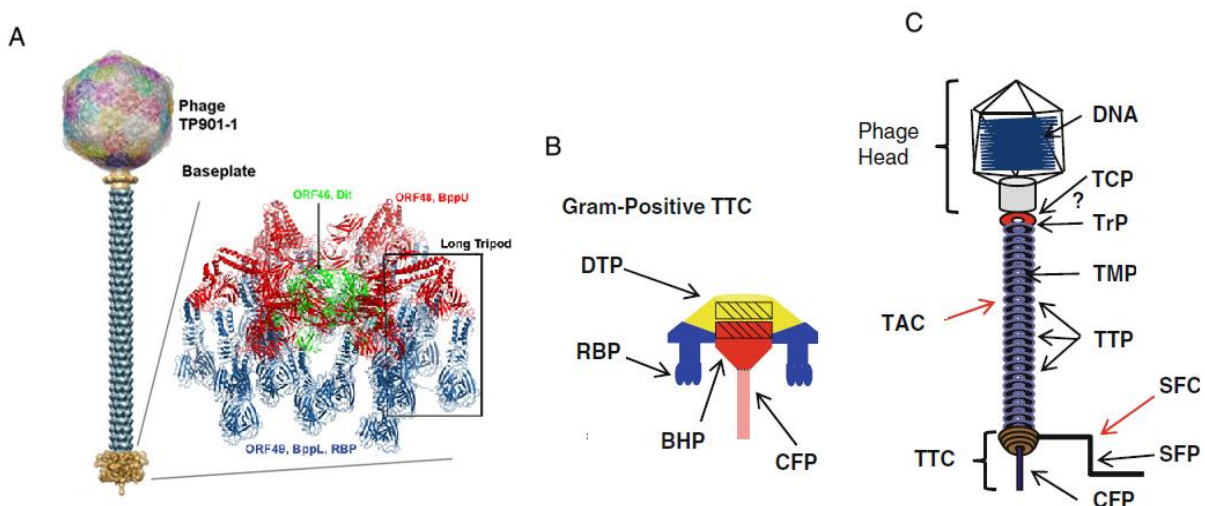


Figura 1.8: Cola de siphovirus. A) Modelo estructural del virión TP901-1 obtenido por criomicroscopía electrónica y estructura cristalográfica del aparato de adsorción localizado al final del conducto de la cola, destacándose RBPs. B) Aparato de adsorción de los siphovirus que infectan bacterias Gram (+) donde se aprecian las fibras de unión al receptor (RBP), la fibra central (CFP), el plato basal (BHP) y la proteína distal (DTP). C) Esquema de las proteínas estructurales de un siphovirus: TCP (Proteína distal de la cola), TrP (Proteína de fin de la cola), TMP (Proteína medidora de la cola), TTP (proteína del conducto de la cola), SFP (fibra lateral), CFP (Fibra central), TTC (complejo de adsorción), TAC (Chaperona de ensamblaje de la cola). La figura A procede de Desmyter, Farenc et al. (2013) y las figuras B y C fueron modificadas de Davidson, Cardarelli et al. (2012)

se unirá a dicho extremo deteniendo la porimerización. Las chaperonas de la cola se encargan del correcto plegamiento de las proteínas (Cuervo y Carrascosa 2012, Davidson et al. 2012). Respecto al mecanismo de eyección, existen datos para los fagos λ , T5 y SPP1. En ellos, tras la interacción del aparato de adsorción con el receptor bacteriano, se producen cambios conformacionales que provocan la salida de la proteína TMP. Dicha proteína TMP formará un canal a través de la envuelta para la internalización del genoma (Davidson et al. 2012).

1.2.2.2.2 MYOVIRIDAE:

Los myovirus presentan una cola larga contráctil que conecta con una cabeza icosaédrica a través de una estructura proteica anular conocida como cuello. De los myovirus conocidos, el fago T4 es el más estudiado y del que existe más información estructural (Fig. 1.9). Posee una cola con simetría helicoidal compuesta por un conducto central asociado a una vaina contráctil que termina en un aparato de adsorción, conocido como placa basal. A la placa basal se unen 6 largas fibras con los dominios de unión al receptor. Además, la placa basal también puede presentar fibras más cortas que participan en la adsorción (Rossmann et al., 2004; Leiman et al., 2010). Tras el reconocimiento del receptor por el aparato de adsorción, se producen cambios conformacionales que se transmiten desde la placa basal hasta la vaina contráctil. Esto provoca una contracción de la cola por la reordenación de las subunidades de la vaina. Dicha contracción provoca que el conducto central (que no es contráctil) sea expulsado a la envuelta bacteriana (Fig. 1.9.B, Leiman y Shneider, 2012). Dicho conducto forma un canal a través de la envuelta para la internalización del genoma en el citoplasma. Existen además proteínas de la cola con actividad glicosidasa que degradan el PG de la pared para la formación del canal.

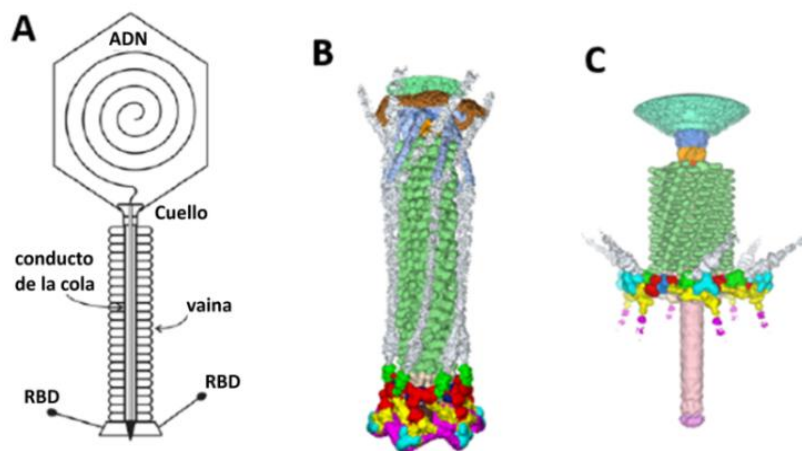


Figura 1.9. Cola de myovirus. A) Esquema de la cola de un myovirus. **B y C)** Estructuras de la cola extendida y contraída del fago T4 obtenidas por microscopía electrónica. Imagen modificada de **Leiman et al. (2010)**.

A excepción de la vaina contráctil, la cola de los myovirus es semejante a la de los siphovirus que infectan bacterias Gram (+). También se han encontrado semejanzas con el sistema de secreción de tipo VI de la membrana citoplasmática (T6SS) de las bacterias Gram (-) y con piocinas tipo R de *P. aeruginosa* (Kanamaru, 2007; Leiman, 2009). Tanto los sistemas T6SS como las piocinas son complejos multiproteicos que forman canales en las membranas bacterianas para el transporte de proteínas/ADN a través de la envuelta. En el caso de las piocinas, su expresión está inducida por daño en el ADN bacteriano y son responsables de la muerte de la bacteria (Leiman y Shneider, 2012). Las semejanzas estructurales entre estos complejos y las colas de myovirus y siphovirus ponen de manifiesto la relación evolutiva entre los fagos y sus bacterias hospedadoras.

1.2.2.2.3 PODOVIRIDAE:

Los podovirus se caracterizan por presentar una cola corta no contráctil formada por un conducto central al que se asocian 6 o 12 fibras (p.ej.: fago T3) o espículas, en caso de que sean de mayor grosor y tengan actividad enzimática (p.ej.. fago P22). El conducto de la cola se comunica con el conector a través del complejo adaptador (Fig.1.10).

Las proteínas de la cola se ensamblan de forma secuencial, de modo que primero el adaptador se une al conector, después se forma el conducto central y por último las fibras se ensamblan al complejo de la cola (Cuervo et al., 2013). La longitud de la cola de los podovirus no es lo suficientemente larga como para atravesar la envuelta bacteriana, por lo que en muchas ocasiones se requiere que proteínas adicionales participen en la infección. Tal es el caso de los fagos con un núcleo proteico en el interior de la cabeza, como el fago P-SSP7 o el fago T7. Durante el proceso de infección, dichas proteínas del núcleo se ha hipotetizado que se eyectan junto con el genoma viral para asistir la internalización del ADN en el citoplasma bacteriano (Casjens y Molineux 2012, Cuervo y Carrascosa 2012).

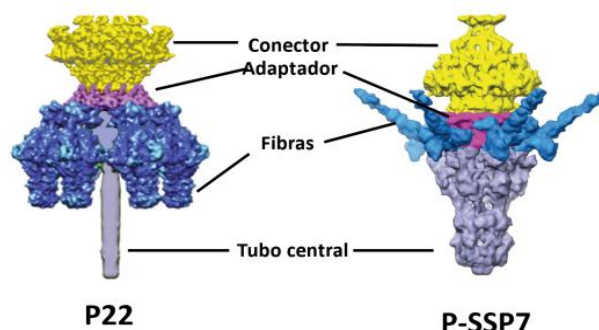


Figura 1.10: Estructura de la cola en podovirus. Los podovirus mantienen una arquitectura general de 6 o 12 fibras asociadas a un tubo central corto y no contráctil y un adaptador que conecta el tubo con el conector. Las fibras se unen al receptor en su extremo C-terminal. Los modelos obtenidos por criomicroscopía electrónica fueron adaptados de Casjens y Molineux (2012)

1.3. El fago T7

1.3.1 Estructura del bacteriófago T7

El fago T7 es un podovirus y al igual que otros miembros de la familia *Podoviridae*, presenta una cola corta no contráctil y una cabeza icosaédrica (Fig. 1.11). La cabeza está compuesta por múltiples copias de la proteína gp10, que adopta un plegamiento tipo HK97. En el interior de la cabeza se localiza un núcleo proteico asociado al conector y al genoma viral (ADN de doble hebra de unas 40Kb). Dicho núcleo proteico está compuesto por tres proteínas, que se ensamblan formando anillos de diferente orden de simetría. El anillo de gp16 presenta orden de simetría 4 y se localiza en la región más distal al conector. Gp14 forma un anillo de orden 12 que se une por una de sus caras al conector y por la otra al anillo de orden 8 formado por gp15 (Fig. 12.B, Agirrezabala et al.,2005).

El conector es un dodecámero formado por la proteína gp8 que se localiza en uno de los vértices de simetría 5 de la cápsida y conecta la cola con la cabeza madura. Presenta un motivo α - β muy conservado entre los *Caudovirales* (Agirrezabala et al. 2005). Dicho motivo es el responsable de formar el canal central a través del cual se transloca el ADN durante los procesos de morfogénesis e infección.

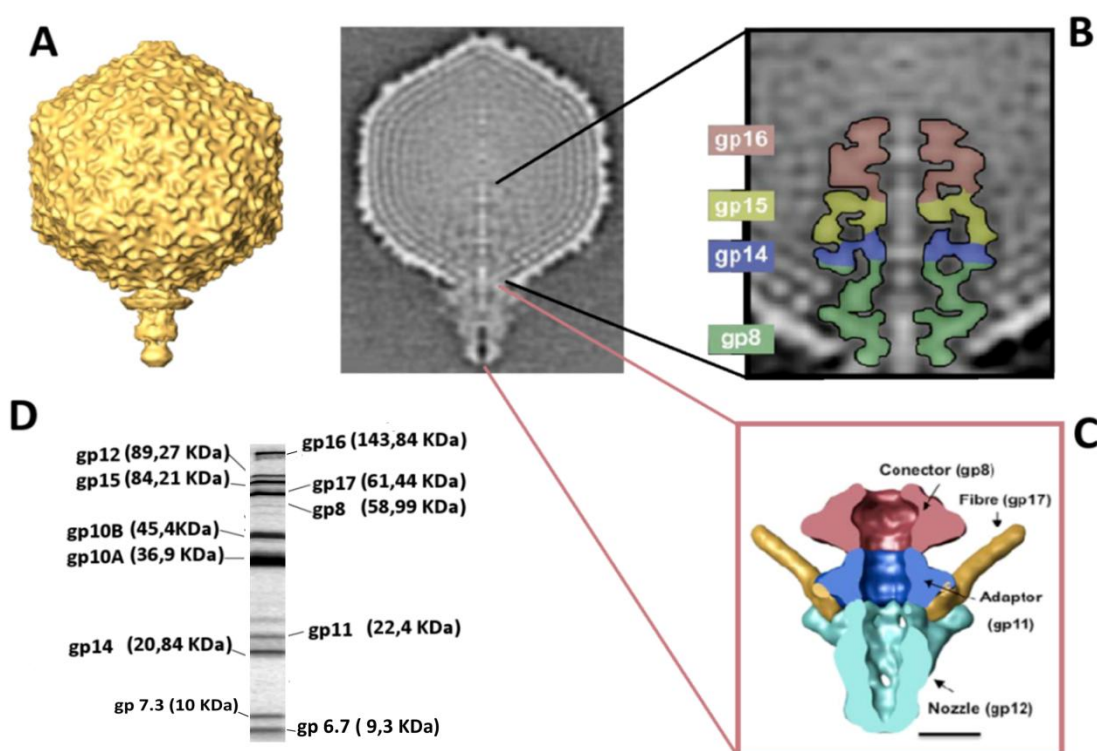


Figura 1.11: Estructura del fago T7. A) Reconstrucción tridimensional de las partículas maduras del bacteriófago T7 y sección central de la reconstrucción (Agirrezabala et al. 2005). B) Sección central correspondiente a la reconstrucción de viriones maduros donde se aprecia la estructura del núcleo interno (Agirrezabala et al. 2005). C) Sección central de la reconstrucción de la cola (Cuervo et al. 2013). D) Gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes de las proteínas estructurales del fago T7. Imagen adaptada de Kemp et al. (2005).

La cola se une al conector mediante su dominio adaptador, que también presenta simetría de orden 12 y está constituido por la proteína gp11. El conducto central presenta simetría de orden 6 y está formado por 6 copias de gp12 (Cuervo et al. 2013). Al conducto central se asocian 6 delgadas fibras. Cada una está constituida por un trímero de gp17 (Steven et al., 1988). Presentan un dominio N-terminal de unión a la cola y un dominio C-terminal de unión al receptor bacteriano (García-Doval y van Raaij 2012). Además, la proteína 7.3 es una proteína estructural que podría formar parte del complejo de la cola, aunque todavía no hay datos estructurales y ni bioquímicos para su localización precisa (Kemp et al. 2005). En el interior del complejo de la cola discurre un canal central que comunica con el canal del conector y con el canal del núcleo proteico de la cabeza. En el interior de dicho canal se localiza el extremo 5' terminal del ADN (iniciador de la transcripción) de unas 850pb (Agirrezabala et al. 2005). Dicho extremo será el primero en internalizarse en el citoplasma bacteriano y codifica para los genes mediadores de la infección (Molineux 2001).

1.3.2 Ciclo infeccioso de T7:

1.3.2.1 Reconocimiento del receptor e Internalización del genoma de T7.

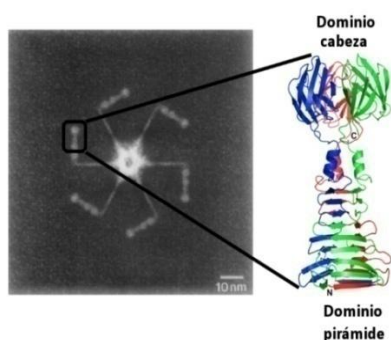


Figura 1.12: Estructura cristalográfica del extremo distal de la fibra. A) Micrografía electrónica mostrando una vista frontal del complejo de la cola, teñida a con acetato de uranilo al 2% (Steven et al. 1988). B) Región distal de la fibra donde se aprecia un dominio piramidal y un dominio globular de unión al receptor en el extremo C-terminal (García-Doval y van Raaij 2012).

El fago T7 presenta un ciclo lítico y libera, en condiciones óptimas, más de 100 fagos progenie por célula en aproximadamente 25 minutos. Infecta cepas *rough* de *E. coli* (B, C, y K-12), de *Shigella spp.* y de *S. entérica* (Lindberg 1973, Casjens y Molineux 2012). Las fibras se unen al receptor bacteriano por su región C-terminal, aunque todavía se desconoce el mecanismo de dicha interacción a nivel molecular (García-Doval y van Raaij 2012). Las fibras presentan 2 regiones, proximal y distal, en función de su proximidad al conducto de la cola (Fig 1.12) Recientemente Hu y colaboradores han demostrado mediante tomografía electrónica que, a consecuencia de la

adsorción irreversible, las fibras cambian su orientación. En las partículas infectivas, las regiones distales se disponen alrededor de la cabeza, en contacto con la cápsida. Tras la adsorción irreversible, las regiones proximales adoptan una orientación meridional y las distales se orientan hacia la membrana externa, con la que tienen un contacto directo (Hu et al. 2013). Además, en las reconstrucciones tomográficas de los fagos que han eyectado su genoma presentadas por Hu, el

complejo del núcleo proteico ya no se observa en la cabeza viral y por contra, aparece una masa extra asociada a la cola que conecta las membranas interna y externa de la envuelta (Fig.1.13). Hu y colaboradores proponen que dicha masa corresponde al complejo proteico del interior de la cabeza. Tras la adsorción irreversible, se abre el canal central que va desde la cola hasta el interior de la cabeza. Las proteínas del núcleo se translocarían entonces a través de dicho canal junto con el ADN. Una vez llegasen a la envuelta, formarían un canal que conectaría ambas membranas por donde el ADN se introduciría en el citoplasma bacteriano de forma segura. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la proteína gp16 del núcleo presenta actividad transglicosilasa que le permite hidrolizar el peptidoglicano de la pared (Moak y Molineux, 2001).

Por otra parte, experimentos con mutantes de T7 sensibles a supresor (ambar) han permitido detectar otras proteínas minoritarias (gp6.7 y gp7.3) relacionadas con la infección (Roeder y Sadowski, 1977), de forma que deleciones en estas proteínas disminuyen notablemente la adsorción de los mutantes de T7 a la superficie de *E. coli* (Kemp et al., 2005).

Además de lo ya mencionado, en la internalización *in vivo* del genoma de T7 participan más elementos. Se ha descrito que la translocación del genoma no es un proceso continuo, sino que se produce a saltos que vienen marcados por la propia secuencia del ADN viral. El primer segmento en internalizarse y ser transcrito por la ARN polimerasa bacteriana sería aquél de 850 pb retenido en el canal de la cola de las partículas infectivas. La polimerasa actúa como un motor, de modo que iría translocando el ADN hacia el citoplasma a medida que realiza la transcripción. Entre las proteínas tempranas que se expresan se encuentra la ARN polimerasa de T7, que realiza la translocación y transcripción del 80% de genoma restante. El proceso global tiene una duración de 10 minutos a 30°C y requiere que haya una diferencia de potencial en la membrana citoplasmática (Molineux 2001).

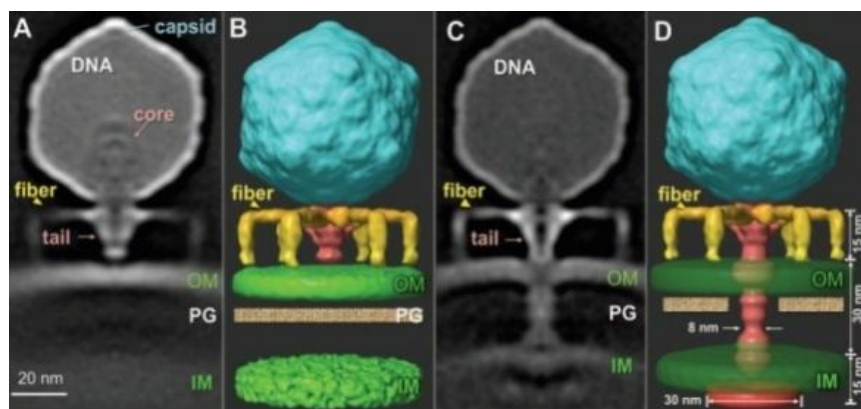


Figura 1.13: Complejo de adsorción del fago T7. Se muestra la sección central (A) y el modelo 3D (B) resultante de promediar subvolúmenes de 3352 fagos T7 asociados a la membrana. En C) se presenta la sección central y en D) el modelo 3D resultado de promediar subvolúmenes de 1886 partículas que se han adsorbido de manera irreversible. Las fibras se unen a la membrana externa, así como el conducto de la cola, que provoca una pequeña invaginación en la membrana. Las proteínas del núcleo interno de la cabeza podrían haberse eyectado junto con el ADN viral para formar un canal que extendería la cola hasta el citoplasma.

1.3.2.2 Morfogénesis de las partículas virales

Tras la internalización del genoma, se expresan los genes tempranos para la infección y para la replicación del genoma viral. A continuación se expresan los genes tardíos, que codifican para las proteínas estructurales del virión. La ruta de ensamblaje del fago T7 se corresponde con la ruta general de los bacteriófagos con cola (Fig.1.14). Primero se forma una partícula precursora a partir de la proteína de la cápsida, el conector, la proteína de andamiaje gp9 y las proteínas del núcleo interno gp14, gp15 y gp16. Después las proteínas de andamiaje se disocian de la precabeza y el complejo terminasa se acopla temporalmente al conector para translocar activamente el ADN al interior de la precabeza. Entonces, las paredes de la cápsida se expanden y adelgazan, finalizando la maduración de la cabeza (Cerritelli et al. 2003; Ionel et al., 2010). El núcleo proteico también experimenta cambios conformacionales durante la maduración hacia cabeza madura (Agirrezabala et al., 2007). Además de intervenir en la internalización del genoma, podría estabilizar el ADN del interior de la cabeza, ya que mutantes defectivos en las proteínas del núcleo interno no dan partículas maduras estables (Serwer 1976).

Las proteínas de la cola se ensamblan de forma secuencial a las cápsidas maduras. Primero, el adaptador formado por gp11 se une al conector cerrando el canal y evitando así la salida de la molécula de ADN del interior de la cápsida, impulsada por la elevada presión a la que está sometida. A continuación se ensamblan 6 copias de gp12 al adaptador, formando el tubo central. Por último, seis fibras compuestas por gp17 se asocian al complejo de la cola (Cuervo et al. 2013). Una vez formadas las partículas infectivas, tiene lugar la lisis de la bacteria hospedadora y la liberación de las partículas infectivas para empezar un nuevo ciclo.

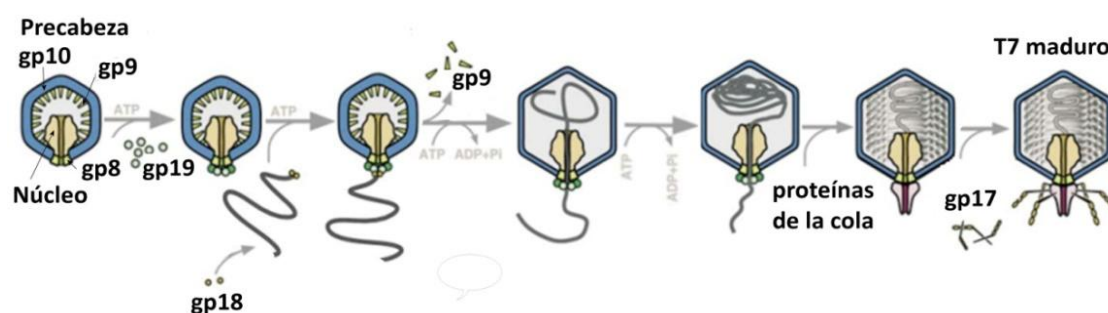


Figura 1. 14: Ruta de ensamblaje de las partículas virales del fago T7. Figura adaptada de (Cerritelli et al. 2003)

1.4. Microscopía electrónica de transmisión para el estudio de partículas virales.

Las partículas virales son extremadamente pequeñas (20-500 nm) y no pueden visualizarse con un microscopio óptico (Orlova, 2012). El desarrollo del microscopio electrónico hizo posible la caracterización de los virus de acuerdo a su morfología e impulsó la clasificación sistemática de las diferentes variantes que se iban descubriendo (Ackermann, 2009). La microscopía electrónica (ME) ha proporcionado además datos estructurales de numerosos virus que han aportado información muy valiosa para comprender su mecanismo de infección, entre otras funciones. En el caso de los bacteriófagos, la ME está especialmente indicada para el estudio estructural del virión completo, ya que la cola y otros apéndices dificultan su cristalización y por sus dimensiones, no son apropiados para la resonancia magnética nuclear (RMN), que generalmente no resuelve complejos de más de 50 KDa.

La ME presenta un amplio rango de resolución que comprende desde la determinación de la estructura de una proteína o un complejo a escala subnanométrica, hasta la caracterización de macroestructuras a nivel celular. En general, se pueden resolver proteínas con un límite inferior de hasta 90 KDa, si bien la flexibilidad y la forma de los complejos influyen considerablemente en el nivel de resolución alcanzado. La ME está especialmente indicada para el estudio de muestras de difícil preparación, ya que requiere poca cantidad del material a estudiar. Además, aquellas proteínas que presentan regiones flexibles y variabilidad conformacional no son adecuadas para la cristalografía de rayos X ni, si sobrepasan los 50KDa, para la RMN. No obstante estas muestras sí podrían ser caracterizadas mediante ME ya que esta técnica permite separar computacionalmente las distintas poblaciones conformacionales (Gómez-Moreno et al., 2003; Orlova y Saibil, 2011; Jonic y Vénien-Bryan, 2009).

Dentro de la microscopía electrónica, existen diferentes técnicas en función de cómo se prepara la muestra y del tipo de microscopio empleado. En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) los electrones (e^-) emitidos por un filamento de tungsteno o de wolframio son acelerados por una diferencia de potencial a través de la columna del microscopio (en condiciones de vacío) y enfocados por lentes electromagnéticas para producir una imagen (Fig. 1.15). La imagen se forma como resultado de la interacción de los e^- con la muestra a estudiar. Cuando los e^- inciden sobre la muestra sufren fenómenos de dispersión elástica e inelástica. Las dispersiones elásticas son el resultado de la interacción entre los e^- y el núcleo de los átomos de la muestra. Son responsables de la formación del contraste por amplitud de la imagen, junto con los e^- transmitidos no dispersados. En las dispersiones inelásticas se produce una interacción entre los e^- y la corteza de los átomos de la muestra. Este tipo de dispersión es

responsable del contraste de fase, además de jugar un papel clave en el daño por radiación de la muestra y de parte del ruido de las imágenes (Castón, 2013). Para minimizar el daño por radiación existen varias estrategias. La técnica de dosis mínima se basa en la irradiación de la muestra con la menor dosis posible ($<10 \text{ e}^-/\text{Å}^2$), por lo que el enfoque y la corrección de las aberraciones de las lentes del microscopio se realizan en zonas adyacentes al área de interés, de manera que ésta solo se irradie en el momento de tomar la fotografía o de registrar la imagen en una cámara digital (Williams y Fisher, 1970). Por otra parte, el desarrollo de la crío-microscopía electrónica permite llevar a cabo la microscopía a la temperatura del nitrógeno líquido, lo que hace que la muestra sea más resistente a la radiación. Además, la muestra analizada por crío-microscopía puede prepararse en su tampón fisiológico. Para ello se lleva a cabo una congelación ultrarrápida de la misma (vitrificación) que impide la formación de cristales de hielo y preserva su estructura nativa. Sin embargo, la crío-microscopía no permite la obtención de imágenes con alto contraste debido a que los materiales biológicos están constituidos básicamente por átomos de C, H, O y N que dispersan muy poco los electrones del haz incidente. No obstante, el procesamiento digital de las imágenes adquiridas permite aumentar la relación señal/ruido. En el caso del procesamiento de partículas individuales se considera que las partículas de las imágenes adquiridas en el microscopio corresponden con las proyecciones en dos dimensiones del espécimen bajo estudio. Posteriormente, esas imágenes se alinean, clasifican y promedian utilizando únicamente la información contenida

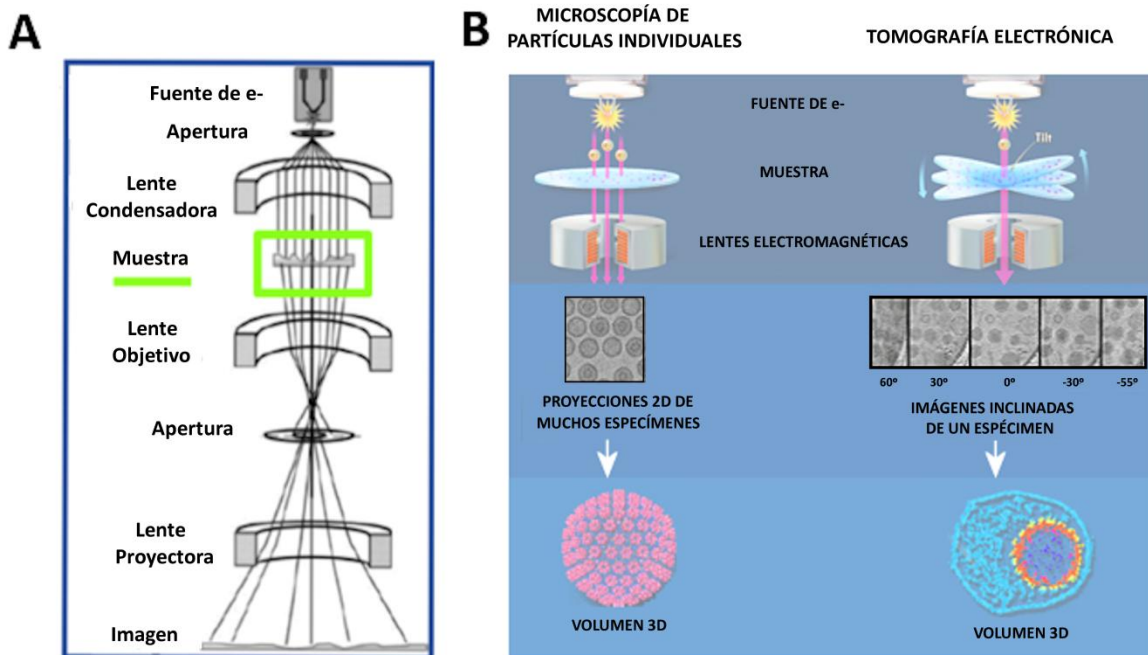


Figura 1.15: esquema del procesamiento por el método de partículas individuales. Image modificada de: <http://people.csail.mit.edu/gdp/cryoem.html>

en los propios datos. Las diferentes clases obtenidas tras la clasificación representan las diferentes vistas de la molécula en diferentes orientaciones. A continuación se asignarán los ángulos correspondientes a cada una de las imágenes (proyecciones) y se reconstruye el modelo tridimensional mediante retro-proyección de las mismas (Fig. 1.16).

En la tomografía electrónica la reconstrucción tridimensional se realiza sobre un único espécimen y no sobre un conjunto de partículas. Esta técnica está más indicada para muestras de mayor tamaño (50-200nm). A diferencia del análisis de partículas individuales, en la tomografía se adquieren imágenes a diferentes ángulos de inclinación del objeto a estudiar y la combinación computacional de estas imágenes (proyecciones del espécimen) permite obtener su estructura tridimensional (tomograma) (Fig. 1.15).

Tanto la microscopía de partículas individuales como la tomografía electrónica presentan limitaciones técnicas, pese a la continua optimización de ambas en los últimos años. Esto hace que en la mayoría de los casos la resolución alcanzada comprenda de los 5 a los 30 Å. La combinación de la microscopía electrónica de transmisión con otras técnicas estructurales como la cristalografía de rayos X permite obtener una descripción completa del espécimen a estudiar y es la tendencia observada en los trabajos de microscopía presentados desde la última década.

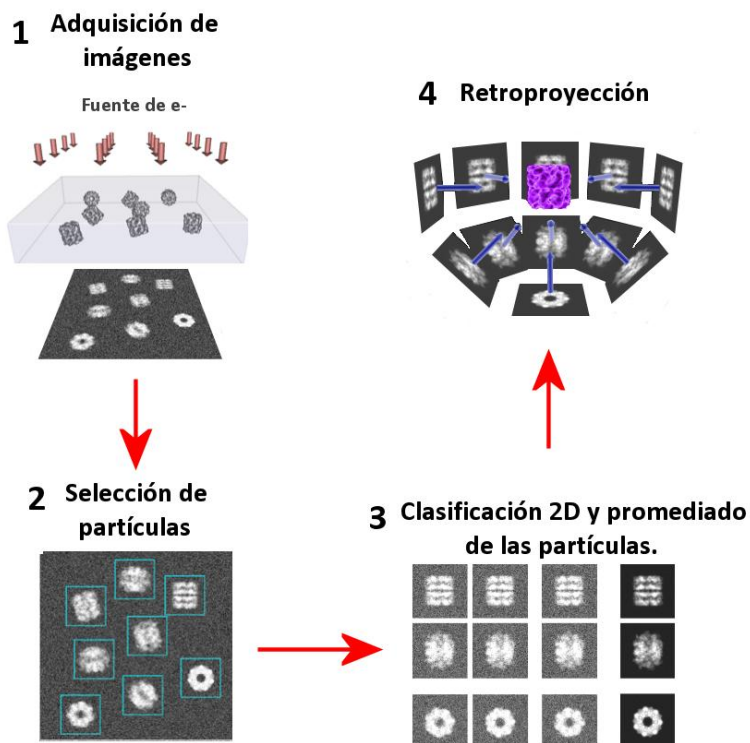


Figura 1.16: Microscopio electrónico de transmisión. A) Esquema de un microscopio electrónico de transmisión, imagen modificada de Orlova, 2012. **B)** Esquema de la reconstrucción de acuerdo con la metodología de partícula única (izquierda) y de tomografía electrónica (derecha). Imagen modificada de: <http://www.eicn.ucla.edu/blog>.

Objetivos

Con el objeto de determinar los mecanismos moleculares implicados en la infección del bacteriófago T7 se pretende:

- 2.1) Estudiar la adsorción de T7 a envueltas bacterianas de *E.coli* BL21 para caracterizar las etapas iniciales de la infección.
- 2.2) Identificar el receptor del fago T7 responsable de desencadenar la eyección del genoma
- 2.3) Caracterizar bioquímicamente la eyección de T7 *in vitro*.
- 2.4) Estudiar el complejo proteico del núcleo, implicado en la infección.
- 2.5) Obtener una reconstrucción tridimensional de la conformación abierta del complejo de la cola mediante crío-microscopía electrónica
- 2.6) Estudiar los cambios conformacionales que se producen en el complejo de la cola tras la infección y trazar un modelo de infección para el fago T7.

Métodos

- 3.1. Preparación de muestra biológicas.
 - 3.1.1 Amplificación y purificación de bacteriofagos.
 - 3.1.2 Titulación de los fagos.
 - 3.1.3. Extracción de ADN viral
 - 3.1.4 Purificación de los complejos de la cola y la cabeza viral a partir de partículas infectivas de T7.
 - 3.1.5 Purificación de envueltas bacterianas de *E.coli* BL21.
 - 3.1.6 Producción de minicélulas de *E.coli*
 - 3.1.7 Producción de anticuerpos contra la cápsida de T7.
- 3.2. Expresión y purificación de las proteínas.
 - 3.2.1 Purificación de gp15.
 - 3.2.2 Purificación de gp16.
 - 3.2.3 Purificación del complejo formado por 15 y 16
- 3.3. Análisis bioquímicos.
 - 3.3.1 Análisis de proteínas por electroforesis y Western Blot.
 - 3.3.2 Cuantificación de proteínas mediante por el método de Bradford.
 - 3.3.3 Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído.
 - 3.3.4 Ensayo de interacción VOPBA.
 - 3.3.5 Ensayo de actividad transglicosilasa (zimograma).
 - 3.3.6 Grafix.
 - 3.3.7 Digestión del ADN viral con la enzima *BstBI*
- 3.4. Ensayos de adsorción e infectividad para el bacteriófago T7.
 - 3.4.1 Ensayos de adsorción de fagos a envueltas de *E.coli*.
 - 3.4.2 Curva de crecimiento del fago T7.
 - 3.4.3 Curva de inactivación del fago T7 incubado en presencia de LPS *rough* de *E.coli*.
 - 3.4.4 Ensayos de protección del ADN viral frente a la digestión por DNasa 1.
 - 3.4.5 Cinética de la eyección del genoma de T7 *in vitro* mediante ensayos de fluorescencia.
- 3.5. Análisis bioinformáticos para las proteínas del núcleo proteico.
- 3.6. Microscopía electrónica.
 - 3.6.1 Preparación de la muestra para su observación por ME.
 - 3.6.2 Reconstrucción tridimensional de partículas individuales.
 - 3.6.3 Reconstrucción tridimensional de fagos T7 adsorbidos a envueltas bacterianas mediante tomografía electrónica.

3.1.Preparación de muestra biológicas.

3.1.1 Amplificación y purificación de bacteriofagos.

Las preparaciones de fago se obtuvieron de acuerdo con el protocolo de amplificación del fago M13 en medio líquido, descrito por Sambrook y colaboradores en el manual "Molecular Cloning" (Sambrook et al.,2001), con alguna modificación. Brevemente, se creció un cultivo de BL21 de *E. coli* a 37°C hasta que se alcanzó una $DO_{600nm} \approx 0,7$ y se infectó con fagos T7 a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 1. Cuando la DO_{600nm} decayó hasta 0,2 se centrifugó el cultivo en un rotor Sorvall GS3 Sorval (Thermo Scientific) a 8000 rpm, durante 20 min a 4°C, para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se concentró mediante centrifugación (16 horas en un rotor GS3, a 8000 rpm y a 4°C) y el sedimento obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de tampón TMS (Tris-HCl 50 mM pH 7,8; $MgCl_2$ 10 mM; NaCl 0,1M) que se cargó en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio, formado por tres soluciones de densidades 1,45; 1,5 y 1,7 g/cm³. El gradiente se ultracentrifugó en un rotor SW28 (Beckman), durante 4 horas a 22000 rpm y 4°C. La banda correspondiente al fago se extrajo mediante punción lateral y se dializó frente a TMS.

3.1.2 Titulación de los fagos.

La titulación de fagos se realizó mediante el procedimiento descrito por Adams (Adams, 1959). Primero se sembraron diluciones seriadas de la preparación de virus, junto con bacterias en fase de crecimiento ($DO_{600nm} \approx 0,8$) sobre una base de Top Agar y se incubaron una noche en la estufa a 37°C. Posteriormente se contaron las placas de lisis y se calculó el título correspondiente a cada preparación.

3.1.3. Extracción de ADN viral

Se siguió el protocolo de extracción de ADN del fago λ , utilizando DNasa I y proteinasa K (Sigma-Aldrich), explicado en el manual "Molecular Cloning" escrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 2001).

3.1.4 Purificación de los complejos de la cola y la cabeza viral a partir de partículas infectivas de T7.

Para la purificación de colas y cabezas de T7 a partir de virus maduros se sometió a las partículas virales a un tratamiento con EDTA y calor, de acuerdo con el protocolo publicado por Cuervo y colaboradores (Cuervo et al., 2013 a). Brevemente, las partículas maduras de T7 se sometieron a un tratamiento con EDTA 0,1M y calor (45 minutos a 65°C) con el fin de obtener colas y cabezas vacías. La muestra se incubó posteriormente con DNasa I a 10µg/ml (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C y se centrifugó a 42000 rpm durante 3h en un

rotor SW55Ti (Beckman) para concentrar los complejos. Éstos se resuspendieron en tampón TMS y se cargaron en un gradiente del 10-40 % de sacarosa que se corrió en un rotor SW55Ti a 35000 rpm durante 1 hora y 45 minutos a 4º C . Los complejos de la cola asociados al conector migraron en las primeras fracciones del gradiente. Las cápsidas vacías migraron en las fracciones intermedias del gradiente. Los virus vacíos con cola en las últimas fracciones y los virus llenos que resistieron el tratamiento migraron hasta el fondo del tubo.

Las fracciones seleccionadas se dializaron en TMS y se concentraron mediante ultrafiltración en celdas Amicon (Millipore), utilizando membranas de nitrocelulosa regenerada.

3.1.5 Purificación de envueltas bacterianas de *E. coli* BL21.

Las envueltas de *E. coli* BL21 fueron purificadas de acuerdo con el protocolo descrito por Puig y colaboradores, con alguna modificación (Puig et al., 2001). Primero se creció un cultivo de *E. coli* BL21 en medio LB a 37º C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,7 y después se centrifugó el cultivo a 8000 rpm en un rotor Sorvall GS3 durante 20 min a 4º C. A continuación se resuspendió el sedimento de bacterias en un volumen mínimo con tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7.8 y después se añadió el mismo volumen de Tris-sacarosa (Tris-HCl 0,2 M y de sacarosa 0,8 M pH 7.8). A continuación se añadió el doble de volumen de agua Mili-Q para provocar un choque osmótico en las bacterias, que se transforman entonces en esferoplastos. Posteriormente se añadieron nucleasas e inhibidor de proteasas (PMSF 1mM, $MgSO_4$ 20mM, DNasa I a 100 µg/ml y RNasa a 100µg/ml). A continuación se realizó la rotura mecánica de las bacterias pasando 3 veces la muestra por una prensa hidráulica (Thermo Scientific) a 1000 p.s.i. Después se centrifugó el lisado a 3500 rpm durante 10 minutos a 4º C en una centrifuga de mesa (Eppendorf 5810R) para eliminar las bacterias completas y los restos celulares grandes. El sobrenadante se concentró mediante centrifugación a 11000 rpm durante 20 minutos a 4º C en un rotor Sorvall SS34. El sedimento resultante fue resuspendido en un volumen mínimo de sobrenadante y se cargó en colchones de sacarosa al 60% sacarosa (p/v) (sacarosa 1,75 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,8; $MgCl_2$ 10 mM; NaCl 0,1M) que fueron centrifugados durante 90 min a 22800 rpm a 4º C en un rotor SW41 (Beckman). La fracción membranosa de cada colchón fue extraída por punción con una jeringuilla y fue centrifugada de nuevo (15 minutos a 13000 rpm en centrífuga Eppendorf 5418 a 4º C) para finalmente conservar el precipitado a -20 º C.

3.1.6 Producción de minicélulas de *E. coli*

Las minicélulas producidas por la cepa de *E. coli* MG1655, fueron purificadas de acuerdo con el protocolo de Carlos Piñero Lambea, del grupo de Biotecnología de Sistemas de

Secreción de Proteínas, dirigido por el Prof. Luis Angel Fernandez. Brevemente, se crecieron las bacterias de la cepa MG1655 durante 16 h a 37°C con IPTG a 0,05 μ M y en buenas condiciones de aireación. Transcurrido ese tiempo se centrifugó dos veces el cultivo en un rotor Sorvall SLA-1500 para separar la producción de minicélulas de las bacterias parentales, que quedaron en el precipitado. La primera centrifugación a poca velocidad en un rotor Sorvall SLA1500 a 1800rpm durante 20 minutos a 4°C, para separar las bacterias más grandes y la segunda centrifugación en el mismo rotor a 10000 rpm durante 20 minutos para concentrar las minicélulas en el segundo precipitado. Posteriormente se resuspendió la preparación de minicélulas con un volumen mínimo de optiprep al 4% y se cargó la muestra en un gradiente del 6-20% de optiprep (w/v) que se centrifugó en una centrifuga de mesa (Eppendorf 5810R) durante 25 minutos a 4°C y 1500 rpm. Las minicélulas migraron hasta la mitad del gradiente (del 10-12% de optiprep) y se recogieron por aspiración con una pipeta Pasteur. La fracción recuperada se concentró nuevamente por centrifugación (15 min, 13000 rpm, 4°C en centrifuga de mesa Eppendorf 5415D). Para eliminar completamente la fracción de bacterias parentales, las minicélulas se sometieron a un segundo ciclo de purificación (repetiendo los pasos de centrifugación y separación en un gradiente del 6-20% de optiprep). Finalmente, la fracción de minicélulas purificada se conservó a 4 °C con 200 μ g/ml de gentamicina.

3.1.7 Producción de anticuerpos contra la cápsida de T7.

Para la producción de anticuerpos contra las cápsidas virales de T7 se purificó la proteína gp10 a partir de virus maduros, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.4 para la obtención de cápsidas vacías. Los anticuerpos policlonales anti-gp10 se produjeron en la Unidad de Desarrollo de Herramientas Proteicas del Centro Nacional de Biotecnología. Para ello se inoculó un total de 2,3 mg de proteína gp10 en 9 ratones BALB/c y se obtuvieron aproximadamente 6ml de suero contra gp10 (con una dilución recomendada de 1/5000 para su aplicación en la técnica Western-Blot).

3.2. Expresión y purificación de las proteínas.

Las proteínas gp15 y gp16 fueron clonadas en el laboratorio en plásmidos pRSETB (Invitrogen) con una cola de histidinas en el extremo N-terminal para facilitar la purificación por afinidad de ambas proteínas. Inicialmente se trató de llevar a cabo la expresión de las mismas en las cepas *E. coli*(DE3) pLys y en su cepa derivada Artic Express. Sin embargo, no se detectó expresión para estas proteínas tras hacer numerosas pruebas de expresión cambiando la temperatura, las horas de inducción y la cantidad de IPTG (de 0.5 a 2mM). Finalmente ambas proteínas se expresaron en la cepa *E. coli* C41, especialmente indicada para la producción de proteínas tóxicas (Miroux y Walker, 1996).

3.2.1 Purificación de gp15

Para la purificación de la proteína gp15 se transformó el plásmido recombinante pRSETB-gp15 en bacterias competentes *E. coli* C41 por el método de choque térmico. Las bacterias así transformadas se crecieron en un cultivo de 2L en medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C en agitación y buenas conciciones de aireación hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 0,6$, momento en el que se indujo la expresión mediante la adición de IPTG 1mM a los cultivos. Tras 3 h de inducción, se concentraron las células mediante centrifugación en un rotor Sorval GS3 a 6000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. El sedimento se resuspendió en un volumen mínimo de tampón de la proteína, de aquí en adelante tampón A (Tris-HCl 100 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, MgCl_2 20 mM, glicerol 5% (p/v)) suplementado con PMSF 1 mM y una pastilla de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor cocktail EDTA free, Roche) y se sometió a una sonicación exhaustiva en hielo para romper las células (de 4 a 6 pulsos de ultrasonidos de 20 segundos con intervalos de descanso de 15 segundos). A continuación se clarificó la muestra mediante centrifugación en un rotor Sorval SS34 a 11500 rpm, 12 minutos a 4°C. Para la purificación de la proteína gp15 se realizó un primer paso de cromatografía de afinidad con una resina de Cobalto capaz de interaccionar específicamente con la etiqueta de histidinas (TALON Metal Affinity Resin, Clontech). Para ello, primero se preparó la resina (2ml) lavandola 2 veces mediante centrifugación y resuspensión el tampón de la proteína. Posteriormente, la resina se incubó con la muestra en el tampón A de la proteína suplementado con 10 mM de imidazol en condiciones de agitación suave durante 16h a 4°C. A continuación se lavó 4 veces la resina para retirar la fracción proteica no unida (centrifugando 3 minutos a 7000 rpm en una centrífuga de mesa a 4°C y resuspendiendo la resina en el tampón de proteína con imidazol a 10 mM). Tras lavar la resina, se procedió a la elución de la proteína incubando la resina en el tampón A con imidazol a 400 mM durante 5 minutos y centrifugando después durante 2 minutos a 2000 rpm en una centrífuga de mesa a temperatura ambiente, para recuperar la proteína en el sobrenadante. La elución se repitió tres veces. La proteína así purificada se analizó por electroforesis y se concentró mediante centrifugación con concentradores Amicon Ultracel (cut-off 10 kDa), en una centrífuga Eppendorf 5804 a 13000 rpm en ciclos de 90 segundos a 4°C hasta un volumen final de unos 300 μl para una segunda purificación por cromatografía de exclusión molecular. En este paso también se intercambió el tampón de la proteína a tampón B (HEPES 50mM pH 7.6, NaCl 100 mM, MgCl_2 20 mM, glicerol 5% (p/v)). La muestra concentrada se cargó en una columna de filtración superosa 6 10/300 GL (GE Healthcare) previamente equilibrada en el tampón B y acoplada a un sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare). La cromatografía se llevó a cabo a

temperatura ambiente a un flujo de 0,3 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml que se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Así mismo, el pico de elución de la proteína (mililitro 15 de elución) se analizó por electroforesis en condiciones nativas, con el fin de analizar el estado oligomérico de la proteína purificada.

La etiqueta de histidinas fue eliminada incubando la proteína purificada en la cromatografía de exclusión molecular (4ml de gp15 a 0,6 mg/ml) con 0,015 µg de enteroquinasa (New England Biolabs) durante 16h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó la muestra durante 1h en agitación a temperatura ambiente con 0,5 ml de resina de Cobalto previamente lavada en tampón B, de acuerdo al procedimiento que se explicó anteriormente. La muestra se recuperó en la fracción no unida a la resina y se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente se concentró hasta 300 µl mediante centrifugación en concentradores Amicon Ultracel para volver a someterla a una cromatografía de exclusión molecular en las condiciones anteriormente descritas. Finalmente, la proteína se conservó en alícuotas a -80°C.

3.2.2 Purificación de gp16

El protocolo de purificación de la proteína gp16 fue semejante al de la proteína gp15 con algunas modificaciones, debido a la diferente solubilidad que presentan y la actividad transglicosilasa de la proteína gp16. En primer lugar, las bacterias competentes *E. coli* C41 transformadas con el plásmido pRSETB-gp16 se crecieron en un cultivo de 6L en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) a 20° C hasta una $DO_{600nm} \approx 0,4-0,6$, momento en el que se indujo la expresión con la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Tras 8 h de inducción, el cultivo se concentró en un rotor Sorvall GS3 a 6000rpm durante 15 minutos, a 4°C. El sedimento se resuspendió en un volumen mínimo de tampón B (suplementado con PMSF 1mM y una pastilla de inhibidores de proteasas) y se sometió a una sonicación exhaustiva en hielo para romper las células. A continuación se clarificó la muestra mediante centrifugación y se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad con la resina de Cobalto. En este caso la proteína siempre se tuvo a 4° C, pues se degrada a temperatura ambiente y se añadió N-dodecil-maltosido a 0,137 mM, una concentración inferior a la concentración micelar crítica, tanto al tampón de lavado (tampón B suplementado con imidazol 10 mM) como en los tampones de elución (tampón B suplementado con imidazol 100-400 mM). El tiempo de incubación de la proteína con la resina fue de 90 minutos a 4°C. Para mejorar la pureza de la muestra se aumentó el número de lavados y la elución se realizó en tres o cuatro pasos con tampones con concentraciones crecientes de imidazol (100,250 y 400mM). La proteína así purificada se sometió a una precipitación seriada con 0-60% sulfato

de amonio ((NH₄)₂SO₄) con el fin de incrementar la pureza de la muestra y concentrarla antes de someterla a un segundo paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular. La muestra que precipitó con 25-40% de (NH₄)₂SO₄ se resuspendió en el tampón de la proteína. El tampón se cambió en concentradores Amicon Ultracel añadiendo el tampón de la proteína con N-dodecil-maltosido a 0,137mM tras cada centrifugación hasta dejar la muestra a un volumen final de 300 µl. La muestra se cargó en una columna de filtración superosa 6 10/300 GL previamente equilibrada en el tampón B (con PMSF a 1mM) y la cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 0,3 ml/min. Se recogieron fracciones de 0,5 ml que se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes. Las fracciones en las que eluyó la proteína se conservaron en alícuotas a -80 °C.

3.2.3 Purificación del complejo formado por 15 y 16

El complejo formado *in vitro* por las proteínas gp15 (sin la etiqueta de histidinas) y gp16 se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular. Los complejos gp15:gp16 se formaron previamente mediante la incubación de ambas proteínas en una relación aproximada 1:1 (incubando 375 µg de gp15 con 420 µg de gp16) durante 20 minutos a 30 °C en tampón B. La muestra se concentró mediante centrifugación con concentradores Amicon Ultracel, como en casos anteriores y se cargó en una columna de filtración superosa 6 10/300 GL. La cromatografía se desarrolló en tampón B suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 1mM y una pastilla inhibidores de proteasas para 1L de tampón de cromatografía). El flujo que se impuso al sistema fue de 0,3ml/min y se recogieron fracciones de 500 µl que se analizaron por microscopía electrónica y mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes.

3.3. Análisis bioquímicos.

3.3.1 Análisis de proteínas por electroforesis y Western Blot.

Para el análisis electroforético de las proteínas en condiciones desnaturizantes se utilizaron geles de acuerdo con el protocolo descrito por Kemp y colaboradores (Kemp et al., 2005):

-gel diferenciador: acrilamida 17 %, bis-acrilamida 0.085%, SDS 0.1%, Tris-HCl in 0.375 M pH 8.75

-gel concentrador: acrilamida 4%, bis-acrilamida 0.75%, SDS 0.1%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8

En el análisis de las proteínas en condiciones nativas, se utilizaron geles al 6 % de acrilamida y tanto el tampón de electroforesis (Tris-HCl 25mM pH 8,0 y glicina 190mM) como el tampón de carga (Tris-HCl 30mM pH 6.8, glicerol 10%(v/v) y azul de bromofenol a 0,25mg/ml) no contenían ni SDS ni agentes reductores como el (DTT o el β -ME).

Para los análisis de inmunodetección con anticuerpos, las proteínas sometidas a electroforesis se electrotransfirieron en condiciones semihúmedas durante 45 min a 14 V a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) previamente incubadas en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, metanol al 20% (v/v) y 0,04 % de SDS). Posteriormente las membranas se incubaron en una solución de bloqueo (TBS 1x, leche desnatada al 3 % (p/v) y Tween20 0,005 % (v/v)), durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y tras un lavado breve con solución de lavado (10 minutos en TBS 1X y Tween20 0,005 % (v/v)) se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Después de tres lavados de 10 min con tampón de lavado, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario adecuado, conjugado con peroxidasa y diluido 1:4000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó como anteriormente y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente con el sistema de detección comercial ECL plus (GE Healthcare) y se visualizó la fluorescencia mediante la exposición de una placa fotográfica (AGFA) y su posterior revelado.

El anticuerpo contra la proteína de la membrana externa OmpA fue cedido por el grupo de Luis Ángel Fernández, del Centro nacional de Biotecnología. Se trata de un anticuerpo policlonal de suero de conejo y se utilizó a una dilución 1/10000. El anticuerpo contra la etiqueta de histidinas es un anticuerpo monoclonal comercial (Sigma) procedente del suero de ratón y se usó a una dilución 1/4000. El anticuerpo contra la proteína gp10 de T7 fue producido en el CNB, como se especifica en el apartado 3.1.7 y se usó a una dilución 1/5000.

3.3.2 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.

La concentración de proteína se estimó de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976) usando el agente de tinción Coomassie Brilliant Blue G-250 de Bio-Rad. Para ello se construyó una recta de calibrado midiendo la absorbancia a 595 nm de BSA (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones (0,1-1 mg/ml) y posteriormente se midió la absorbancia de las diferentes muestras para interpolar los datos en la recta y determinar así la concentración.

3.3.3 Ensayo de interacción VOPBA (Virus Overlay Protein Binding Assay).

Este análisis es una variante de la técnica *Far-Western-Blot* en el que se analiza la interacción de partículas virales con proteínas aisladas en membranas de electrotransferencia y se ha utilizado para identificar numerosos receptores virales (Basak et al., 1994; Koudelka et al., 2007).

Para llevar a cabo el análisis VOPBA, se siguió el protocolo descrito por Puig y colaboradores (Puig et al., 2001). Las proteínas de las envueltas purificadas de *E. coli* BL21 (sección 3.1.5) fueron extraídas con el detergente N-dodecil-maltósido al 2%. El análisis VOPBA se realizó primero en condiciones nativas. Las proteínas se cargaron por duplicado en un gel nativo al 5,5 % (80 µg de proteína por pocillo) y tras migrar el gel, las proteínas de uno de los carriles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y las proteínas del otro carril se tiñeron con azul de Coomassie. Posteriormente se incubó la membrana de transferencia con las partículas virales y con los anticuerpos contra la cápsida viral (ver sección 3.1.7) y tras el revelado de la misma, una banda proteica dio señal de interacción con los virus. Como control, se incubaron las proteínas en presencia de los anticuerpos sin el paso previo de incubar con las partículas virales.

Para identificar las proteínas que interaccionaban con los virus, se repitió la electroforesis en condiciones nativas para cortar la banda proteica reactiva y cargarla en un nuevo gel desnaturante. Se procedió de manera similar al VOPBA en condiciones nativas. Uno de los carriles del gel se tiñó con azul de Coomassie y el otro se electrotransfirió y se incubó con los fagos T7 y después con los anticuerpos contra la cápsida de T7. Tras revelar la membrana, se detectaron dos bandas de proteínas que interaccionaban con el fago T7. Las bandas se analizaron por espectrometría de masas (MALDI TOF-TOF) en la Unidad de Proteómica del CNB.

El análisis VOPBA se repitió tres veces confirmando los resultados.

3.3.4 Ensayo de actividad transglicosilasa (zimograma).

La actividad transglicosilasa de la proteína gp16 purificada se analizó mediante un zimograma, llevado a cabo de acuerdo con el protocolo de Moak y Molineux (Moak y Molineux, 2004) con alguna modificación. Este análisis consiste en someter a las proteínas a una electroforesis desnaturante en condiciones suaves añadiendo peptidoglicano al gel (PG) e incubar después dicho gel en el tampón de la proteína a estudiar a 37°C para que la proteína renaturalice y degrade el PG del gel y posteriormente teñir el PG no hidrolizado con azul de metileno.

Para llevar a cabo nuestro ensayo se creció 1L de bacterias *E. coli* BL21 a 37°C en agitación hasta una $DO_{600nm} \approx 0,5$ y después se concentró por centrifugación en un rotor Sorvall

GS3 (5000 rpm, 10 minutos a 4°C). El precipitado se autoclavó para eliminar los restos de las células y conservar el PG de la pared (resistente al calor del autoclave). Posteriormente se resuspendió el precipitado en 5 ml de agua miliQ y se añadieron 350 µl del extracto al gel diferenciador de la electroforesis. El gel concentrador no llevaba extracto de bacterias y al igual que el diferenciador, contenía menos SDS que los geles desnaturizantes habituales (SDS 0,01%). Las muestras se cargaron en un tampón que contenía Tris-HCl 30 mM pH 6,8, SDS 0,01%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,25 mg/ml. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C (en tampón Tris-HCl 25 mM, Glicina 190 mM y SDS 0,1%) y a un voltaje de 100 V para evitar el calentamiento del gel y la activación del enzima. Al finalizar la electroforesis, el gel se incubó 30 minutos en agua miliQ a temperatura ambiente y después se incubó en el tampón de renaturalización (tampón B con Triton X-100 0,1% (v/v)) durante 16h a 37°C y agitación suave. Pasado ese tiempo, el gel se tiñó con azul de metileno 0,1% y KOH 0,001% y se destiño con agua miliQ hasta visualizar bien las zonas de hidrólisis del PG. Paralelamente se realizó la electroforesis de las proteínas en condiciones análogas pero sin añadir el extracto de bacterias y el gel se tiñó con azul de Coomassie.

3.3.5 Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído.

Para la fijación química del complejo preformado de gp15 y gp16 se incubó 30 µl de la fracción correspondiente al mililitro 13 de la cromatografía de filtración en gel (a 0,3 mg/ml) con glutaraldehído al 0,15 % (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave y la reacción se paró posteriormente con glicina a 80 mM. La muestra se analizó en un gel desnaturizante, de acuerdo con el protocolo de la sección 3.3.2 y se conservó a -80° C.

3.3.6 Grafix.

La técnica GraFix (*Gradient Fixation*) fue desarrollada por Kastner y colaboradores (Kastner et al., 2008) con el fin de estabilizar complejos macromoleculares mediante fijación química con un agente de entrecruzamiento débil, como puede ser el glutaraldehído al mismo tiempo que se centrifuga la muestra en un gradiente de densidad para separar los diferentes componentes en función de su coeficiente de sedimentación. Se empleó para poder determinar la estructura de la proteína gp16 mediante microscopía electrónica, pues además de reducir la heterogeneidad de la muestra, la técnica GraFix permite mejorar el contraste y el número de las vistas que se obtienen del espécimen en las micrografías electrónicas.

Para la realización del Grafix, la proteína gp16 purificada en la filtración en gel (a 0,5 mg/ml) se incubó 20 minutos a temperatura ambiente en tampón HEPES 50mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 20mM pH 7.6 y posteriormente, se cargó en dos gradientes lineales de densidad de 10-

40 % glicerol en tampón B (cargando 100µg de proteína por gradiente). Uno de los dos gradientes contenía a su vez un gradiente de glutaraldehído (0-0,15 %) para la fijación de las distintas formas oligoméricas de la proteína gp16. Los gradientes fueron realizados con un formador de gradientes automático *Gradient Station* (Biocomp) y se centrifugaron en un rotor SW55Ti a 37,000 rpm durante 14 horas a 4°C.

Las fracciones se recogieron en alícuotas de 370 µl desde la parte superior de cada gradiente, con ayuda del *Gradient Station*. Para detener la reacción de entrecruzamiento en las fracciones que contenían glutaraldehído, se añadió glicina a una concentración final de 80 mM a cada fracción. Las muestras fueron analizadas en geles desnaturalizantes al 17% de acrilamida (ver sección 3.3.2) y por microscopía electrónica (ver sección 3.6.2).

3.3.7 Digestión del ADN viral con la enzima *BstBI*.

Para el análisis indirecto de la interacción entre el ADN del fago T7 y la proteína gp15 recombinante, el ADN viral se digirió con la enzima de restricción *BstBI* (New England Biolabs) en presencia de diferentes concentraciones de gp15 (0,015-1,5 mg/ml) o de los controles (Hsp90 y gp8 a 1,5 mg/ml). La enzima *BstBI* presenta 7 dianas de corte en la secuencia del ADN de T7 y la digestión del ADN viral con dicha enzima da lugar a 6 fragmentos que pueden ser diferenciados por electroforesis en un gel de agarosa (presentan tamaños comprendidos entre 1 y 10 Kb).

Para las reacciones de digestión, 3,2 µg de ADN de T7 (purificado de acuerdo con el protocolo de la sección 3.1.3) se incubaron con 2,5 µl de *BstBI*, 3 µl de BSA, 3 µl de tampón de la enzima y agua miliQ hasta un volumen de 22,5 µl, que se juntó con 15 µl de la muestra proteica (dializada en tampón A). La reacción se llevó a cabo durante una noche a 65 ° C y se analizó en gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio.

3.4. Ensayos de adsorción e infectividad para el bacteriófago T7.

3.4.1 Ensayos de adsorción de fagos a envueltas de *E.coli*.

Con el fin de aislar partículas virales del fago T7 adsorbidas a envueltas bacterianas se incubaron $2,5 \cdot 10^{12}$ pfu de T7 con envueltas procedentes de 750 ml de cultivo de *E. coli* BL21 (crecidos hasta una $DO_{600nm} \approx 0,7$ y purificadas de acuerdo con el protocolo de la sección 3.1.5). Para ello las envueltas fueron resuspendidas previamente hasta un volumen de 5 ml en TMS y tras adicionar los virus, la mezcla se incubó durante 3h a 37°C en agitación. Pasado ese tiempo se preparó un gradiente isopínico de Cloruro de Cesio al 22% (p/v) en el que se introdujo la muestra con las membranas y los virus. El gradiente corrió durante 16h a 40000 rpm en un rotor NVT65 (Beckmann). Pasado ese tiempo, las 2 bandas con los fagos asociados a las

envueltas (que migraron hasta aproximadamente la mitad del tubo) se extrajeron mediante punción lateral. La muestra se dializó en membranas de diálisis de celulosa (Millipore) frente a TMS antes de su visualización por microscopía electrónica.

3.4.2 Curva de crecimiento del fago T7.

Para los ensayos de infectividad del fago T7 en la cepa silvestre BL21(DE3) y en la cepa deficiente en porinas BL21(DE3) $\Delta lamB ompF::Tn5 \Delta ompA \Delta ompC$ las bacterias se crecieron en LB a 37°C y en agitación hasta una $DO_{600nm} \approx 0.4$. En el caso del triple mutante, las bacterias se seleccionaron previamente en una placa con kanamicina a 50 µg/ml (Prilipov et al., 1998). Tras crecer las bacterias, se añadieron las partículas virales de T7 a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 3 y a determinados intervalos de tiempo post-infección, se sustrajeron alícuotas de las bacterias infectadas que fueron diluídas en TMS con cloroformo al 3 % (v/v). Para alícuotas extraídas en periodos de tiempo de hasta 10 minutos post-infección, la dilución fue 10^{-6} . En el caso de alícuotas extraídas entre 10 y 30 minutos post-infección, la dilución fue de 10^{-7} y para alícuotas extraídas entre 40 y 60 minutos, la dilución fue 10^{-8} . De cada dilución final se tomaron 100 µl que se sembraron con 200 µl de bacterias BL21(DE3) en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600nm} \approx 0.6$) en medio top-agar, para el recuento de placas de lisis tras una noche de incubación en la estufa a 37°C.

Los ensayos de infección se realizaron en cada cepa por triplicado y con los datos se construyeron las curvas de crecimiento con el editor de textos Excel (Microsoft).

3.4.3 Curva de inactivación del fago T7 incubado en presencia de LPS rough de *E.coli*.

En los ensayos de inactivación se incubaron $3 \cdot 10^{10}$ pfu de T7 partículas con 75 µg de LPS rough de *E. coli* EH 100 en un volumen de 300 µl a 37°C y agitación suave. Tras diferentes periodos de incubación, se extrajeron alícuotas que se diluyeron en TMS en una relación 1:10⁸ y se guardaron en hielo hasta que la última alícuota fue sustraída tras 180 minutos de incubación. Seguidamente, 100 µl de cada alícuota se sembraron en placas de top-agar de manera análoga a como se describe en el apartado 3.4.2. Como control se incubaron los virus T7 en TMS a 37°C durante 180 minutos y se sembró una dilución equivalente al resto de los casos. También se sembró una dilución 10^{-8} procedente del stock de fagos para determinar el título inicial de los fagos. El ensayo de inactivación se repitió por triplicado y los datos se representaron mediante Excel.

3.4.4 Ensayos de protección del ADN viral frente a la digestión por DNasa I.

Esta técnica permite analizar la eyección del genoma de virus que han sido incubados con su receptor. Se procedió de acuerdo con el protocolo propuesto por Oliveira y colaboradores (Oliveira et al., 2005). Las partículas virales ($\sim 10^{11}$ pfu/ml) fueron incubadas en presencia de LPS *rough* de *E. coli* EH100 (Sigma-Aldrich) o de envueltas purificadas de *E. coli* BL21 a 37° C con agitación suave:

-En el caso de los fagos incubados con las envueltas, se mezclaron 3.10^{10} pfu de T7 con envueltas procedentes de 30 ml de cultivo de *E. coli* BL21 crecidos a $DO_{600} \approx 0,7$ y resuspendidas en TMS con 35 μ g/ml de cloranfenicol, hasta un volumen de 80 μ l.

-En el análisis de eyección de los fagos T7 en presencia de los LPS, se incubaron 1.10^{10} pfu de T7 con 25 μ g de LPS *rough* de *E. coli* DH100 resuspendidos en 100 μ l de TMS.

En ambos casos se extrajeron alícuotas de 15 μ l a diferentes tiempos tras el inicio de la incubación que se guardaron en hielo hasta que la última alícuota fue extraída. A continuación, se digirió el ADN eyectado incubando cada alícuota con 20 μ g/ml de DNasa I (Sigma-Aldrich) y $MgCl_2$ 20mM a 37° C durante una hora. Posteriormente la muestra se incubó en presencia de SDS 0,5% (w/v), EDTA 10mM y 20 μ g/ml de proteinasa K (Sigma-Aldrich) a 65° C durante 90 minutos para inactivar la DNasa I y degradar las cápsidas virales. El ADN no eyectado que fue protegido del ataque de la ADNasa se visualiza en un gel de agarosa al 0,8 % (w/v) teñido con bromuro de etidio.

Como control se incubaron $7,5. 10^9$ pfu de T7 en 15 μ l de TMS a 37°C durante 180 minutos y posteriormente se trataron de la misma manera que el resto de las muestras. En ambos casos, los experimentos de protección frente a DNasa I se hicieron por triplicado. En el caso de los fagos incubados con los LPS, se hizo un análisis densitométrico de los tres geles de agarosa con el programa ChemiDoc (Bio-Rad) y se representó gráficamente la disminución del ADN protegido frente al incremento del tiempo de incubación mediante Excel.

3.4.5 Cinética de la eyección del genoma de T7 *in vitro* mediante ensayos de fluorescencia.

Para el análisis fluorimétrico de la cinética de eyección se procedió de manera similar a Andres y colaboradores (Andres et al., 2012) y se eligió el fluoróforo Yo-Yo, ya emite muy poca fluorescencia en solución, pero cuando se une a ADN de doble hebra su emisión de fluorescencia incrementa considerablemente (Hirons et al., 1994). Se utilizó un fluorímetro F-7000 (Hitachi), operando con longitudes de excitación y detección de 491 nm y 509 nm

respectivamente. Primero se incubaron partículas virales de T7 a 5.10^9 pfu/ml con Yo-Yo a $1.1 \mu\text{M}$ (Invitrogen) a 37°C y se detectó la fluorescencia durante 1000s hasta que la señal se estabilizó. Tras ese tiempo, se añadieron los LPS *rough* de *E. coli* DH100 a diferentes concentraciones (1 nM, 2 nM, 5 nM y 25 nM) y se detectó la absorbancia durante un periodo mínimo de 5000 s. Antes de finalizar el experimento se añadió DNasa I ($10 \mu\text{g/ml}$) para confirmar que la señal provenía del ADN eyectado del virus.

Como control, se repitió el ensayo en presencia de los LPS de *E. coli* O111:B4 (1nM) o con fagos T7 incubados, únicamente en presencia de TMS y del fluoróforo. Para la representación gráfica de la cinética de eyección se utilizó el programa kaleidagraph. Se realizó el ajuste de los puntos a las curvas de eyección de acuerdo con la siguiente ecuación (Andres et al., 2012):

$$\text{ADN}(t) = A_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{(K_{\text{apertura}} - K')} \cdot \left(K_{\text{apertura}} \cdot e^{(-K' \cdot t)} - K' \cdot e^{(-K_{\text{apertura}} \cdot t)} \right) \right)$$

Donde A_0 hace referencia a la fluorescencia emitida inicial, K' es la constante que define la velocidad de la unión del fago T7 a su receptor y K_{apertura} es la constante que define la velocidad de la apertura del canal de la cola y la salida del ADN viral.

3.5. Análisis bioinformáticos para las proteínas del núcleo proteico.

La predicción de estructura secundaria de las proteínas gp15 y gp16 se realizó con la plataforma web Predict Protein (Rost et al., 2004). Los alineamientos de secuencias se realizaron con el programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011) y con el programa BLAST (Tatusova, 1999). El modelado del dominio transglicosilasa de la proteína gp16 se hizo con el programa Phyre2 (Kelley et al., 2009). La predicción de la unión a ADN se hizo con el programa DNAbindR (Yan et al. 2006). Por último el análisis de hidrofobicidad y la predicción de dominios transmembrana se realizó con el programa WHAT (Zhai et al., 2001).

Para la predicción de la estructura 3D de la proteína gp16 se empleó el programa Raptor X (Ma et al., 2013) para realizar un diseño por homología remota (*threading*) puesto que no existía homología entre la secuencia de gp16 y la secuencia de ninguna estructura 3D conocida. En los diseños por homología remota se superpone la secuencia problema sobre la estructura de diversas estructuras conocidas y se evalúa como “encaja” en cada una de ellas, de acuerdo a criterios de estructura secundaria, accesibilidad, etc.

3.6. Microscopía electrónica.

3.6.1 Preparación de la muestra para su observación por ME

En la preparación de las muestras por tinción negativa, alícuotas de 5 μ l de muestra se depositaron sobre rejillas de cobre-colodión (Fedelco) sombreadas con carbono e ionizadas justo antes de añadir la muestra, para hacer hidrofílica su superficie. La muestra se incubó 2 min a temperatura ambiente y la rejilla se lavó tres veces con agua miliQ para eliminar el exceso de muestra. El exceso de líquido se eliminó mediante el contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (Whatman). Las muestras se contrastaron por tinción negativa con una solución de ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% durante 3 minutos (en muestras con LPS o envueltas bacterianas) o con acetato de uranilo (AcUr) al 2% (p/v) durante 1 min (en el caso de visualizar complejos proteicos). El exceso de agente de tinción se eliminó por contacto de la rejilla con papel de filtro. Para visualizar las rejillas teñidas con PTA se usó un microscopio JEOL 12000 EX II estabilizado a 100 kV, mientras que la adquisición de imágenes de la proteína gp16 teñida con AcUr se realizó en un microscopio Tecnai G² FEG 200 (FEI) y estabilizado a 200kV.

Para el análisis por criomicroscopía electrónica (crioME), las muestras se vitrificaron con equipo de criopreparación Leica EM CPC. Para ello, rejillas recubiertas con una película de carbón microperforado (*Quantifoil R2/2*) se sometieron a una descarga iónica y después se incubaron con 4 μ l de muestra durante 1 minuto. Tras esta incubación se eliminó el exceso de muestra con papel de filtro y la rejilla se sumergió a alta velocidad en etano líquido (-178°C). Para la adquisición de las imágenes se empleó el microscopio Tecnai G² FEG 200 (FEI) estabilizado a 200kV. La muestra se mantuvo a unos -170°C durante la recogida de datos mediante un criobrazo (modelo 626.53P50 Gatan Inc.) enfriado con nitrógeno líquido. Tanto en el caso de las muestras preparadas por tinción negativa como aquellas preparadas para crío-ME, las imágenes se adquirieron con la cámara CCD de los microscopios, irradiando la muestra a una dosis mínima (<10e⁻/Å) y en un desenfoque de entre -0.5 y -3 μ m.

3.6.2 Reconstrucción tridimensional de partículas individuales.

Para la reconstrucción de la conformación abierta de la cola, partículas virales de T7 a 10¹¹ pfu/ml se incubaron con LPS *rough* de *E. coli* EH 100 a 250 μ g/ml durante 3h a 37°C y agitación suave. Las rejillas se prepararon por vitrificación, de acuerdo al protocolo explicado en el apartado 3.6.1 y las imágenes se adquirieron a 108700 aumentos en un microscopio Tecnai G² FEG 200 una cámara CCD EAGLE 4X (Gatan Inc.). La función de transferencia de

contraste (*Contrast Transfer Function*, CTF) fue estimada para cada micrografía mediante el programa CTFIND3 (Mindell y Grigorieff, 2003). A continuación se seleccionaron manualmente las partículas de las imágenes y se extrajeron y normalizaron mediante el paquete informático Xmipp (Sorzano et al., 2004) a una escala final de 2,8 Å/píxel. A continuación, las partículas se clasificaron y se alinearón bidimensionalmente, con el programa CL2D de Xmipp. Para la reconstrucción tridimensional, como mapa inicial se utilizó la densidad de la cola del mapa tridimensional del fago T7 (Agirrezabala et al., 2005). El refinamiento de los volúmenes se realizó mediante un proceso de refinamiento angular iterativo que fue llevado a cabo mediante el programa refine de EMAN (Lutke et al., 2009) aplicando una simetría rotacional de orden 6 (C6) alrededor del eje longitudinal de la molécula. Una vez el modelo tridimensional fue estable, se utilizó el programa Projection Matching de Xmipp para finalizar el refinamiento. Para estimar la resolución del mapa final obtenido se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (Saxton y Baumeister, 1982) entre dos mapas independientes que contenían cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en la reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es de 0,3 (criterio FSC = 0,3). Para visualizar los mapas 3D se empleó el programa UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

El protocolo para la reconstrucción tridimensional del dímero de la proteína gp16 fue similar, aunque con alguna modificación que se relata a continuación. Primero, la muestra fue preparada por tinción negativa, de acuerdo al protocolo de la sección 3.6.1 y las micrografías se adquirieron a 67000 aumentos en el microscopio Tecnai G² FEG 200 con la cámara CCD EAGLE 4X. Las imágenes se seleccionaron manualmente y se extrajeron, normalizaron y clasificaron bidimensionalmente con Xmipp, de manera análoga al anterior procesamiento, a una escala final de 4,22 Å/píxel. Para comenzar la reconstrucción se crearon 3 modelos iniciales diferentes a partir de bolas de ruido o esferoides con el programa makeinitialmodel.py del paquete EMAN. Los modelos se refinaron con EMAN cambiando los mismos parámetros en cada ciclo de reconstrucción y no empleando ninguna simetría (C1). Finalmente se eligió el modelo que mejor se ajustaba a las imágenes medias libres de referencia promediadas con el programa CL2D de Xmipp, en base a las proyecciones tridimensionales del modelo 3D y las imágenes medias asociadas a dichas proyecciones. El modelo final se refinó con Projection Matching de Xmipp y la resolución del mapa se determinó de la misma manera que con el modelo de la cola abierta de T7.

Para la selección y extracción de densidades de los modelos tridimensionales obtenidos (segmentación) se empleó el programa Segger de Chimera .

3.6.4 Reconstrucción tridimensional de los fagos T7 adsorbidos a envueltas bacterianas mediante tomografía electrónica.

Para la reconstrucción de fagos T7 asociados a envueltas bacterianas la muestra se incubó durante 3h a 37°C (partículas de T7 a 10^{11} pfu/ml con envueltas procedentes de 5 ml de cultivo de *E. coli* BL21 crecidos a $DO_{600} \approx 0,7$ purificadas de acuerdo con el protocolo de la sección 3.1.5 y resuspendidas en TMS hasta un volumen de 30 μ l). Al final de la incubación se añadió proteína A conjugada con oro 10 nm (BBInternational) como marcador para facilitar el alineamiento posterior de los tomogramas (en una dilución 1:10 y previamente lavada en TMS). Las rejillas se prepararon por vitrificación, de acuerdo con el protocolo de la sección 3.6.1 y los tomogramas se adquirieron en el microscopio Tecnai G² FEG 200 con la cámara CCD EAGLE 4X a una escala de 67000 aumentos y un desenfoque de aproximadamente 5 μ m. Para la adquisición de las series tomográficas se utilizó el programa FEI Xplore3D. Para la adquisición de tomogramas de fagos incubados con minicélulas (ver apartado 3.1.6) se procedió de forma similar. Se incubaron los fagos con las minicélulas durante 3h a 37°C (la cantidad necesaria de minicélulas para fagos T7 a 10^{11} pfu/ml se estimó de forma experimental) y antes de vitrificar la muestra se añadió proteína A conjugada con oro a una dilución 1:10. Los tomogramas se adquirieron en un microscopio JEOL JEM_2200FS, dotado de un filtro de energía Omega, del Centro de Investigación Biogune (Bilbao).

La reconstrucción de los tomogramas se realizó con el paquete informático IMOD (Kremer et al., 1996) , usando los programas eTomo y Midas.

Resultados

4.1 . Adsorción de T7 a la superficie bacteriana

4.1.1 Adsorción de T7 a envueltas bacterianas purificadas.

4.1.2 Componentes proteicos de la pared participan en la adsorción.

4.2 Eyección del genoma de T7 in vitro.

4.2.1 El fago T7 eyecta su genoma en presencia de los LPS de *E.coli* DH100.

4.2.2 Cinética de la eyección en presencia de LPS.

4.2.3 Los fagos se unen de manera irreversible a los LPS de cepas *rough* de *E.coli* mediante sus fibras.

4.3.Análisis mediante crío–microscopía electrónica de los cambios conformacionales que se producen en el fago T7 tras la eyección de su genoma.

4.3.1 Análisis mediante crío-tomografía electrónica de fagos adsorbidos a envueltas bacterianas.

4.3.2 Reconstrucción tridimensional de la cola en su conformación abierta mediante crío-microscopía electrónica.

4.3.3 Cambios conformacionales en el complejo de la cola tras la eyección del genoma.

4.4. Estudio de las proteínas solubles del núcleo proteico, implicadas en la translocación del genoma viral.

4.4.1 El complejo del núcleo se desensambla tras ser eyectado a través de la cola.

4.4.2 Análisis bioinformático de gp15 y gp16.

4.4.3.Purificación y expresión de las proteínas solubles del núcleo gp15 y gp16

4.4.4.Detección de la actividad transglicosilasa de la proteína gp16 recombinante.

4.4.5 Caracterización estructural de la proteína gp16 mediante ME.

4.4.6 Las proteínas recombinantes gp15 y gp16 interaccionan *in vitro*.

4.1. Adsorción de T7 a la superficie bacteriana

4.1.1 Adsorción de T7 a envueltas bacterianas.

La infección del fago T7 comienza con la adsorción reversible de los viriones a la superficie bacteriana, seguida de la adsorción irreversible cuando el fago reconoce a su receptor. La adsorción irreversible implica la eyección y translocación del genoma, proceso en el que participa la ARN polimerasa bacteriana y requiere además del potencial de la membrana plasmática (Zimkus et al. 1986; Molineux 2001). Con el fin de caracterizar el inicio de la infección de T7, se estudió la interacción de las partículas virales con envueltas bacterianas libres de componentes citoplasmáticos. Con ello se pretendía aislar complejos estables de adsorción así como identificar posibles estados intermedios en la infección.

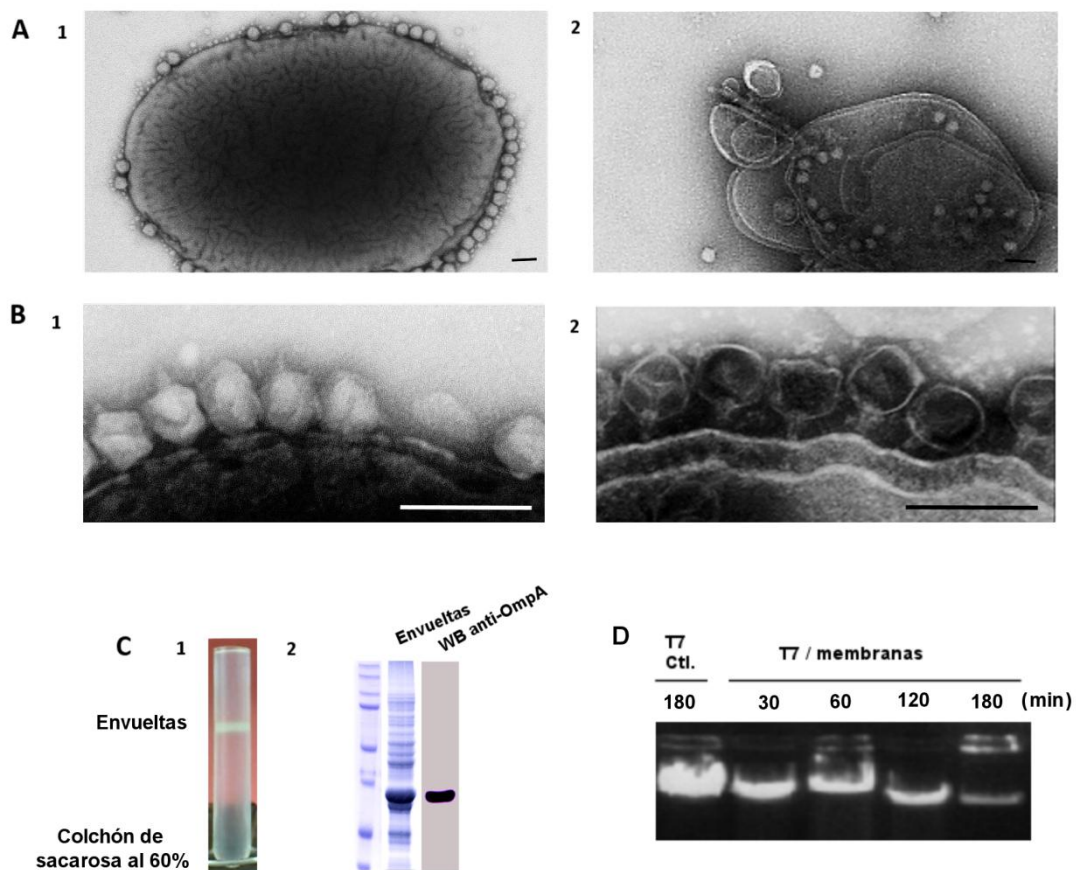


Figura 4.1 Adsorción del fago T7 a la envuelta bacteriana de *E. coli* BL21. A) Micrografías mostrando viriones de T7 adsorbidos a *E. coli* BL21 (A.1) y a las envueltas purificadas de *E. coli* (A.2). B) Micrografías electrónicas mostrando fagos adsorbidos de forma reversible (B.1) e irreversible (B.2) a envueltas purificadas de *E. coli*. C.1) Imagen de un tubo de SW41 con la banda de envueltas purificadas a partir de la rotura mecánica de las bacterias y fraccionamiento posterior mediante un colchón de sacarosa. C.2) Perfil electroforético de la fracción de envueltas purificada y western blot de las proteínas de la envuelta con anticuerpos anti-OmpA, una de las proteínas más abundantes de la membrana externa. D) Ensayo de protección de ADN frente a la digestión por DNasa para medir el tiempo de eyección de los fagos incubados en presencia de las envueltas de *E. coli*. Las muestras de las micrografías presentadas fueron teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% (p/v) y las barras se corresponden con 100nm.

Las envueltas de *E. coli* BL21 se aislaron mediante disrupción mecánica de las bacterias y purificación de las membranas en un colchón de sacarosa al 60 % (p/v) (Fig. 4. 1). Dichas membranas se incubaron con viriones de T7 a 37° C durante diferentes tiempos y se tomaron alícuotas para su análisis por microscopía electrónica (ver apartado 3.1.5 de métodos). La observación de las micrografías reveló que las partículas de T7 eran capaces de absorberse a las membranas purificadas (Fig. 4. 1.A.2). La eyección del genoma se hizo notable a partir de los 60 minutos de incubación. Así mismo, el análisis por microscopía electrónica mostró dos tipos de interacciones. Primero, los fagos contactan con las membranas sin una orientación definida, lo que puede explicarse porque las fibras se disponen alrededor de la cabeza en las partículas infectivas (Fig 4.1.B.1). Por contra, los fagos que han eyectado su genoma presentan una orientación definida. Se disponen perpendiculares a las superficies membranosas, con las que contactan a través de la cola. Además, la cola no atraviesa la envuelta y el complejo del core ya no se localiza en el interior de la cabeza(Fig 4.1.B.2).

En la figura 4.1.D se muestra una estimación del tiempo necesario para que la población de partículas virales eyecten su genoma en presencia de estas membranas. Para ello se incubaron a los fagos con las membranas a diferentes tiempos y se digirió el ADN liberado con DNasa I. Tras inactivar la enzima, se analizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio el ADN que no había sido eyectado, protegido en el interior de la cabeza (Fig. 4.1.D; ver métodos apartado 3.4.4). Como se aprecia en la imagen, se requieren tiempos de incubación de 180 minutos para poder observar una disminución importante de la cantidad de ADN protegido en la población de fagos, un resultado que concuerda con las observaciones mediante microscopía electrónica.

Con objeto de aislar fagos asociados a las envueltas, las membranas se incubaron durante 180 min a 37°C con partículas virales de T7 (aproximadamente $5 \cdot 10^{12}$ pfu para membranas procedentes de 750 ml de cultivo crecidos a $DO_{600} \approx 0,7$; ver apartado 3.4.1 de métodos). La muestra se cargó en un gradiente isopícnico de cloruro de cesio al 22% (p/p). Del gradiente se aislaron dos bandas (Fig.4.2.1 y 4.2.2), correspondientes a dos tamaños de vesículas membranosas con fagos vacíos asociados.

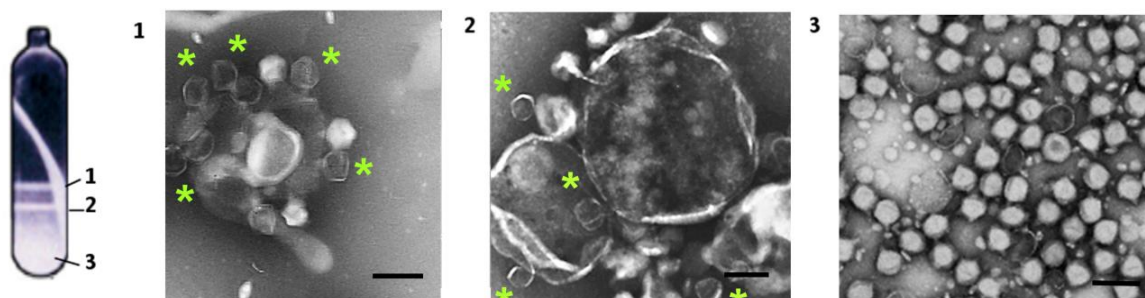


Figura 4.2 Gradiente isopícnico al 22% (p/v) de las envueltas incubadas junto con las partículas virales. Se muestran las micrografías electrónicas de las diferentes fracciones aisladas en el gradiente: las vesículas de pequeño tamaño con virus vacíos asociados migraron a la mitad del tubo (1); las membranas de mayor tamaño con fagos asociados migraron formando una banda localizada más abajo del tubo (2) y los virus llenos que no interaccionaron con las membranas migraron hasta el fondo del tubo (3). Los fagos vacíos asociados a las membranas están señalados con un asterisco verde. Las barras corresponden a 100nm.

Los fagos no unidos migraron hasta el fondo del tubo (Fig.4.2.3), pues las partículas virales presentan una densidad ($1,5 \text{ g/ cm}^3$) superior a la de las membranas ($1,2 \text{ g/ cm}^3$).

La observación de las fracciones aisladas en el gradiente isopícnico (Fig 4.2.1 y 4.2.2) permite afirmar que los fagos son capaces de adsorberse de manera estable e irreversible a las envueltas purificadas y eyectar su genoma y por tanto dichas membranas contienen el receptor bacteriano de T7. Además, no se detectaron fagos que eyectasen parcialmente su genoma, por lo que se sugiere que una vez se desencadena el mecanismo de eyección, es un proceso irreversible que, en ausencia de presión citoplasmática, no requiere la participación de la maquinaria bacteriana para completarse.

4.1.2 Componentes proteicos de la membrana externa de *E. coli* BL21 participan en la adsorción.

En el apartado anterior se vio que las envueltas purificadas de *E. coli* BL21 contienen el receptor bacteriano de T7. Para determinar si dicho receptor era de naturaleza proteica, se realizó un ensayo de interacción entre los viriones de T7 y las proteínas procedentes de las envueltas. La técnica empleada para dicho análisis se conoce como “Virus Overlay Protein Binding Assay” (VOPBA) y consiste en una modificación del Western Blot, donde las proteínas de membrana son electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas primero en presencia de las partículas virales y después en presencia de anticuerpos que reconocen a las partículas virales (Fig.4.3.A; sección 3.3.3 de métodos). Para llevar a cabo el análisis VOPBA, se produjeron anticuerpos policlonales contra la cápsida de T7, constituida por la proteína gp10 (ver métodos, apartado 3.1.7). El experimento se llevó a cabo en dos pasos consecutivos.

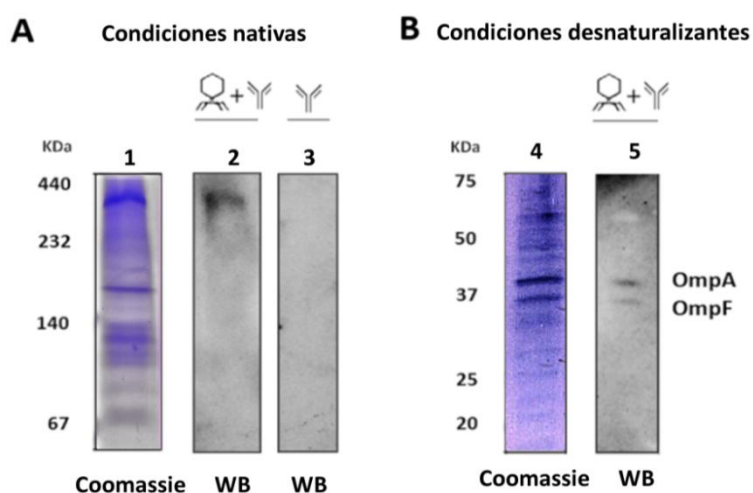


Figura 4.3: Análisis VOPBA del fago T7 frente a las proteínas de la envuelta de *E. coli*. A) Se muestra el gel nativo teñido con azul de Coomassie de las proteínas de la envuelta de *E. coli* (carril 1) y el resultado del análisis VOPBA tras incubar las proteínas electrotransferidas en presencia (carril 2) o ausencia (carril 3) de los viriones T7. B) Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de la banda reactiva detectada en el paso anterior (carril 4) y análisis VOPBA en condiciones desnaturalizantes de las proteínas aisladas en el gel e incubadas en presencia de los viriones T7 (carril 5).

Primero en condiciones nativas, para facilitar el reconocimiento de las proteínas, donde se identificó una banda proteica que interaccionó con las partículas virales. Posteriormente, la banda reactiva se analizó en condiciones desnaturalizantes para separar las proteínas que contenía e identificar cuál era la responsable de dicha interacción (Fig.4.3.B). Como resultado del análisis en la segunda dimensión, se observaron dos bandas proteicas que interaccionaban específicamente a las partículas de T7. El análisis por espectrometría de masas identificó que dichas bandas correspondían a las proteínas de membrana externa OmpA (37,2 KDa) y OmpF (39,3 KDa) (Fig. 4.3.B).

Para poder interpretar el papel de estas porinas se estudió la infección de T7 en la cepa mutante deficiente en porinas *E. coli* BL21 (DE3) Δ OmpA Δ OmpF Δ OmpC construida por Prilipov y colaboradores (Prilipov et al., 1998). Como control se estudió la infección en *E. coli* BL21 (DE3). Primero se analizó la morfología de las placas de lisis de T7 en ambas cepas. En el caso del mutante deficiente en porinas, las placas eran de menor tamaño y estaban rodeadas de un halo opaco en comparación con las placas de la cepa control. El tamaño de las placas depende de la eficiencia de adsorción, de la duración del periodo de latencia y de la amplificación de la progenie viral en cada cepa bacteriana. El halo opaco que rodea a la placa indica un área donde no se produce la lisis completa de las bacterias (Fig. 4.4.A).

Las diferencias en la morfología de las placas de lisis de T7 impulsaron un estudio más exhaustivo de la infección de T7 en estas cepas. Se estudiaron las curvas de crecimiento de T7 en el triple mutante y en la cepa control (ver figura 1.2 de introducción). Como se observa en la figura 4.4.B, los fagos que infectan el mutante deficiente en porinas tardan más tiempo en internalizar su genoma que los fagos que infectan la cepa *E. coli* BL21 silvestre. Además, la amplificación de la progenie viral es un orden de magnitud mayor cuando los fagos infectan a *E. coli* BL21 silvestre que cuando infectan al triple mutante. La eficiencia de adsorción fue calculada de acuerdo con el método de Lin (Lin et al., 2012) a partir de la siguiente expresión:

$$[1 - (\text{mínimo título viral (pfu)} / \text{Título viral inicial (pfu)})] \times 100\%$$

Así, para una multiplicidad de infección de 3 en ambos casos, se obtuvo una eficiencia de adsorción del 38 % en el caso de los fagos que infectaron a *E. coli* BL21(DE3) y del 24 % para los fagos que infectaron al mutante deficiente en porinas (Fig. 4.4.B).

De manera complementaria se realizó un análisis de la adsorción de T7 mediante microscopía electrónica (Fig. 4.4.C). Para ello se infectaron ambas cepas bacterianas con viriones de T7 (a una m.o.i. de 100) y se tomó una alícuota de cada muestra tras 7,5 minutos de incubación. Nuevamente se observó que los fagos T7 se adsorbían en mayor proporción a bacterias de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) que a bacterias de la cepa mutante e incluso algunos viriones ya habían eyectado su genoma en el caso de *E. coli* BL21 (DE3) (Fig. 4.4.C).

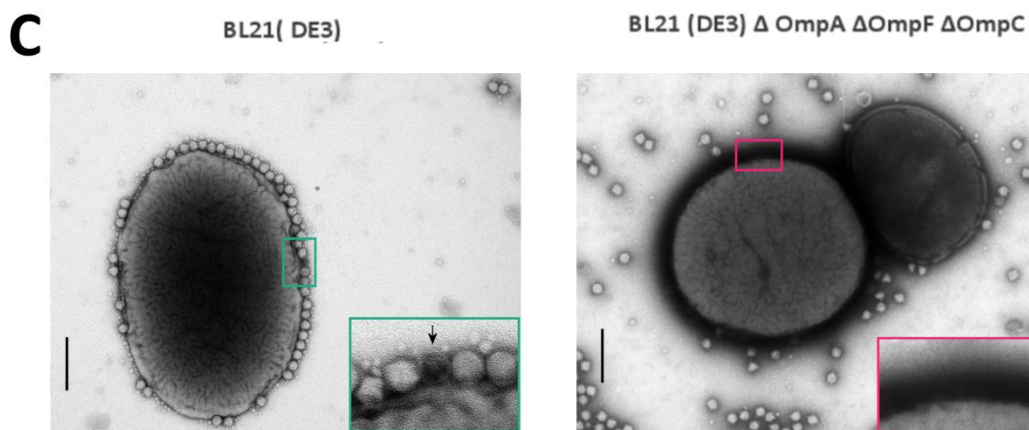
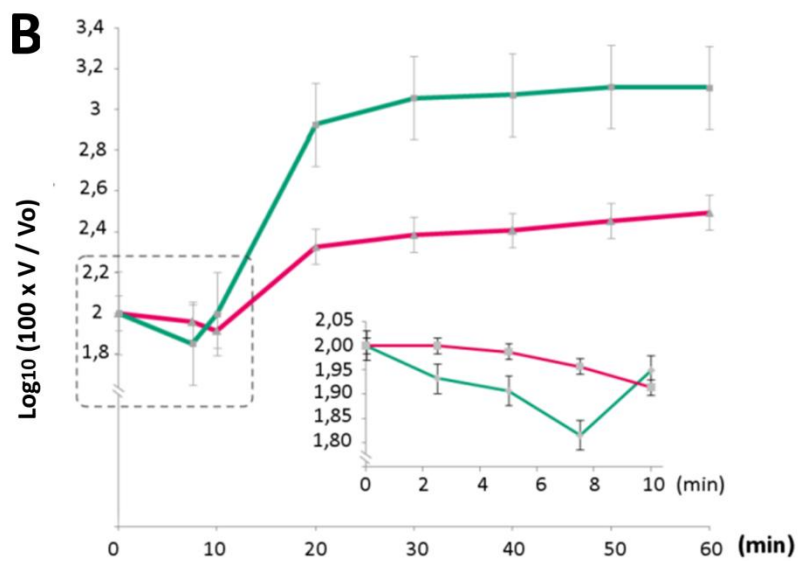
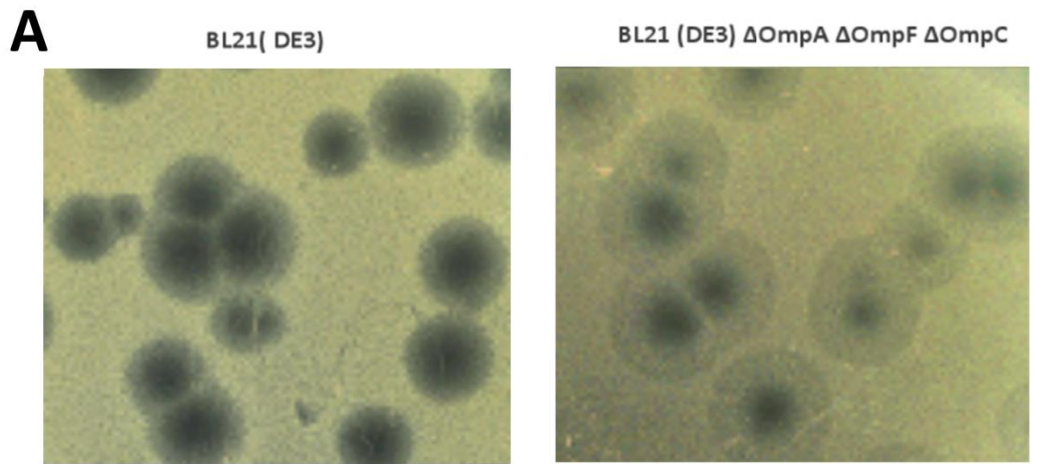


Figura 4.4. Las ausencia de porinas en el mutante *E. coli* BL21 (DE3) Δ OmpA Δ OmpF Δ OmpC implica una disminución en la adsorción de T7 respecto de la cepa *E. coli* BL21 (DE3). **A)** Morfología de las placas de lisis del fago T7 en *E. coli* BL21 (DE3) (izquierda) y en *E. coli* BL21 (DE3) Δ OmpA Δ OmpF Δ OmpC (derecha). **B)** Ciclo infectivo de T7 en *E. coli* BL21(DE3) (verde) y en la cepa derivada deficiente en las porinas OmpA, OmpF y OmpC (rojo). Se muestra una ampliación de las curvas para los primeros 10 minutos. En ambos casos se infectó a una m.o.i. de 3. **C)** Micrografías teñidas con PTA al 2% (p/v) de fagos T7 incubados con *E. coli* BL21 (DE3) (izquierda) y *E. coli* BL21 (DE3) Δ OmpA Δ OmpF Δ OmpC (derecha). En ambos casos el tiempo de incubación fue de 7,5 minutos. Las barras se corresponden con 200 nm.

4.2 Eyección del genoma *in vitro*.

4.2.1 El fago T7 eyecta su genoma en presencia de los LPS de *E. coli* DH100.

En la búsqueda del receptor de T7, se decidió determinar el papel de los lipopolisacáridos en la infección. Se sabe que T7 sólo infecta cepas *rough* de *E. coli* y *Shigella* (Lindberg, 1973; ver apartado 1.3.2.1 de introducción), por lo que se decidió realizar un ensayo de adsorción de los fagos T7 a LPS de tipo *rough* de la cepa *E. coli* EH100. En dicho análisis se incubaron los virus y los LPS en la misma proporción que en experimentos previamente realizados con el fago P22 (Andres et al., 2012). De la reacción de incubación se extrajeron alícuotas a diferentes tiempos que después se titularon mediante plaqueo en agar. En la figura 4.6 se muestra una representación de la caída del título viral con el incremento del tiempo de incubación. Tras 60 minutos el título viral se redujo a la mitad y tras 180 minutos la reducción fue casi completa. Por contra, no se detectó caída del título en los fagos que fueron incubados únicamente en presencia del tampón del virus. El ensayo de inactivación de los viriones no revela por sí mismo si los LPS bloquean los dominios de unión al receptor de T7, si inducen la eyección del genoma o si son responsables de ambos casos. Por ello, se llevó a cabo un ensayo de protección de ADN con DNasa I para detectar de forma indirecta si los LPS desencadenaban la eyección del genoma de T7 *in vitro*. En dicho ensayo se observó una disminución de la cantidad de ADN protegido en el interior de la cabeza viral conforme incrementaba el tiempo de incubación de los fagos en presencia de los LPS, ya que el ADN eyectado se volvía susceptible al ataque de la nucleasa. En la figura 4.6.A se muestra un gel de agarosa del ensayo de protección que se realizó por triplicado y en la figura 4.6.B el análisis densitométrico promediado de los 3 gels de agarosa. Tras 180 minutos se observó que apenas quedaba ADN en el interior de las cápsidas virales, indicando que los LPS de *E. coli* EH100 desencadenan la eyección del fago T7 *in vitro*.

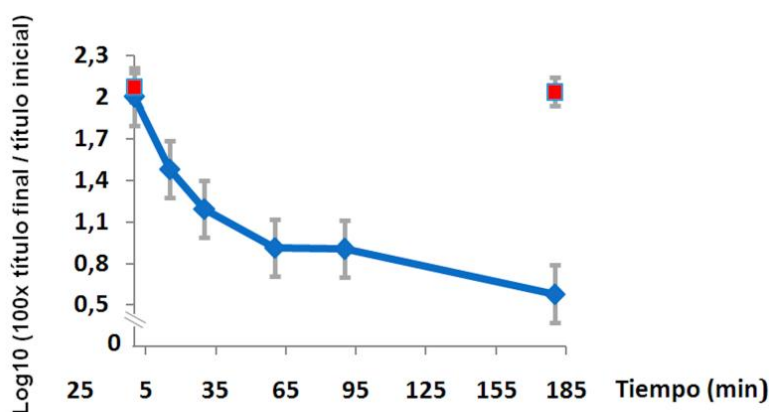


Figura 4.5: Inactivación de los viriones de T7 en presencia de los LPS de *E. coli* DH100. En azul se muestra la caída del título viral a medida que incrementa el tiempo de incubación de los viriones de T7 en presencia de los LPS (10^{11} pfu/ml fagos para LPS a 25nM). En cuadros rojos el control de los fagos incubados únicamente en el tampón de T7.

Además, como se aprecia en el gel de agarosa, la eyección del genoma ocurre en un solo paso, ya que no se detectan genomas eyectados de menor tamaño, indicando que una vez comienza la eyección, la partícula viral se vacía completamente (Fig.4.6.A).

Por último, se utilizó la microscopía electrónica como técnica analítica para confirmar que los LPS de cepas *E. coli rough* constituían el receptor del fago T7 *in vitro*. Como se muestra en la figura 4.6.B, los fagos incubados con LPS *rough* interaccionaban con dichos LPS a través del complejo de la cola y la mayoría de las partículas presentan la cabeza vacía, indicando que los fagos habían eyectado su ADN (Fig 4.6.B.1). Como control se analizó la interacción de las partículas de T7 en presencia de LPS de cepas *smooth* (Fig 4.6.B.2). En este caso, todas las partículas virales contenían el ADN en el interior de la cabeza y no se detectó en ningún caso interacción con los LPS sin antígeno O. Esto confirma que en el fago T7 los dominios de reconocimiento de los LPS de cepas *rough* se localizan en el complejo proteico de la cola. Dicho reconocimiento es por tanto un proceso altamente específico y determina en última instancia el rango de hospedadores del fago T7.

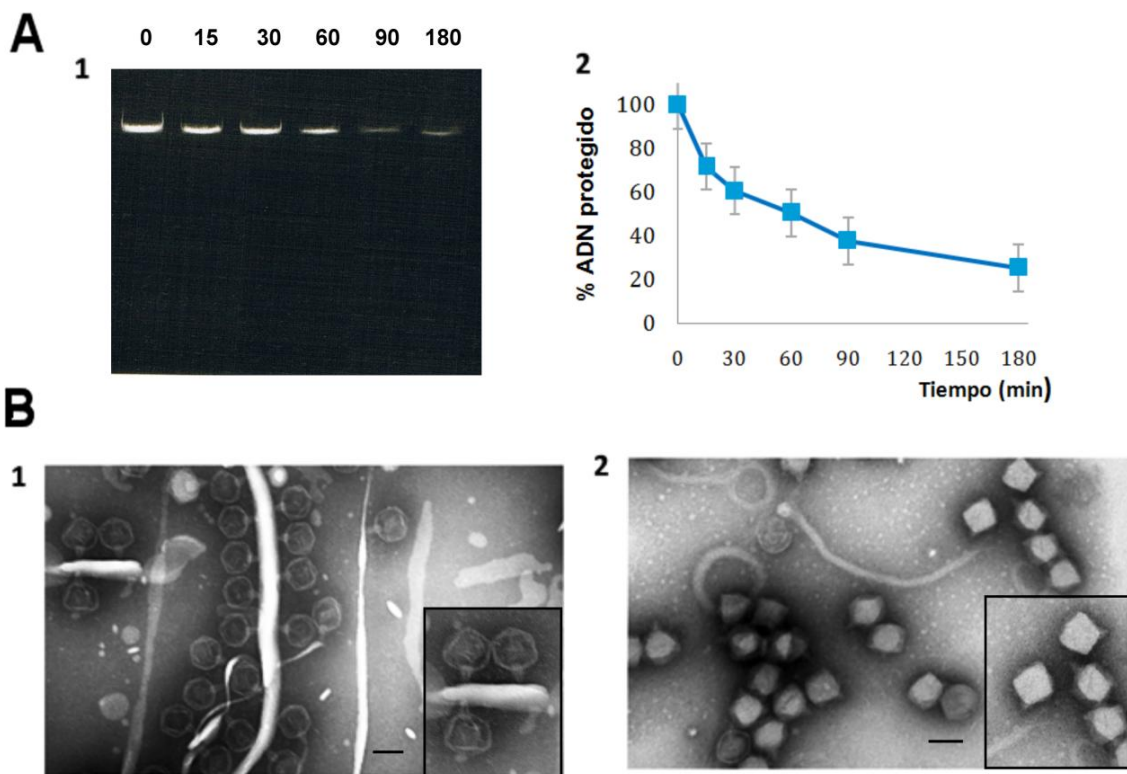


Figura 4.6: Eyección del genoma de T7 en presencia de los LPS de *E.coli* DH100. **A)** Ensayo de protección de ADN frente a la digestión por la DNasa I. Se muestra el gel de agarosa al 0,8% tenido con BrEt en el que se aprecia la disminución de la cantidad de ADN protegido con el incremento del tiempo de incubación (A.1) y el análisis densitométrico promediado de los geles de agarosa.(A.2). **B.1)** Micrografía de fagos T7 incubados con LPS de *E.coli* EH100 durante 3 h (10^{11} pfu/ml de virus para 25 nM de LPS) y teñidos con PTA al 2%. **B.2)** Micrografía mostrando fagos T7 incubados con LPS de *E.coli* 0111:B4 en las mismas condiciones. Las barras indican 50 nm y el los recuadros negros se muestra un aumento de las imágenes para la mejor visualización de las partículas virales.

4.2.2 Cinética de la eyección en presencia de LPS .

Para poder detectar la cinética de la eyección a tiempo real, desde el inicio de la incubación de los fagos T7 con los LPS de *E. coli* EH100, se realizaron ensayos de fluorescencia. Para la detección del ADN eyectado se eligió el fluoróforo Yo-Yo porque no penetra en el interior de la cabeza de las partículas infectivas y se une rápidamente al ADN libre eyectado, aumentando la emisión de fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de ADN libre eyectado (Fig.4.7.A).

Podemos simplificar la reacción de eyección *in vitro* del fago T7 en presencia de los LPS *rough* de *E. coli* como dos reacciones de primer orden consecutivas (Andres et al., 2012; ecuación 1). La primera ecuación describe la cinética del reconocimiento del dominio receptor de los LPS por las colas de los fagos T7 y la formación del complejo *fago-LPS*, definida por la constante K' . En la segunda ecuación se mide la velocidad de apertura del canal de la cola y la eyección del genoma, definida por la constante K_{apertura} .



Ecuación 1

Cuando el receptor se halla en concentraciones no saturantes, podemos calcular el incremento de adsorbancia detectada en el tiempo de acuerdo con la ecuación propuesta por Andres y colaboradores (Andres et al., 2012), donde A_0 hace referencia a la fluorescencia emitida inicial:

$$\text{ADN}(t) = A_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{(K_{\text{apertura}} - K')} \cdot \left(K_{\text{apertura}} \cdot e^{(-K' \cdot t)} - K' \cdot e^{(-K_{\text{apertura}} \cdot t)} \right) \right)$$

Ecuación 2

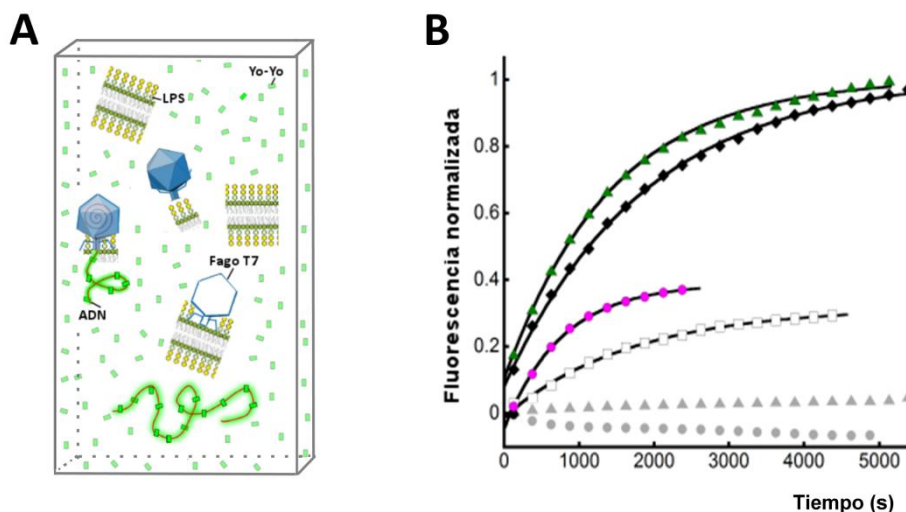


Figura 4.7: Estudio cinético de la eyección de T7 en presencia de LPS de *E. coli*. **A)** Esquema del ensayo fluorimétrico donde el fluoróforo Yo-Yo (en verde) se une al ADN eyectado y aumenta la emisión de fluorescencia. **B)** Análisis fluorimétrico de la cinética de eyección a diferentes concentraciones de receptor: 1 nM (cuadros blancos), 2 nM (círculos rosas), 5 nM (rombos negros) y 25 nM (triángulos verdes). En gris los controles de eyección en ausencia de LPS (triángulo) y en presencia de los LPS de *E. coli* O111:B4 (círculo). Se han representado 1 de cada 30 puntos y el ajuste de cada curvas a la ecuación 1 está definido por una línea continua en negro.

Como se ve en la figura 4.7.B, a medida que aumenta la concentración de LPS la velocidad de la reacción de eyección aumenta, lo que se corresponde con una mayor pendiente en el primer tramo de la curva. Como control negativo, se detectó la fluorescencia emitida de fagos T7 incubados con LPS de *E. coli* O111:B4, así como de los fagos sin LPS durante 5000 segundos. En ambos casos no se detectó un incremento en la absorbancia indicando que los fagos no eyectan su genoma espontáneamente ni interaccionan con los LPS de *E. coli* O111:B4.

Cuando los LPS se hallan en concentraciones saturantes (LPS a 5 nM para 10^9 pfu/ml) la concentración de receptor ya no influye en la velocidad de la eyección y la apertura del canal de la cola se convierte en el paso limitante de la reacción, que entonces puede ser definida monoexponencialmente. Así pues, se calcula que la constante de apertura de T7 a concentraciones saturantes de receptor es de $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, un valor semejante al del fago P22 ($4,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), que es también un podovirus que emplea los LPS de *Salmonella typhimurium* como receptor (Andres et al., 2012).

4.2.3 Los fagos T7 se unen de manera irreversible a los LPS de cepas rough de *E. coli* mediante sus fibras.

Como se menciona en la introducción, los dominios de reconocimiento del receptor bacteriano se localizan normalmente en las fibras o espículas (apartado 1.2.2.1 de introducción). En el caso del fago T7, Molineux propuso que el fago T7 se adsorbía de manera reversible a los LPS de *E. coli* a través de sus fibras (Molineux, 2001) y recientemente sugirió que la adsorción irreversible venía mediada por el extremo terminal de la cola y no por las fibras (Casjens y Molineux, 2012).

Para determinar cuál era la región de la cola de T7 implicada en interaccionar específicamente con los LPS, se realizaron ensayos de adsorción con colas de T7 dotadas de fibras, así como con colas carentes de ellas. Como se aprecia en la figura 4.8, las colas completas se unen a los LPS a través de las fibras, provocando la formación de agregados de LPS (Fig 4.8.A.1, colas marcadas por flechas azules (vistas frontales) y naranjas (vistas laterales)). Por el contrario, las colas sin fibras no se unían a los LPS ni formaban agregados, lo que indica que los dominios de reconocimiento y unión a los LPS se localizan en las fibras (Fig 4.8.A.2, colas marcadas por círculos amarillos). Además, si comparamos los viriones de T7 antes y después de incubarse con los LPS de *E. coli* EH100 (Fig 4.8.B), vemos como las fibras cambian de orientación. En las partículas infectivas se disponen hacia arriba (Fig 4.8.B.1) mientras que en las partículas que se adsorben a los LPS se disponen hacia abajo (Fig.

4.8.B.2) y permanecen en contacto con los LPS tras la eyección del genoma, indicando que dicha unión es irreversible (Fig 4.8.B.3).

Para poder resolver a escala subnanométrica los cambios estructurales que se producen en el complejo de la cola tras la eyección, se realizó un análisis estructural mediante crío-microscopía electrónica (apartado 4.3.2 y 4.3.3 de resultados). Es importante señalar que el complejo proteico del núcleo no se observa en las partículas que han eyectado su genoma en presencia de los LPS de *E. coli* EH100, luego se confirma que la interacción de las colas con estos LPS desencadena completamente el mecanismo de eyección.

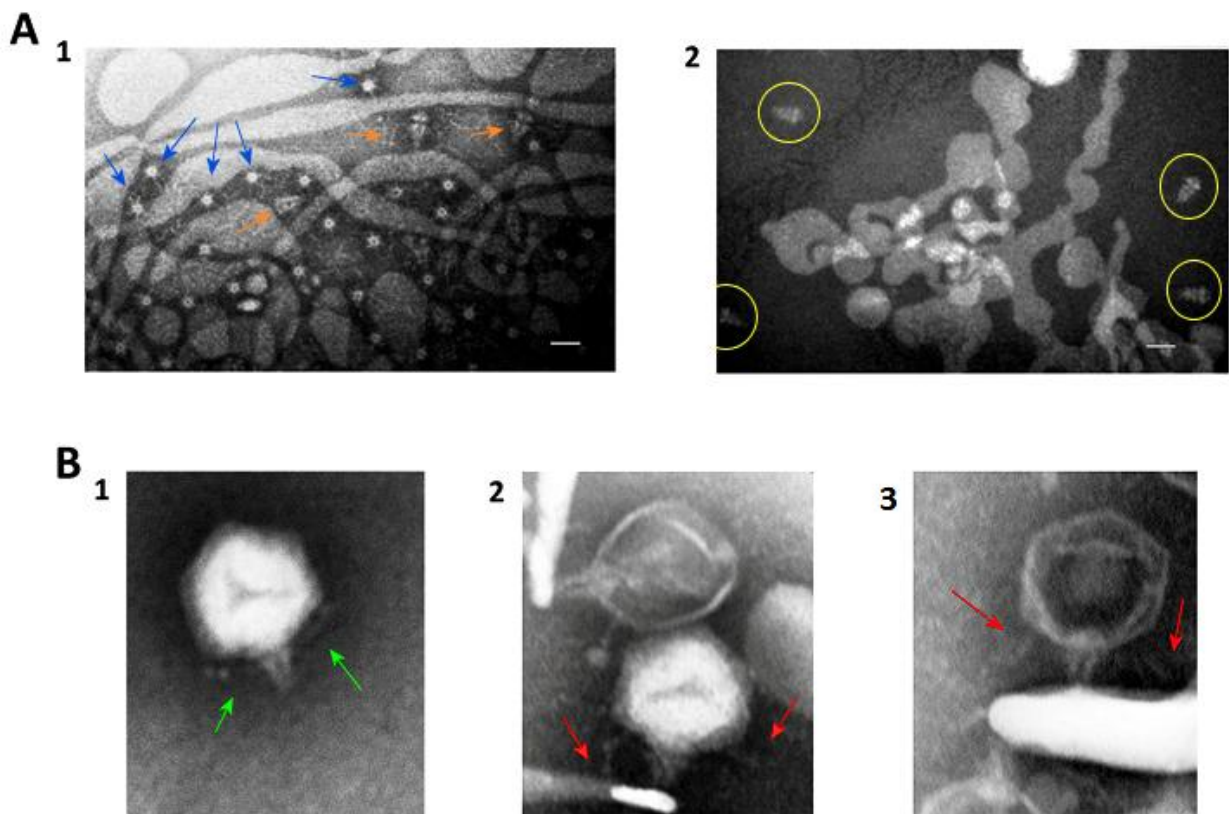


Figura 4.8: Los fagos T7 interaccionan con los LPS de cepas rough de *E.coli* mediante sus fibras. A.1) Micrografía de un agregado de colas de T7 unidas a los LPS de *E.coli* EH100 a través de las fibras. Mediante flechas azules se indican vistas frontales de las colas asociadas a los LPS y mediante flechas naranjas las vistas laterales. **A.2)** Micrografía de colas sin fibras incubadas en presencia de LPS de *E. coli* EH100. Las colas aparecen señaladas por círculos amarillos. Tanto en A.1 como en A.2 las barras equivalen a 25 nm. **B.1)** Micrografía de una partícula de T7 infectiva con las fibras orientadas hacia la cabeza (señaladas mediante flechas verdes). **B.2)** Micrografía electrónica ilustrando el cambio en la orientación de las fibras de las partículas de T7 tras interaccionar con los LPS (fibras señaladas con flechas rojas). **B.3)** Micrografía de una partícula viral que ha eyectado su genoma al interaccionar con los LPS de *E.coli* EH100 y que continúa unida a los LPS (las fibras se indican con flechas rojas). Todas las muestras fueron tenidas negativamente con PTA al 2% (p/v).

4.3: Análisis mediante crío-ME de los cambios conformacionales que se producen en el fago T7 tras la eyección de su genoma.

4.3.1 Análisis mediante crío-tomografía electrónica de fagos adsorbidos a envueltas bacterianas.

Las envueltas bacterianas purificadas de *E. coli* BL21 (ver apartado 3.1.5 de métodos) presentaban las dimensiones adecuadas para su análisis por crío-tomografía electrónica sin necesidad de seccionar la muestra (de 0,5 a 1 μm). Por tanto se decidió llevar a cabo el análisis tomográfico de los fagos T7 adsorbidos a dichas envueltas, lo que permitiría caracterizar los cambios estructurales que se producen en los viriones al inicio de la infección (ver apartado 1.4 de introducción). Se adquirieron un total de 30 tomogramas en un microscopio Tecnai G2 FEG 200 y se procedió a la reconstrucción tridimensional utilizando el paquete informático IMOD.

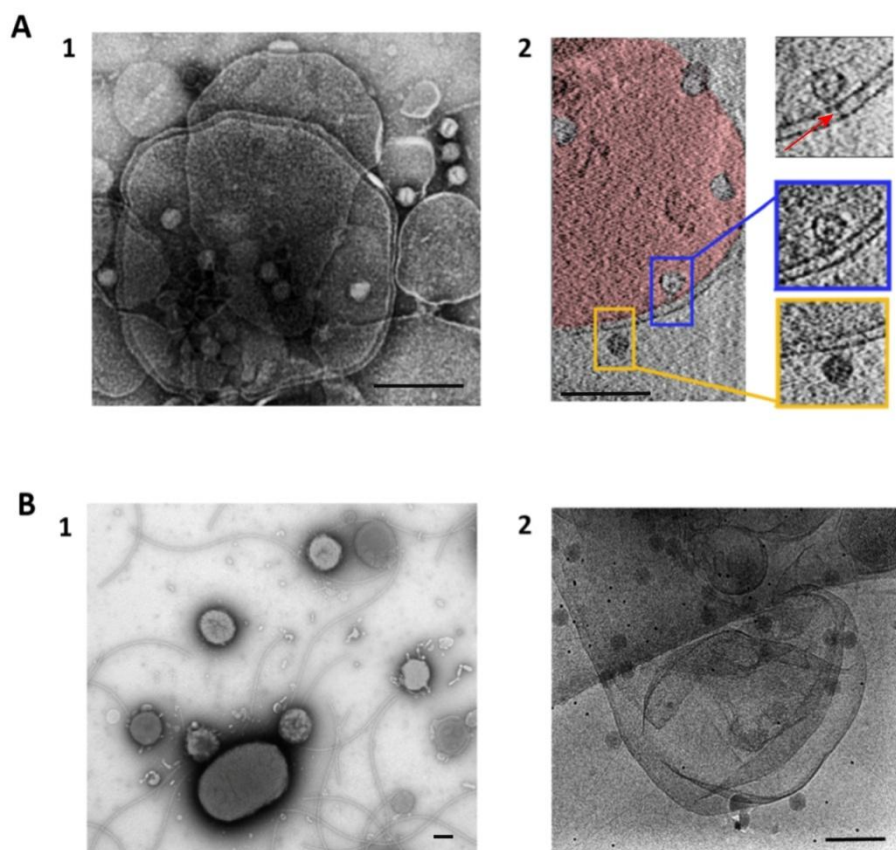


Figura 4.9: Análisis mediante crío-tomografía electrónica de fagos adsorbidos a envueltas bacterianas. A.1) Micrografía electrónica de fagos adsorbidos a las envueltas purificadas teñida con PTA al 2% (p/v). **A.2)** Sección de un tomograma de dicha muestra donde se aprecian fagos adsorbidos antes (amarillo) y después de eyectar su genoma (azul), así como una conexión entre la membrana interna y externa en el punto de adsorción de la partícula viral (flecha roja). **B.1)** Micrografía electrónica de minicélulas producidas por la cepa *E. coli* MG1655 teñida con PTA al 2% (p/v). **B.2)** Micrografía de fagos T7 adsorbidos a las minicélulas por criomicroscopía, utilizando un microscopio con filtro de energía. Las barras representan 200 nm en todos los casos.

En la figura 4.9.A.1 se muestra la imagen de tinción negativa de los virus adsorbidos a las envueltas y en 4.9.A.2 una sección de un tomograma donde se aprecia la adsorción de virus llenos (recuadro naranja) y vacíos (recuadro azul), así como conexiones entre la doble membrana de la envuelta y los virus adsorbidos (flecha roja).

Por otra parte, se decidió realizar el estudio estructural de fagos adsorbidos a minicélulas producidas por la cepa de *E. coli* MG1655, que se divide asimétricamente dando lugar a minicélulas (de unos 0,5 μm) sin cromosoma bacteriano pero con el contenido citoplasmático (Fig 4.9.B). Las minicélulas presentaban mayor proporción de virus adsorbidos que las envueltas purificadas pero al presentar material citoplasmático eran mucho más densas, por lo que se decidió adquirir los tomogramas en un microscopio JEOL JEM_2200FS, dotado de un filtro de energía Omega, que permite aumentar el contraste de la imagen al eliminar la señal que corresponde a la dispersión inelástica.

En ambos proyectos, la cantidad de virus adsorbidos era baja, lo que exigía la adquisición de un elevado número de tomogramas para poder hacer el promediado de los subvolumenes y poder obtener el modelo tridimensional de los fagos adsorbidos, lo que hizo que ambos análisis no fueran productivos. Paralelamente Bo Hu y colaboradores presentaron en 2013 las estructuras de fagos T7 adsorbidos a minicélulas antes y después de eyectar su genoma, obtenidas mediante tomografía electrónica con un microscopio FEI Polara 300 (Hu et al., 2013). Todo ello condujo a la cancelación de los análisis por tomografía. No obstante, la baja resolución de los modelos presentados por Hu (40 Å) no permiten discernir los cambios en el canal de la cola ni, en general, otros posibles cambios conformacionales en el complejo de la cola. Por ello, se decidió reconstruir la estructura de la conformación abierta de la cola mediante el análisis de partículas individuales por crio-microscopía electrónica.

4.3.2 Reconstrucción tridimensional de la cola en su conformación abierta mediante crío-microscopía electrónica.

Como se dijo en la introducción, la cola es el aparato especializado en la internalización del genoma durante la infección (apartado 1.2.2 de introducción). Para determinar los cambios conformacionales que tienen lugar en dicho complejo tras la eyección del genoma, se llevó a cabo un estudio de los viriones incubados en presencia de LPS mediante crío-microscopía electrónica y análisis de partículas individuales. Para ello se seleccionaron y extrajeron un total de 4256 partículas de las micrografías adquiridas con un microscopio FEI Tecnai G2 F20 (ver métodos, apartado 3.6.2). En la figura 4.10 se muestra el diagrama de flujo del procesamiento.

En una primera etapa (pre-procesamiento) las partículas fueron alineadas y clasificadas utilizando exclusivamente la información de las imágenes y sin emplear referencia previa, de acuerdo con el protocolo CL2D implementado en el paquete de Xmipp (Sorzano et al., 2010). Así se obtuvieron medias bidimensionales de grupos de partículas homogéneas. En algunas medias no se visualizaba correctamente el complejo de la cola debido a que los LPS y la cápsida viral presentan mayor densidad y por tanto, tenían un contraste superior a la cola.

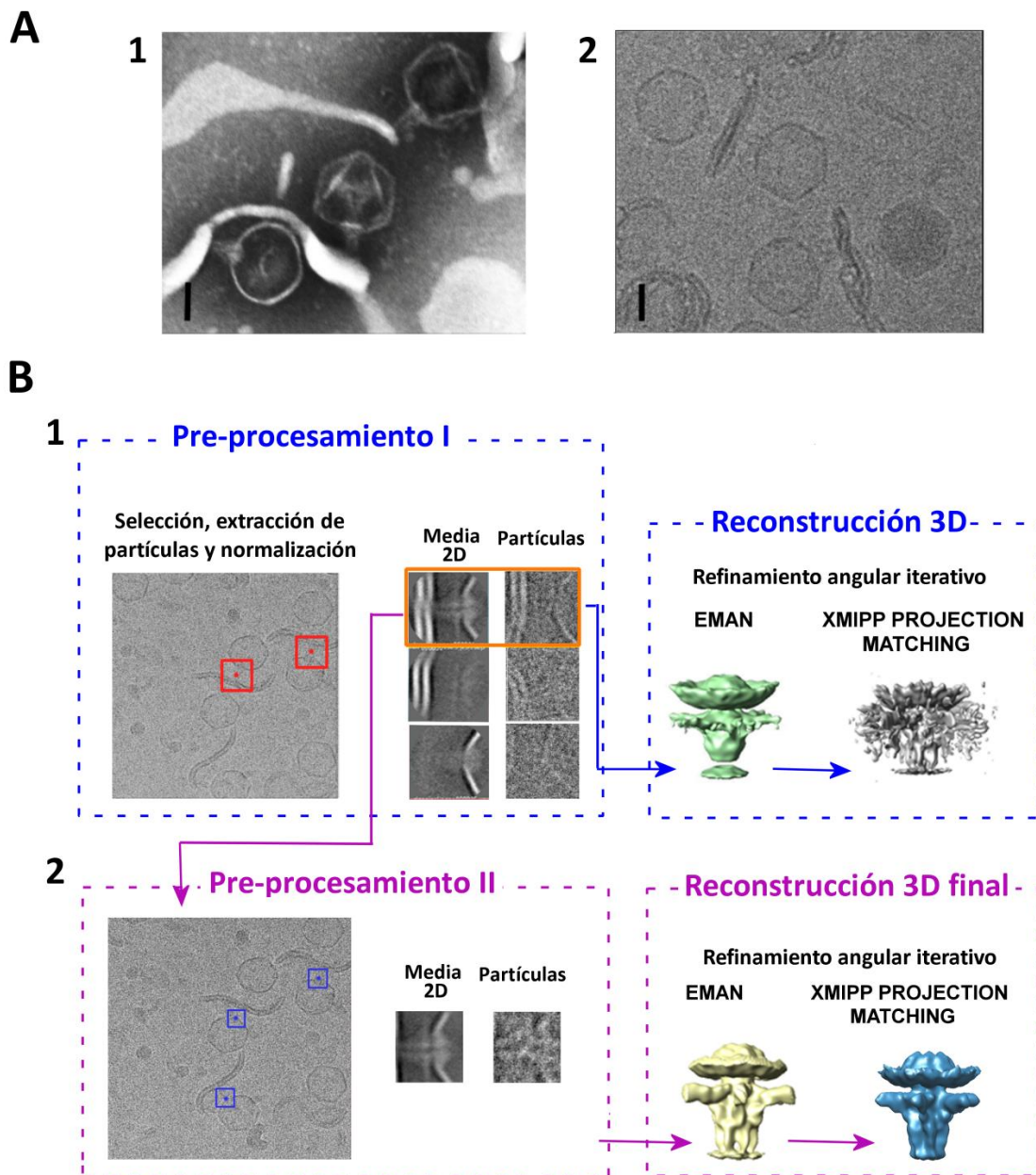


Figura 4.10: Procesamiento de partículas individuales de fagos T7 adsorbidos a LPS de *E. coli* EH100. **A)** Micrografías electrónicas de fagos adsorbidos a LPS obtenidas por tinción negativa (A.1) y mediante criomicroscopía electrónica (A.2). Las barras representan 25 nm. **B)** Diagrama de flujo ilustrando las diferentes etapas del procesamiento. En la primera etapa se seleccionaron y extrajeron las colas de los fagos que habían eyectado su genoma y a continuación se seleccionaron las partículas correspondientes a las proyecciones laterales de las colas que estaban bien alineadas (B.1). En la segunda etapa se utilizaron las coordenadas de las partículas alineadas para extraer de nuevo las partículas sin la densidad de los LPS. Tras el pre-procesamiento, se construye el modelo 3D mediante refinamiento angular iterativo con los paquetes informáticos EMAN y Xmipp.

Para la reconstrucción tridimensional sólo se escogieron las partículas correspondientes a las proyecciones laterales del complejo de la cola, en las que una adecuada disposición de los LPS y la cápsida viral permitía un alineamiento correcto de la cola, mejorando la relación señal/ruido y haciendo posible su visualización (Fig. 4.10.B.1, recuadro naranja). Para la reconstrucción tridimensional de las colas, se empleó como modelo inicial la densidad de la cola del mapa 3D del virion maduro de T7, resuelto previamente en nuestro laboratorio (Agirrezabala et al., 2005). Mediante el paquete informático EMAN (Ludtke et al., 1999) se generó un modelo intermedio utilizando un protocolo refinamiento angular iterativo y aplicando simetría C6 a lo largo del eje longitudinal de la cola, ya que Steven demostró que las colas de T7 presentan simetría 6 (Steven, 1988). En el primer modelo tridimensional obtenido, la densidad de la cola no llegaba a contactar con la densidad de los LPS. Sin embargo, en las micrografías obtenidas tanto por tinción negativa como por crío-microscopía se apreciaba que existía contacto entre ambos (Fig. 4.10.A). Cuando se refinó el modelo con el programa Projection Matching de Xmipp, la densidad de los LPS apareció heterogéneamente distribuida (Fig. 4.10.B.1). La presencia de los LPS en las imágenes había permitido alinear correctamente las colas pero dificultaba etapas posteriores del procesamiento, por lo que se decidió no incluir a los LPS en la reconstrucción. Para ello, las coordenadas de las partículas alineadas y seleccionadas se emplearon para volver a extraer las partículas de las micrografías originales sin los LPS. Estas partículas eran de menor tamaño para aumentar la señal de la cola puesto que ya habían sido alineadas previamente. Finalmente, 1781 de estas partículas fueron utilizadas en la reconstrucción del modelo tridimensional definitivo, empleando de nuevo el protocolo de refinamiento angular iterativo con los paquetes EMAN y Projection Matching de Xmipp (Fig. 4.10.B.2). La resolución estimada para el mapa obtenido, de acuerdo con un criterio FSC de 0.3, es de unos 20 Å.

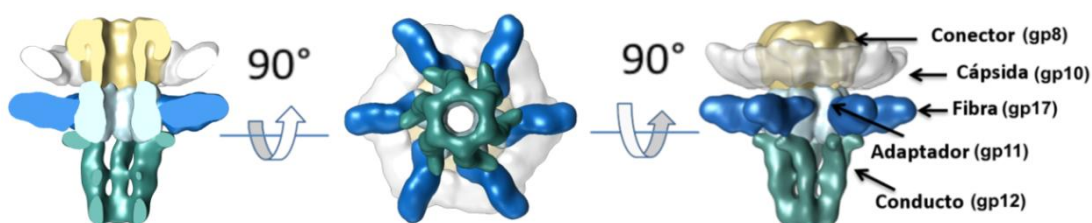


Figura 4.11: Reconstrucción tridimensional de la conformación abierta de la cola del fago T7 obtenida por crío-microscopía electrónica. Se muestran la sección transversal, la vista frontal y la vista lateral del modelo 3D reconstruido.

El volumen obtenido presenta un canal interno abierto con diámetro de 40 Å a lo largo del eje longitudinal de la cola. La longitud del complejo desde el extremo apical hasta el conector es de 290 Å, y coincide con la longitud de la cola presente en los viriones maduros (Cuervo et al.,2013). El conector aparece asociado a una porción de la cápsida correspondiente al vértice en el que se inserta la cola. La densidad de las fibras se corresponde con el extremo N-terminal de las mismas. Dicha región se dispone transversal al dominio adaptador, a la vez que mantiene contactos con el conducto formado por gp12. El extremo terminal de las fibras no pudo ser resuelto debido a que se perdió dicha densidad al disminuir el tamaño de las partículas extraídas en la segunda fase de la reconstrucción. En la figura 4.11 se muestra el mapa 3D de la conformación abierta de la cola, donde se han segmentado los complejos estructurales que la componen basándonos en la asignación de dominios previamente establecida en Cuervo et al. (2013).

4.3.3 Comparación de la estructura de la cola antes y después de la eyección del genoma.

La reciente resolución de la estructura de la cola en nuestro laboratorio (Cuervo et al.,2013) nos ha permitido detectar los cambios estructurales que se producen como consecuencia de la eyección en el complejo de la cola. Las dos modificaciones más evidentes son el cambio en la orientación de las fibras y la apertura del canal interno de la cola.

Como se vio en el apartado 4.2.3 de resultados (Fig. 4.8), el cambio conformacional en las fibras constituye una etapa anterior a la eyección del genoma. El modelo de la cola abierta permite visualizar como la región N-terminal de las fibras gira 30° sobre el eje longitudinal de la cola y adopta una nueva disposición (transversal a dicho eje), lo que permite que el extremo C-terminal contacte con la membrana externa bacteriana (Fig. 4.12.A). Al segmentar la cola en el volumen del fago T7 maduro (Agirrezabala et al., 2005) se observa como el ADN permanece retenido en el canal de eyección, a la altura del adaptador, en la región de interacción entre éste, el conducto formado por gp12 y las fibras. De hecho, en dicho volumen se aprecia una densidad que cierra el canal a la altura del adaptador (Fig. 4.12. B1, la flecha verde). Esto indica que podría existir una válvula que participara en la retención del ADN viral en el interior de la cabeza. En nuestra reconstrucción tridimensional de la cola abierta, en cambio, el conducto de la cola presenta un diámetro interno de 40 Å a lo largo de todo el canal que permite el paso de la doble hélice de ADN viral (20 Å de diámetro) (Fig. 4.12.B.2).

Por otra parte, la segmentación del monómero de gp12 en los modelos de la cola abierta y cerrada nos ha permitido analizar los cambios conformacionales que se producen en

el conducto de la cola tras el reconocimiento del receptor (Fig. 4.12.D2). Cada monómero de gp12 gira 10 grados respecto al eje longitudinal de la cola. El movimiento coordinado de los 6 monómeros de gp12 es el responsable de la apertura del canal interno en el extremo apical (Fig. 12.C) y de la pérdida de la vorticidad observada en la conformación cerrada. Todo ello indica que los cambios que se dan en las fibras y en el conducto son los responsables de la apertura del canal de la cola.

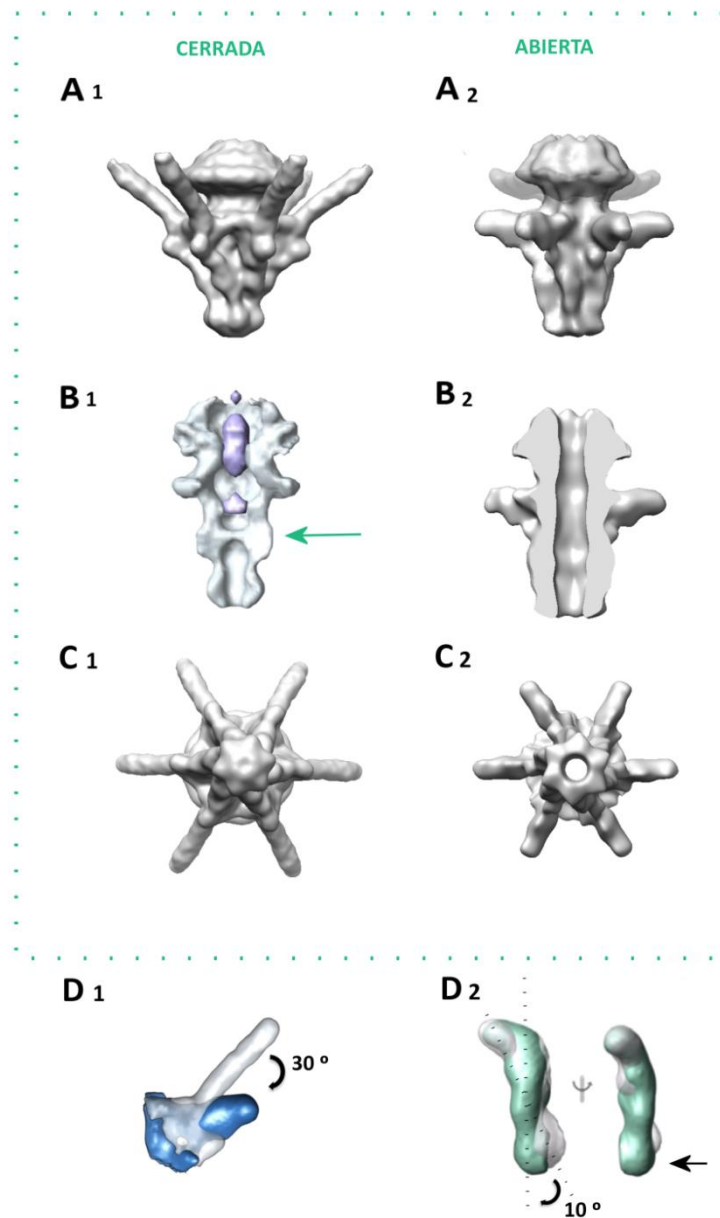


Figura 4.12: Cambios estructurales en el complejo de la cola tras la eyección del genoma de T7. A) Vistas frontales de la reconstrucción de la cola cerrada (A.1) y abierta (A.2). **B)** Sección transversal donde se visualiza el canal interno de la cola cerrada (B.1) y abierta (B.2). La flecha verde indica el lugar de retención del ADN. **C)** Vista lateral mostrando la segmentación de una fibra y un monomero de gp12 en los modelos tridimensionales de la cola cerrada y abierta. **D.1)** Superposición de la densidad correspondiente a una fibra antes (transparente) y después (azul) de la eyección. **D.2)** Superposición de la densidad correspondiente a un monómero de gp12 antes (blanco) y después (verde) de la eyección. La región de gp12 donde el cambio conformacional es más acusado se marca con una flecha negra .

4.4. Estudio de las proteínas del núcleo proteico implicadas en la translocación del genoma viral.

4.4.1 El complejo del núcleo se desensambla tras ser eyectado a través de la cola.

Las proteínas del complejo del núcleo están implicadas en la translocación del genoma viral a través de la envuelta bacteriana (apartado 1.3.2.1 de introducción). Para su caracterización bioquímica y estructural se decidió purificar dicho complejo a partir de partículas virales infectivas.

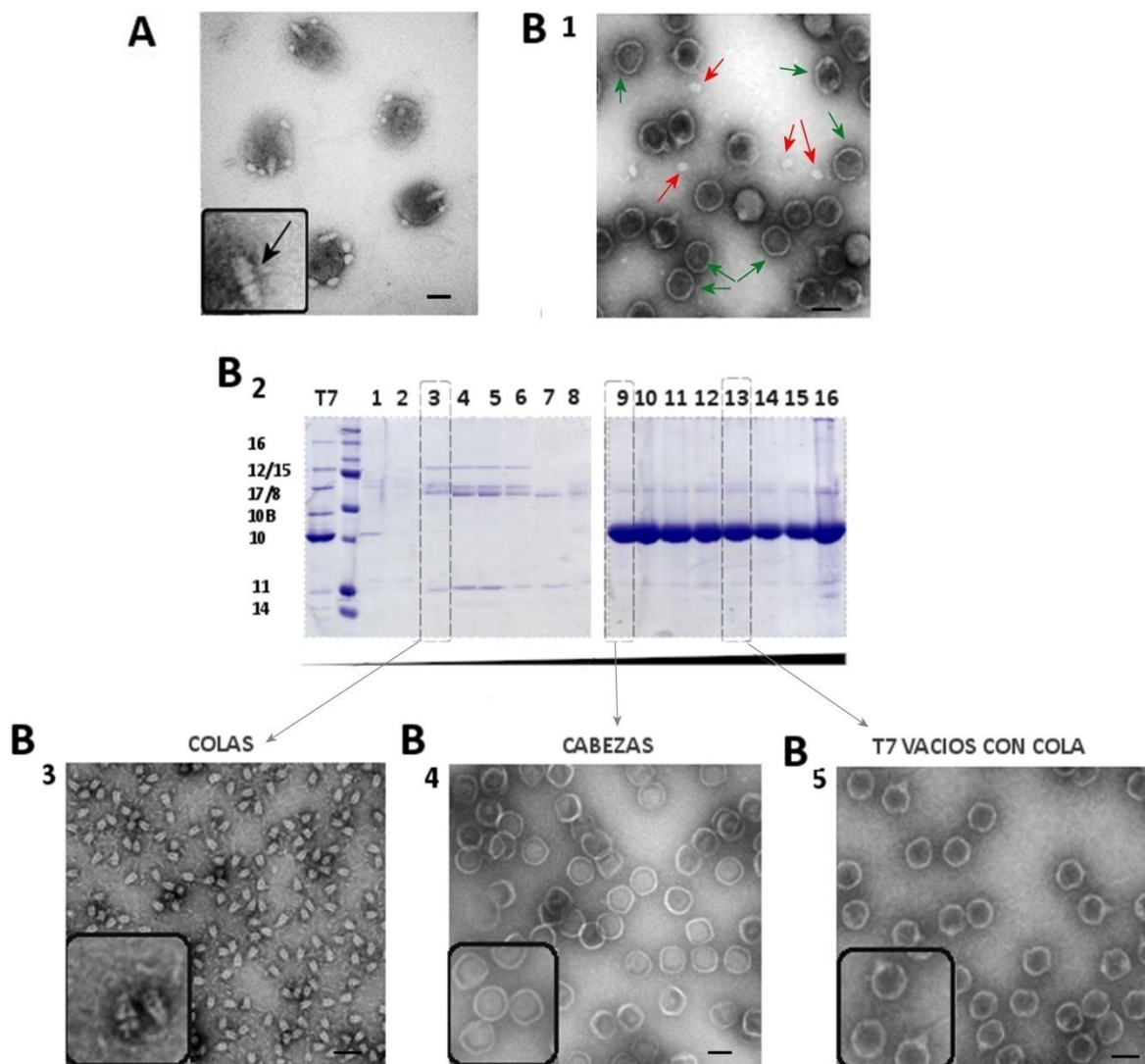


Figura 4.13: El complejo del núcleo no se localiza ni en las colas ni en las cabezas de partículas virales que han eyectado su genoma tras recibir un tratamiento combinado de calor y EDTA. A) Micrografía electrónica de partículas virales rotas por la cápsida donde se aprecia el complejo del núcleo asociado al conector. En el recuadro se muestra una ampliación del complejo del núcleo señalado por una flecha negra. B.1) micrografía electrónica de virus T7 sometidos a un tratamiento con EDTA y calor. Las colas desprendidas y las cápsidas disociadas se marcan con flechas rojas y verdes, respectivamente B.2) Análisis electroforético de las fracciones del gradiente de sacarosa (del 10 al 40%) en el que se cargaron los viriones tratados con EDTA y calor. B.3-5) Micrografías electrónicas de las fracciones 3, 9 y 13 del gradiente ilustrando colas, cabezas y fagos vacíos respectivamente. Todas las micrografías fueron teñidas con acetato de uranilo (AcUr) al 2% (p/v). En los recuadros se muestra una ampliación de las imágenes, las barras representan 50nm.

Como se observa en la figura 4.13.A, cuando la cápsida de los viriones maduros se rompe (en una mínima fracción de la población viral durante el proceso de purificación de los virus) el ADN se libera al medio y el complejo del núcleo permanece asociado al conector. Esto también fue observado por Steven y Trus, quienes además apuntaron que cápsidas rotas de mutantes defectivos en gp12 (proteína mayor de la cola) presentan el complejo del núcleo asociado al conector en la cápsida o libre en el medio (Steven y Trus, 1986). No obstante, la cápsida de T7 es muy estable y no tiende a romperse con agentes de desnaturalizantes como la urea o el cloruro de guanidinio (Ionel et al., 2012), por lo que no era viable aislar el complejo del núcleo a partir de cápsidas rotas, ya que tratamientos más agresivos (p.ej: sosa) degradaban todas las proteínas.

Para purificar el complejo del núcleo se decidió someter a los viriones de T7 a un tratamiento combinado de calor (65°C) y EDTA (ver apartado 3.1.4 de métodos) para inducir la eyección del genoma viral a través de la cola. Como se aprecia en la figura 4.13.B1, dicho tratamiento puede ocasionar la rotura de la partícula viral en colas (flechas rojas) y cabezas (flechas verdes). Posteriormente, la muestra se cargó en un gradiente del 10 al 40 % de sacarosa con el fin de separar los complejos proteicos por su tamaño (ver métodos, apartado 3.1.4). Así, las colas unidas asociadas al conector migraron en las primeras fracciones (Fig 4.13.B2 y 4.13. B3), las cápsidas vacías en las fracciones centrales (Fig.4.13.B2 y 4.13.B4) y los fagos vacíos en las fracciones de mayor porcentaje de sacarosa (Fig. 4.13. B5). Los virus que no eyectaron su genoma migraron al fondo del tubo. El complejo proteico del núcleo no se detectó en ninguna de las fracciones, indicando que podía haberse degradado tras ser eyectado por la cola. Esto explicaría por qué no se observa el complejo del núcleo en las partículas virales vacías que permanecen asociadas a la envuelta bacteriana tras eyectar su genoma (Fig. 4.14.A).

Para confirmar dicha hipótesis se incubaron los fagos (10^{11} pfu/ml) en presencia de LPS de *E. coli* EH100 (2,5 mg/ml) durante 3 horas a 37°C y se analizó la muestra mediante microscopía electrónica (Fig. 4.14.B) y así como por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Fig.4.14.C). Nuevamente, el complejo del núcleo proteico no se detectó por microscopía en las partículas que habían eyectado su genoma. Las proteínas del núcleo tampoco se detectaron en el análisis electroforético de los virus incubados con los LPS. Las proteínas 6.7 y 7.3, vinculadas al proceso de infección, tampoco se detectaron en el gel de acrilamida (Fig. 4.14.C). Se ha descrito que estas proteínas se degradan poco después de ser eyectadas a la envuelta bacteriana (Kemp, 2005), por lo que las proteínas del núcleo proteico podrían correr la misma suerte tras intervenir en la internalización del ADN. No obstante, en el análisis de la secuencia aminoacídica de las citadas proteínas no se ha

detectado actividad peptidasa. Otra posible explicación para la ausencia de estas proteínas en el gel de acrilamida sería que se agregasen con los LPS y no penetraran en el gel. Sin embargo, esto no explicaría por qué no se detectan las proteínas del núcleo tras romper las partículas virales con EDTA ni en los análisis por microscopía (Fig.4.13).

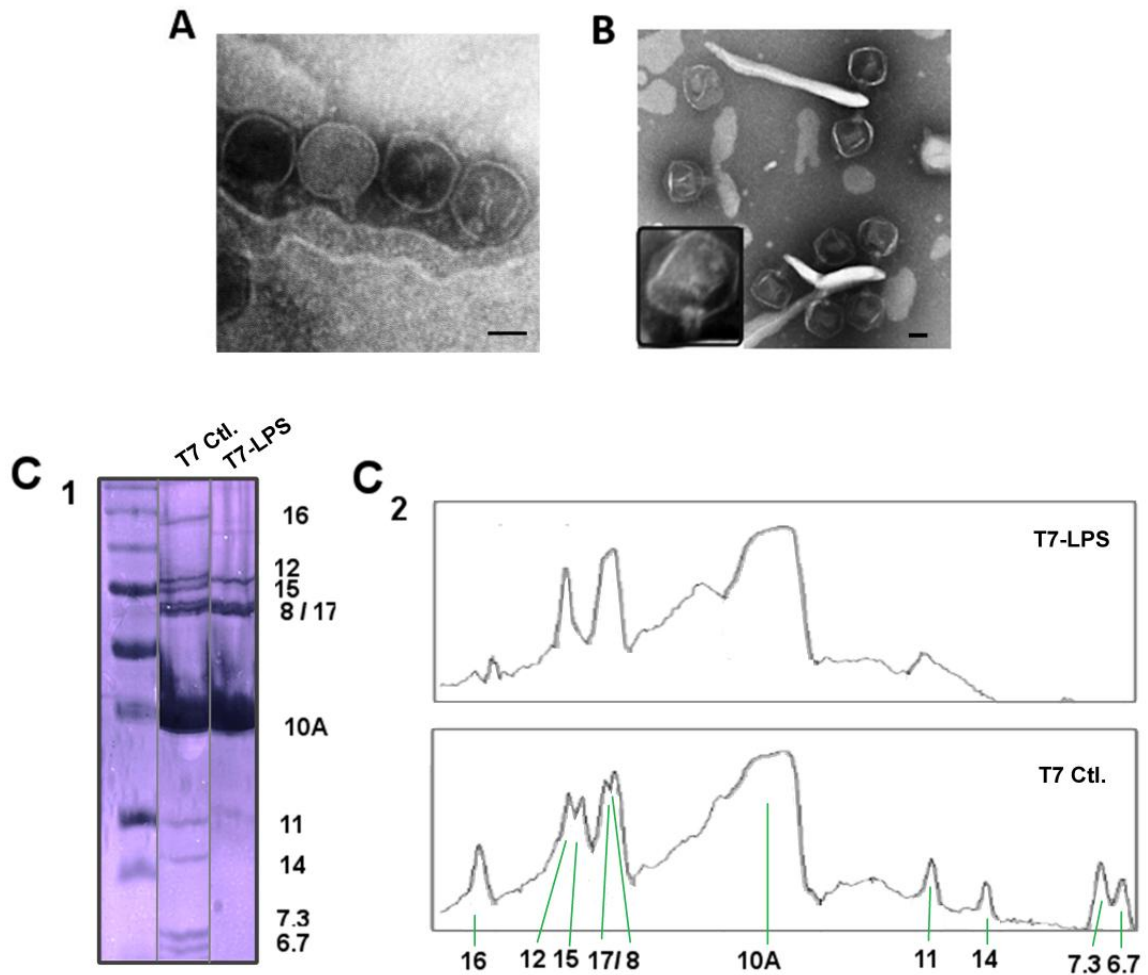


Figura 4.24 El complejo del núcleo no se detecta en los viriones de T7 que eyectan el su genoma tras interactuar con los LPS. A) Micrografía electrónica de fagos T7 que permanecen unidos a la envuelta bacteriana tras eyectar su genoma, el complejo del núcleo no se detecta en el interior de la cabeza ni asociado a la cola. B) Micrografía electrónica de los fagos unidos a los agregados de LPS. En el recuadro se muestra una ampliación de un fago vacío tras eyectar su genoma, nuevamente no se detecta el complejo del núcleo en las partículas virales. Ambas micrografías están teñidas con PTA al 2% (p/v) y las barras representan 25 nm. C.1) Análisis electroforético de las partículas T7 incubadas en ausencia (control) y en presencia de los LPS de *E. coli* EH100. C.2) Perfil densitométrico del gel de acrilamida.

4.4.2 Análisis bioinformático de las proteínas gp15 y gp16.

Como se menciona en la introducción, las proteínas del núcleo proteico intervienen en la morfogénesis de la cápsida y cambian de conformación tras el empaquetamiento del ADN en el interior de la cápsida (ver apartado II.2 de introducción). Además, Hu y colaboradores no detectaron estas proteínas en sus reconstrucciones tridimensionales de fagos T7 vacíos tras la eyección y proponen que las proteínas del núcleo son eyectadas para extender la cola en la infección. Para que las citadas proteínas adopten conformaciones tan diferentes han de ser muy flexibles. La predicción de la estructura secundaria mostró que más del 50% de estas proteínas consisten en cortas regiones de α hélices (71% para gp14, 65% para gp15 y 54% para gp16) intercaladas por giros y bucles sin estructura secundaria definida (Fig. 4.15.A.1 y Fig. 4.17.1).

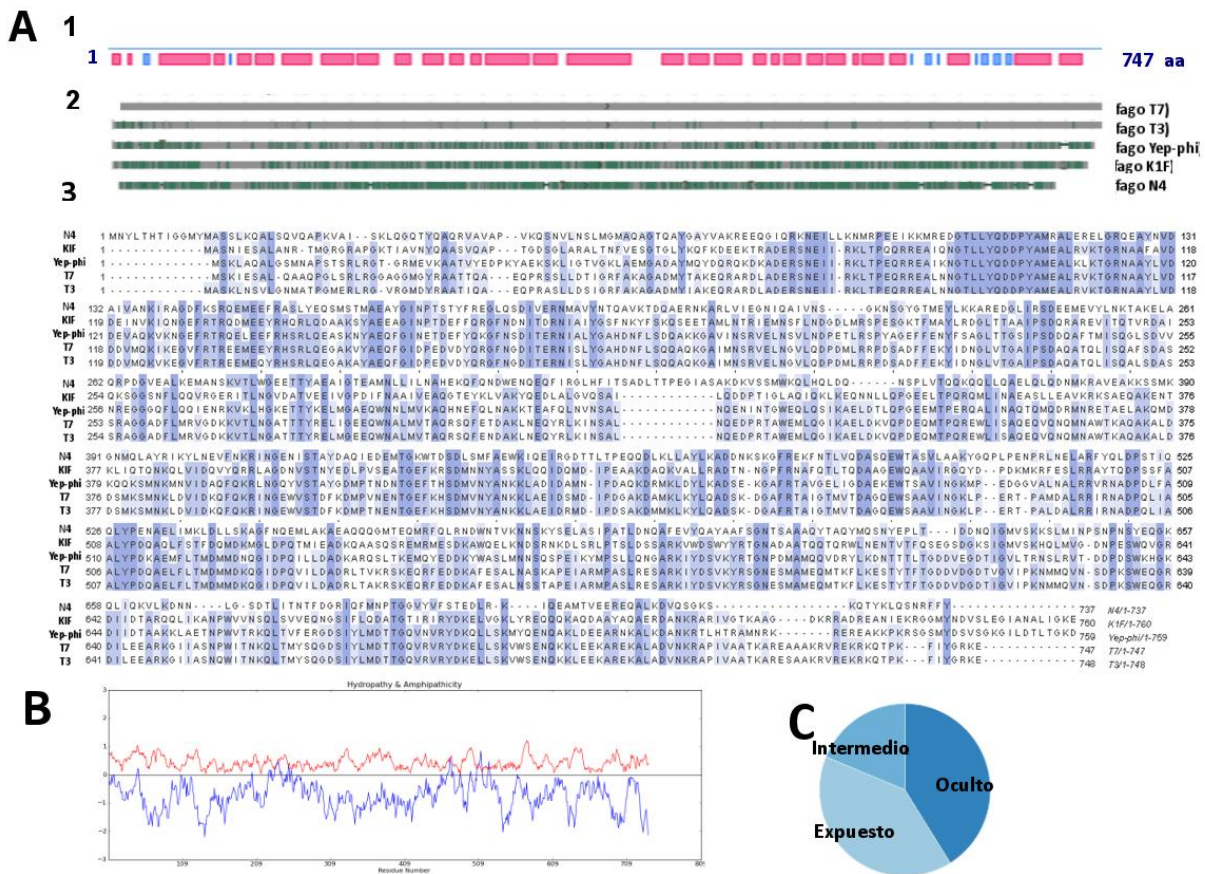


Figura 4.15: Análisis bioinformático de gp15. A.1) Predicción de la estructura secundaria de gp15 realizada con Predit Protein. En rojo se muestran las regiones de hélice- α y en azul las láminas β . A.2) Alineamiento múltiple para gp15 y sus homólogas en fagos del grupo T7 realizada con BLAST. Las regiones que presentan identidad de secuencia se muestran en gris y las regiones que no alinean en verde. A.3) Alineamiento múltiple para las mismas proteínas mostrando las secuencias aminoacídicas realizada con Clustal Omega. Los residuos que presentan identidad están coloreados en azul. B) Predicción de hidrofobicidad de gp15 con el programa WHAT 2.0. La línea azul representa la hidrofobicidad para cada región de la proteína y la roja la tendencia hidrofílica C) Predicción de la proporción de residuos de gp15 expuestos al medio realizada con el programa Predit Protein.

De acuerdo con los experimentos de Chang y colaboradores, la proteína gp14 se localiza en la membrana externa tras la eyección y es insoluble, por lo que decidimos centrarnos en analizar las proteínas solubles gp15 y gp16, que interactúan tanto con la membrana externa como con la membrana interna (Chang et al.,2010). En nuestra predicción de hidrofobicidad para estas proteínas realizada con el programa WHAT 2.0, gp15 presenta una marcada tendencia hidrofílica (Fig. 4.15.B) y mayor proporción de residuos expuestos al medio que gp16 (Fig. 4.15.B y 4.16.B), que por el contrario presenta 6 regiones de hidrofobicidad en su secuencia y una de ellas podría corresponder con un dominio transmembrana (Fig.4.16.A).

Moak y Molineux identificaron un dominio transglicosilasa en el extremo N-terminal de gp16 de unos 170 aminoácidos (Moak y Molineux, 2000). Mediante el programa Phyre2 (Kelley et al., 2009) y usando la estructura de la transglicosilasa de *E. coli* Slt70 como referencia, se pueden modelar 129 residuos del extremo N-terminal de gp16 con un 97% de confianza, lo que equivale a un 10% de la secuencia (Fig. 4.16.D).

Por otra parte, los alineamientos múltiples de secuencia aminoacídica comparando las proteínas gp15 y gp16 con sus equivalentes en fagos del grupo T7 (T3, K1F, Yep-phi y el podovirus N4) permite detectar una secuencia de 100 aminoácidos muy conservada en el extremo N-terminal de gp15 (Fig. 4.15.A.3). Para gp16, las regiones más conservadas se localizan más allá del dominio transglicosilasa (Fig. 4.17.3). Cabe mencionar que recientemente

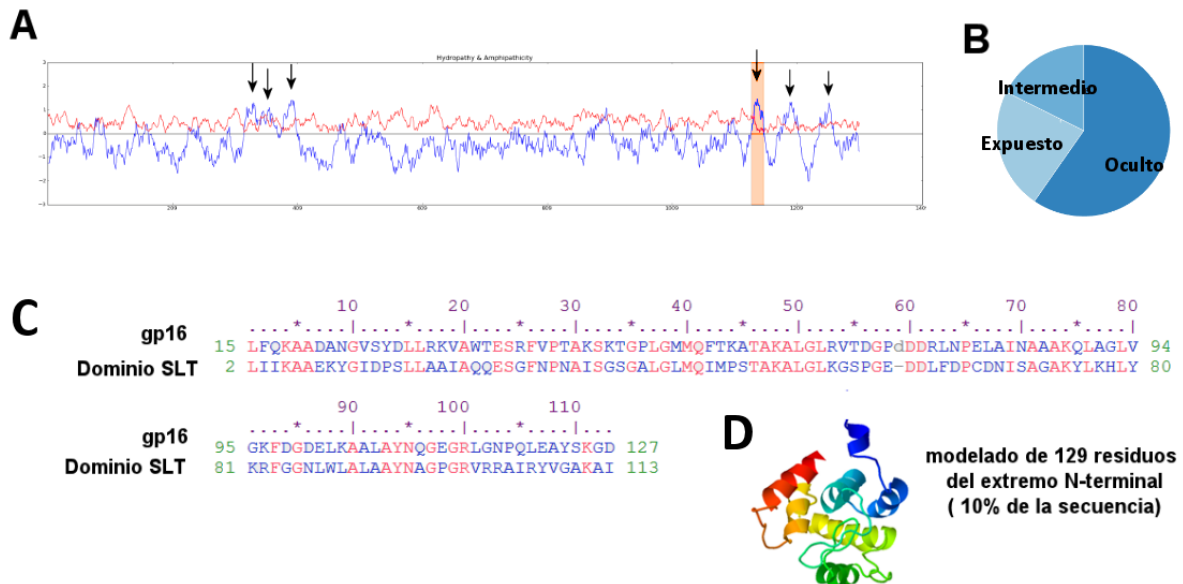


Figura 4.16: Análisis bioinformático de gp16. A) Predicción de hidrofobicidad de gp16 con el programa WHAT 2.0. La línea azul representa la hidrofobicidad para cada región de la proteína y la roja la tendencia hidrofílica. En naranja la región predicha como dominio transmembrana. B) Predicción de la proporción de residuos de gp16 expuestos al medio realizada con el programa Predict Protein. C) Alineamiento de los primeros 127 aminoácidos de gp16 con el motivo transglicosilasa SLT realizado con el servidor BLASTp. D) Modelado del dominio transglicosilasa con el programa Phyre2.

4.4.3 Purificación y expresión de las proteínas del núcleo proteico:

Puesto que no se pudo aislar el complejo del núcleo proteico del fago T7 a partir de las partículas virales infectivas (ver apartado 4.4.1 de resultados), se decidió clonar y expresar *in vitro* las proteínas gp15 y gp16 para su caracterización bioquímica y estructural.

4.4.3.1 Purificación de gp15:

La proteína gp15 se expresó en la cepa *E. coli* C41 tras 3h de inducción con 1mM de IPTG y el extracto celular se lisó mediante sonicación (Fig. 4.18.A.1, ver sección 3.2.1 de métodos). La muestra se clarificó mediante centrifugación y las fracciones solubles (sobrenadante) e insolubles (precipitado) se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes, observándose que la proteína era completamente soluble en las condiciones de purificación (dato no mostrado). La purificación posterior de la proteína se llevó a cabo en dos pasos consecutivos. Primero se hizo una purificación por afinidad utilizando una resina de Cobalto capaz de interaccionar específicamente con la cola de histidinas de la proteína recombinante gp15 (Fig. 4.18.A.2, ver métodos, apartado 3.2.1). A continuación se cargó la proteína purificada en una columna de filtración superosa 6, para su purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. Como se observa en la figura 4.18.B, prácticamente toda la proteína eluye en los mililitros 15 y 16 de la columna (Fig. 4.18.B.).

Se ha descrito que en el interior de la cabeza de T7, la proteína gp15 se ensambla de acuerdo con un orden de simetría 8 (Agirrezabala et al., 2005). Así mismo se ha estimado que hay 8 copias de gp15 mediante análisis electroforético de las partículas maduras (Cerritelli et al., 2003a). Para estudiar el estado oligomérico de la proteína eluída en el mililitro 15, se cargaron 20 μ g de la misma en un gel nativo al 6%. La banda observada migraba entre los marcadores de 232 y 140 KDa, lo que podría corresponder con la talla de un dímero, pues el monómero de la gp15 con la etiqueta de hitidinas tiene una masa molecular de \approx 90 KDa (Fig. 4.18.B.3).

Para comprobar si la cola de histidinas de la proteínas gp15 recombinante interfería en la su estado de oligomerización, se digirió dicha proteína en presencia de enteroquinasa para eliminar los residuos de histidinas. La proteína digerida se incubó nuevamente con la resina de Cobalto para recuperarla en la fracción no unida y separarla así de la proteína no digerida y de las colas de histidinas que se unían a la resina. Por último, la proteína sin la etiqueta de histidinas se volvió a cargar en la columna de filtración superosa 6 para analizar si había algún cambio en el perfil cromatográfico. El la figura 4.18.C se muestra como la

eliminación de la etiqueta de histidinas no altera el patrón de migración de la proteína, sugiriendo que no es capaz de formar nuevas formas oligoméricas.

El análisis por microscopía electrónica de las diferentes fracciones obtenidas en cada paso de purificación no permitió detectar ningún complejo proteico de la proteína gp15, indicando que el dímero se disocia al preparar la rejilla, o bien que no está interactuando correctamente con la superficie del carbón de la rejilla.

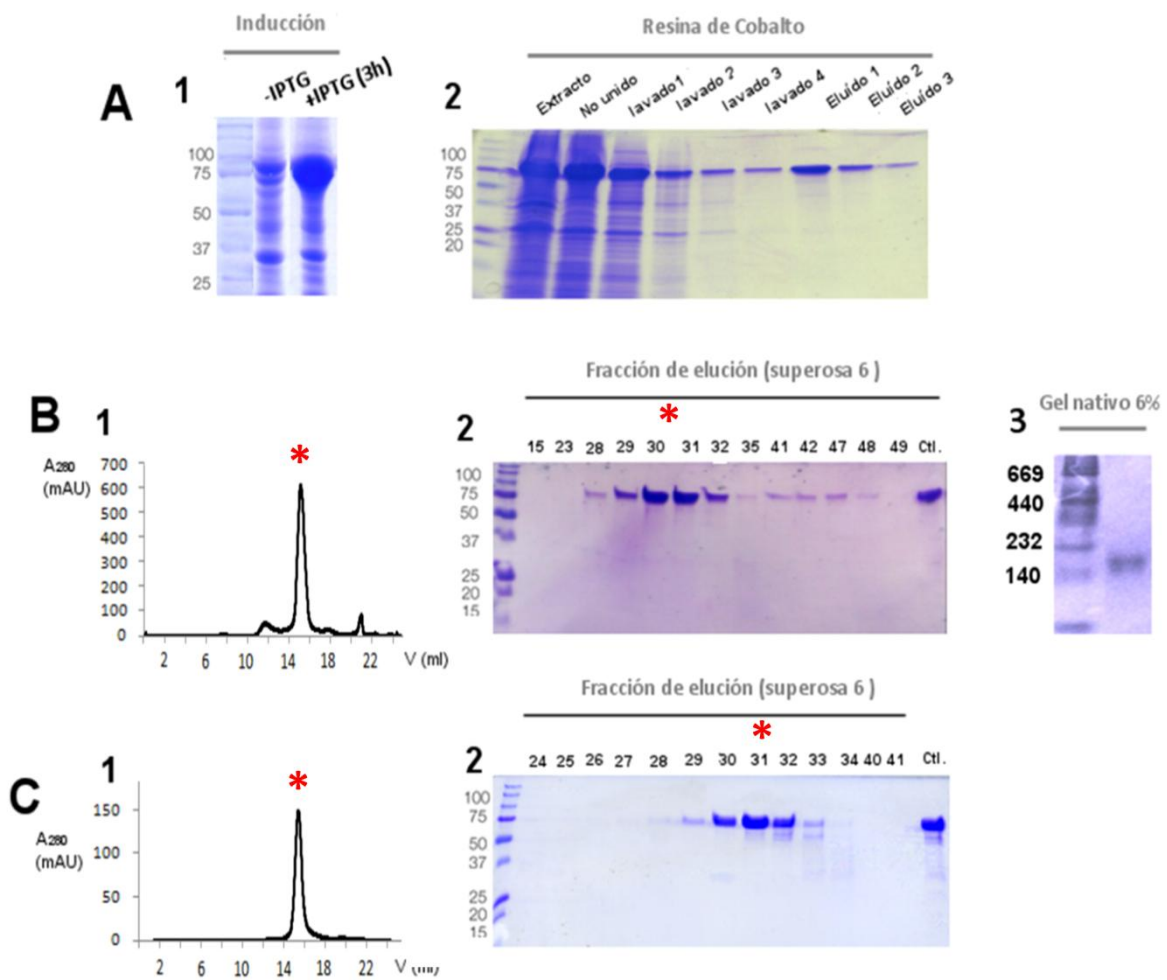


Figura 4.18: Purificación de gp15. A) Primera etapa de purificación de gp15. A.1) Se muestra el análisis de la expresión tras 3 h de inducción con IPTG. A.2) Purificación por afinidad con resina de Cobalto, eluyendo la proteína en tres pasos consecutivos con 100, 250 y 400 mM de imidazol (eluidos 1, 2 y 3 respectivamente). B) Segunda etapa de purificación de gp15. B.1) Cromatograma de la filtración de gp15 en una columna de exclusión molecular superosa 6. B.2) Análisis electroforético de las fracciones resultantes de la cromatografía de exclusión molecular. Cada fracción es de 0,5 ml. Se marca con un asterisco rojo el pico en el que eluye gp15. B.3) Gel nativo al 5% de la fracción eluida en el mililitro 15 de la cromatografía. C.1) Cromatograma de la filtración de gp15 sin la etiqueta de histidinas en una columna superosa 6. C.2) Análisis electroforético de las fracciones de la cromatografía

Por otra parte, se llevó a cabo un análisis indirecto de la interacción de gp15 con el ADN de T7. Dicho análisis fue motivado por la predicción bioinformática de gp15 como proteína de unión al ADN y por datos bibliográficos previos en los que se propone que gp15 y gp16 están implicadas en la conducción del ADN viral al citoplasma bacteriano durante la infección (Chang et al., 2010). En el análisis mencionado se observó la protección del ADN frente a la digestión de la nucleasa *Bst*BI cuando la proteína gp15 estaba presente en la reacción. Se realizaron varios ensayos, cambiando la concentración de gp15 en cada reacción de digestión pero manteniendo constantes la cantidad de ADN y de *Bst*BI. El ADN de cada reacción se detectó en un gel de agarosa teñido con BrEt. Se observó que cuando la cantidad de gp15 disminuía, la digestión del genoma se hacía más notable (Fig 4.19.A). Para comprobar que la etiqueta de histidinas no participaba en la interacción de gp15 con el ADN, se realizó el ensayo de digestión en presencia de las proteínas recombinantes Hsp90 y gp8, ambas con etiquetas de histidinas. La nucleasa *Bst*BI digirió completamente el ADN de T7 en presencia de estas proteínas, lo que indica que la protección observada en presencia de gp15 es específica. Además, para descartar que la diferencia se deba a que gp15 altere la migración del DNA en el gel de agarosa se llevó a cabo el ensayo de digestión añadiendo la proteína gp15 al inicio

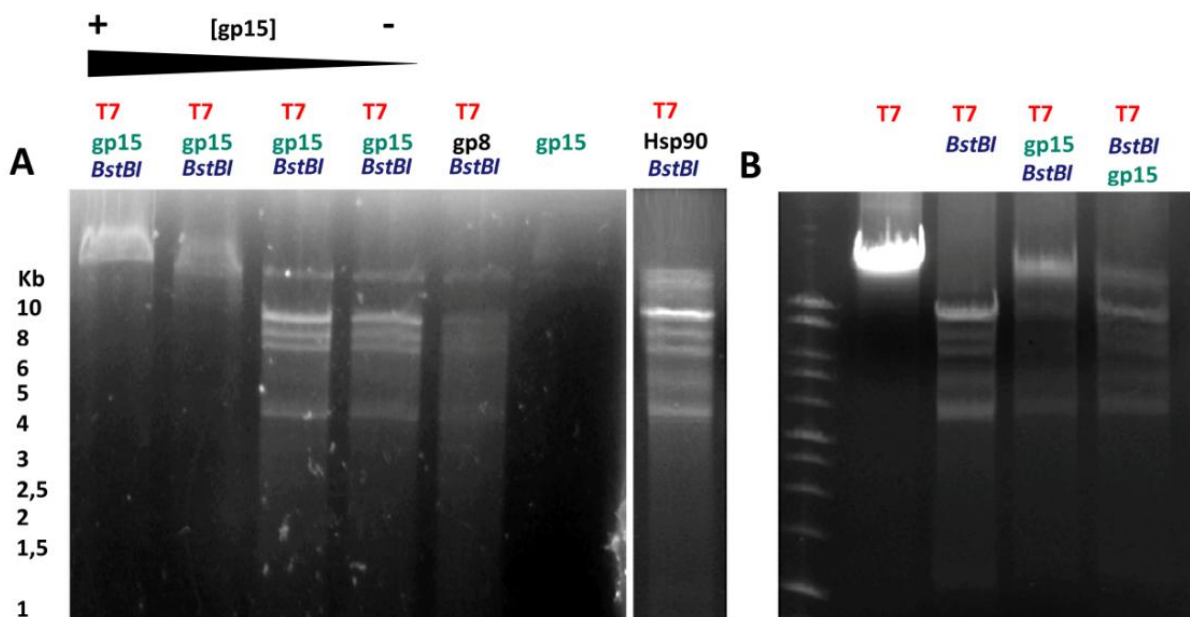


Figura 4.19: Ensayo indirecto de la interacción de gp15 con el ADN de T7. A) Digestión del ADN por *Bst*BI en presencia de concentraciones decrecientes de gp15 (1.5, 0.75, 0.15, 0.015 mg/ml de gp15, respectivamente). En el quinto carril se muestra la digestión del ADN de T7 por *Bst*BI en presencia de gp8 (1,5 mg/ml). El sexto carril corresponde a la proteína gp15, para comprobar que la muestra no presenta contaminación de ADN. . El séptimo carril corresponde con la digestión del ADN de T7 por *Bst*BI en presencia de Hsp90 (1,5 mg/ml). **B)** En el primer carril se muestra el marcador de 10Kb y a continuación el genoma de 40 Kb de T7 cargado como control. El tercer y cuarto carril muestran el resultado de incubar el ADN de T7 con *Bst*BI y gp15 (1 mg/ml), añadiendo gp15 al inicio y al final de la reacción, respectivamente.

de la reacción o al final (Fig 4.19.B). Cuando gp15 se añadió al inicio, el ADN no fue digerido y cuando se añadió al final, la enzima *BstBI* cortó el ADN en fragmentos de diferente tamaño. Los datos sugieren que gp15 podría interactuar con el genoma de T7, pero se requieren más experimentos para caracterizar esta interacción.

4.4.3.2 Purificación de gp16:

La proteína gp16 se purificó de manera semejante a gp15, aunque con alguna variación pues resultó ser más inestable a temperatura ambiente y menos soluble. En las pruebas de expresión una parte de la proteína quedaba incluida en la fracción de membranas y otra parte se hallaba como proteína soluble (Fig. 4.20.A). Para expresar gp16, se creció el cultivo bacteriano a 20°C, pues temperaturas más elevadas conducían a la lisis del cultivo. La mejor expresión se obtuvo tras 8 horas de inducción con IPTG a 1 mM (Fig. 4.20.A). El extracto celular se sonicó y se purificó mediante una cromatografía de afinidad usando una resina de Cobalto con afinidad por la etiqueta de histidinas (Clontech) (Fig.4.20.B).

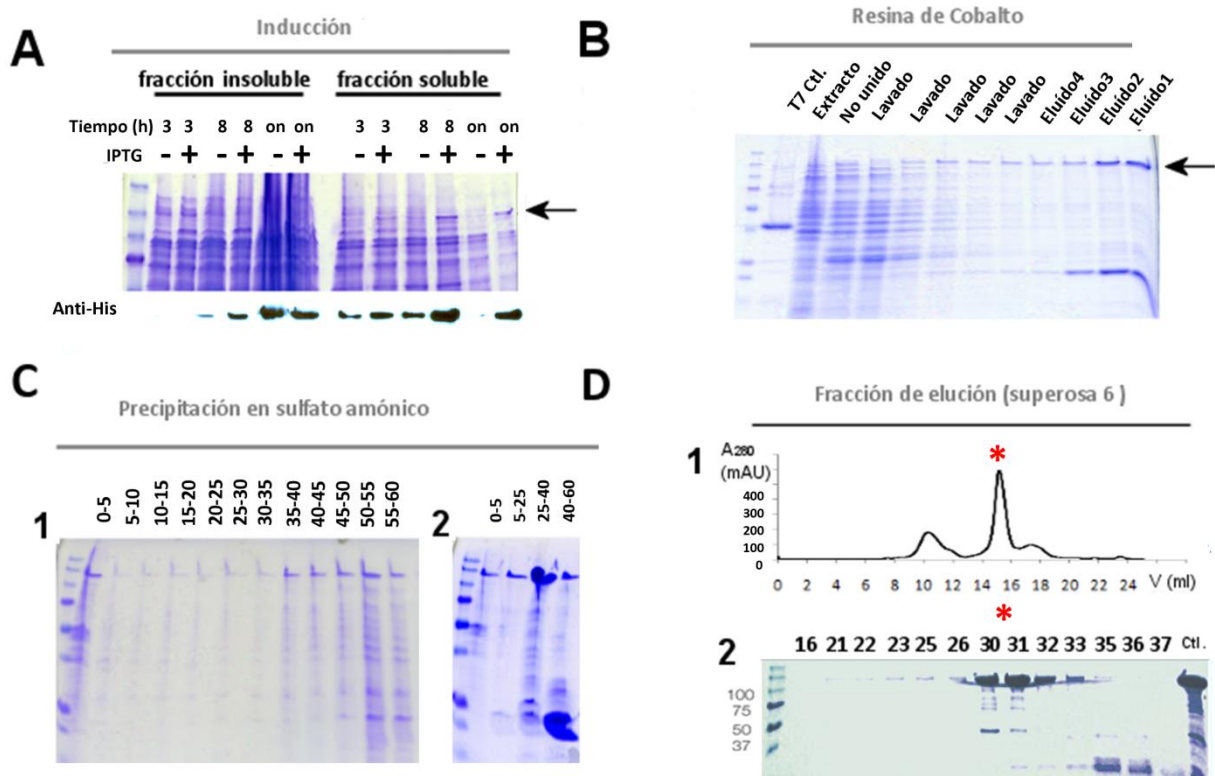


Figura 4.20: Purificación de gp16. A) En la parte superior se muestra el análisis electrofotético de la expresión de gp16 a diferentes tiempos de inducción con IPTG (3h, 8h y over-night (on)). En la parte inferior el ensayo de inmunodetección de gp16 en las diferentes condiciones de expresión con anticuerpos contra la cola de histidinas de gp16. B) Purificación por afinidad con resina de Cobalto, eluyendo la proteína a 250 mM de imidazol. C.1 y C.2) Precipitación selectiva de gp16 con sulfato de amonio. D.1) Cromatograma de la filtración de gp16 en una columna de exclusión molecular superosa 6. D.2) Análisis electroforético de las fracciones resultantes de la cromatografía de exclusión molecular (cada fracción es de 0,5 ml).

Para optimizar la solubilidad de la proteína, los tampones de lavado y elución contenían el detergente N-dodecil-maltósido en concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica. La proteína así purificada presentaba un contaminante mayoritario de unos 20 KDa (Fig. 4.15.B). Para limpiar la muestra se realizó una precipitación selectiva con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) y se observó que a una concentración entre el 25 al 40 % de (NH₄)₂SO₄ la proteína precipitaba sin el fragmento de 20KDa (Fig. 4.20.C.2). El proceso de purificación se completó con una cromatografía de exclusión molecular en una columna de filtración en gel superosa 6. Como se observa en la figura 4.15.D, el perfil cromatográfico presenta dos picos: uno en el mililitro 10 y otro en los mililitros 15 y 16.

4.4.4 Detección de la actividad transglicosilasa en la proteína gp16 recombinante.

Con el fin de determinar si la proteína gp16 purificada era biológicamente activa, se llevó a cabo un ensayo de actividad transglicosilasa con la fracción proteica eluída en el mililitro 15 de la cromatografía de exclusión molecular. Para ello se cargaron diferentes concentraciones de la muestra en un gel de acrilamida con peptidoglicano y se llevó a cabo la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (ver apartado 3.3.5 de métodos). Como se aprecia en la figura 4.21, la cantidad de peptidoglicano hidrolizado en el gel del zimograma era dependiente de la concentración de la muestra de gp16 cargada, de modo que cuanto mayor era la concentración de la proteína, mayor era la degradación. Además, en los carriles en los que se cargó la proteína gp16 más concentrada, se aprecian bandas de talla inferior a la de gp16 que también presentan actividad transglicosilasa en el zimograma (señaladas por recuadros

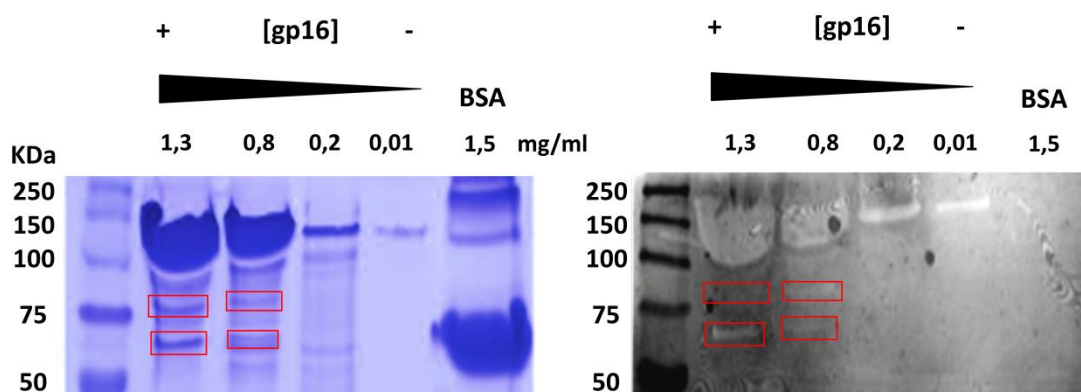


Figura 4.21: Ensayo de la actividad transglicosilasa de la proteína gp16 recombinante. Izquierda) Gel de acrilamida de diferentes concentraciones de la proteína gp16 purificada en la cromatografía de exclusión molecular. **Derecha)** Zimograma de las mismas muestras cargadas en el gel de acrilamida. En ambos casos se ha cargado la proteína BSA como control. Mediante recuadros rojos se señala la proteína gp16 proteolizada parcialmente.

rojos en la figura 4.21). Esto indica que la proteína gp16 se proteoliza parcialmente en el extremo C-terminal, ya que el dominio transglicosilasa se localiza en el extremo N-terminal.

Como control, en el zimograma también se cargó la proteína proteína BSA y no se detectó degradación del peptidoglicano para esta proteína, lo que indica que la actividad transglicosilasa es específica de gp16 y que la proteína purificada es activa.

4.4.5 Caracterización estructural de la proteína gp16 mediante ME.

El análisis por microscopía electrónica del primer pico de proteína gp16 eluída en la cromatografía de exclusión molecular (mililitro 10, Fig. 4.20.D) confirmó que se trataba de agregados (datos no mostrados). El segundo pico (mililitros 15 y 16) no pudo ser caracterizado por microscopía, pues no se detectaron partículas en las micrografías, pese a la pureza de la muestra. Teniendo en cuenta la inestabilidad de gp16, decidimos realizar una fijación química con glutaraldehído en un gradiente del 10-40% de glicerol mediante la técnica GraFix con la proteína eluída del segundo pico de la cromatografía (ver apartado 3.3.7 de métodos).

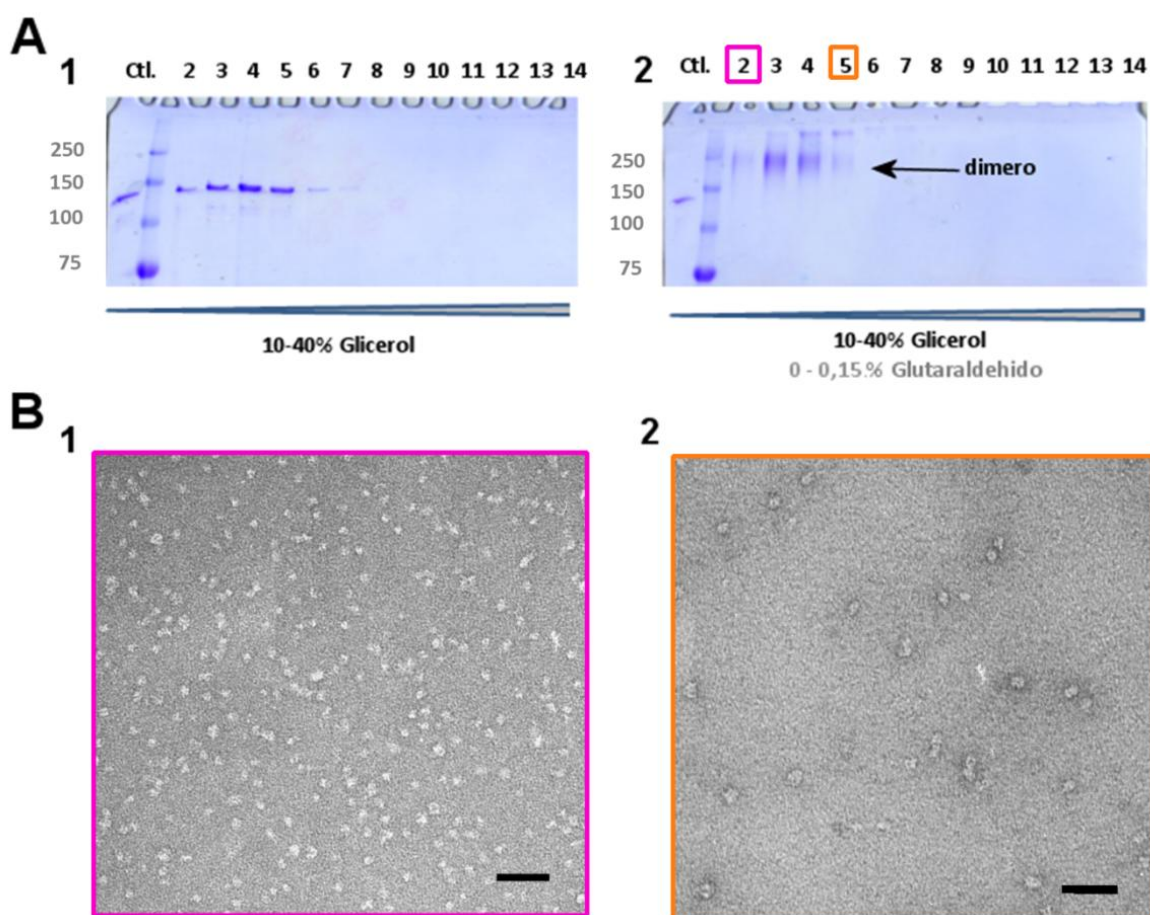


Figura 4.22: Estudio del estado oligomérico de la proteína gp16 expresada in vitro mediante Grafix. A.1 y A.2) Geles de acrilamida de las fracciones procedentes de los gradientes de glicerol sin y con glutaraldehído, respectivamente. B.1) Campo de micrografía electrónica mostrando la forma dimérica de gp16. B.2) Campo de una micrografía electrónica mostrando la forma oligomérica de mayor masa de gp16. Las micrografías fueron teídas con AcUr al 2% y las barras representan 50 nm.

Este método permitió la separación de distintas formas oligoméricas de la proteína gp16. Como se aprecia en el gel de la figura 4.22 la proteína gp16 recombinante puede oligomerizar *in vitro* formando dímeros (fracciones 2-5) y oligómeros de mayor masa molecular (fracciones 4-5). No obstante, ante la falta de datos experimentales indicando el número exacto de copias presentes en el oligómero de mayor masa, decidimos comenzar por la caracterización estructural de la forma dimérica de gp16, con la intención de segmentar la estructura del monómero y analizar, en estudios futuros, los cambios conformacionales que tienen lugar en el complejo del núcleo proteico.

Para el estudio estructural de la forma dimérica de gp16, la muestra de la fracción 2 del gradiente de glicerol fijada fue analizada por microscopía electrónica. Las imágenes se recogieron en un microscopio Tecnai G2 FEG 200 estabilizado a 200 KV a una escala de 67000 aumentos. Un total de 18000 partículas fueron extraídas, normalizadas y promediadas (CL2D) con el paquete informático Xmipp (ver apartado 3.6.2 de métodos). Finalmente se seleccionaron unas 12000 partículas para realizar la reconstrucción del dímero. Puesto que no existían estructuras 3D relacionadas con la proteína gp16 en la base de datos PDB, como modelo inicial para la reconstrucción se utilizaron 3 modelos iniciales diferentes a partir de bolas de ruido o esferoides (Fig. 4.23). Los modelos se refinaron sin aplicar simetría (C1) con EMAN hasta un ángulo de proyección de 8 grados (representados en la figura 4.23).

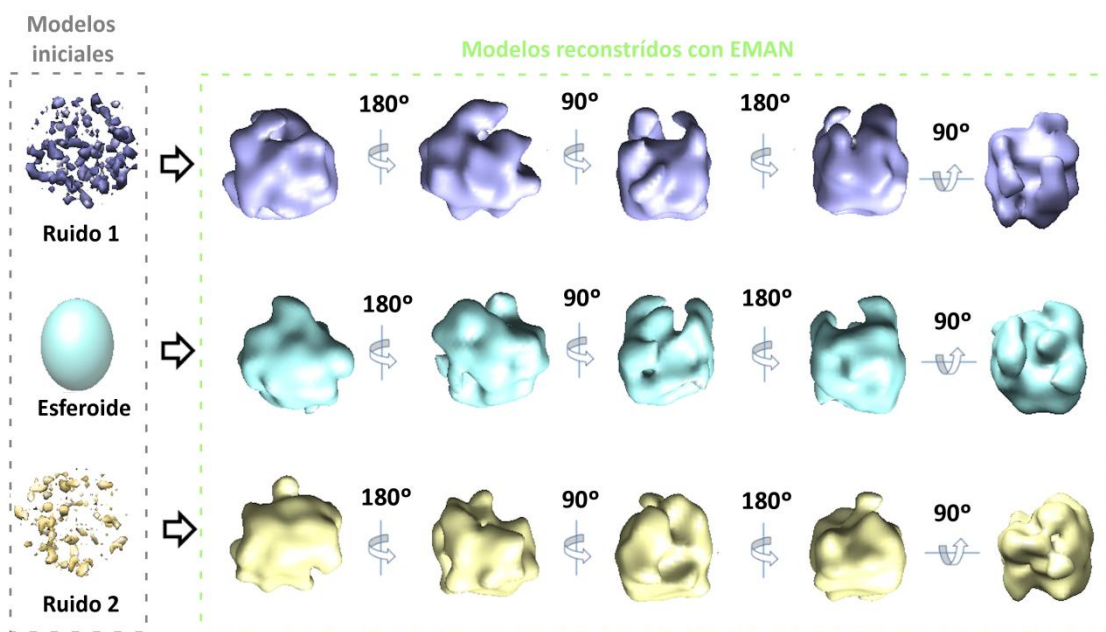


Figura 4.23: Reconstrucción del dímero de la proteína gp16. Se muestran los tres modelos iniciales (a la izquierda de la figura) y el modelo reconstruido con el programa Refine de EMAN a partir de cada modelo inicial. En morado se representa el modelo inicial “ruido 1” y las vistas del modelo obtenido a partir de éste. En azul el modelo inicial “esferoide” y las vistas del modelo obtenido. En amarillo el modelo inicial “ruido 2” y las vistas del modelo obtenido. Los tres modelos reconstruidos presentan forma rectangular, por lo que se representan primero las 4 vistas laterales y a la derecha de la figura, las vistas frontales de cada modelo.

Los tres modelos presentaban tamaño y características similares, con una masa central con forma rectangular, de la que sobresale una protrusión o brazo. A pesar de que no se aplicó simetría en la reconstrucción, se puede observar un eje de simetría C2 que divide a los volúmenes en dos masas de tamaño similar. De los tres modelos, se eligió el modelo procedente del modelo inicial “ruido 1” para su posterior refinamiento con el programa Projection Matching de Xmipp, pues las proyecciones de este modelo (y sus imágenes medias asociadas) se ajustaban mejor a las imágenes medias libres de referencia promediadas con el programa CL2D de Xmipp (Fig. 4.24). Además, este modelo presentaba dos densidades bien distribuídas cuando se visualizaba a la talla correspondiente a un dímero con el programa Chimera (Fig. 4.24). El modelo final se refinó con Projection Matching de Xmipp y la resolución del mapa se determinó de acuerdo con el criterio FSC de 0,3 en 23 Å.

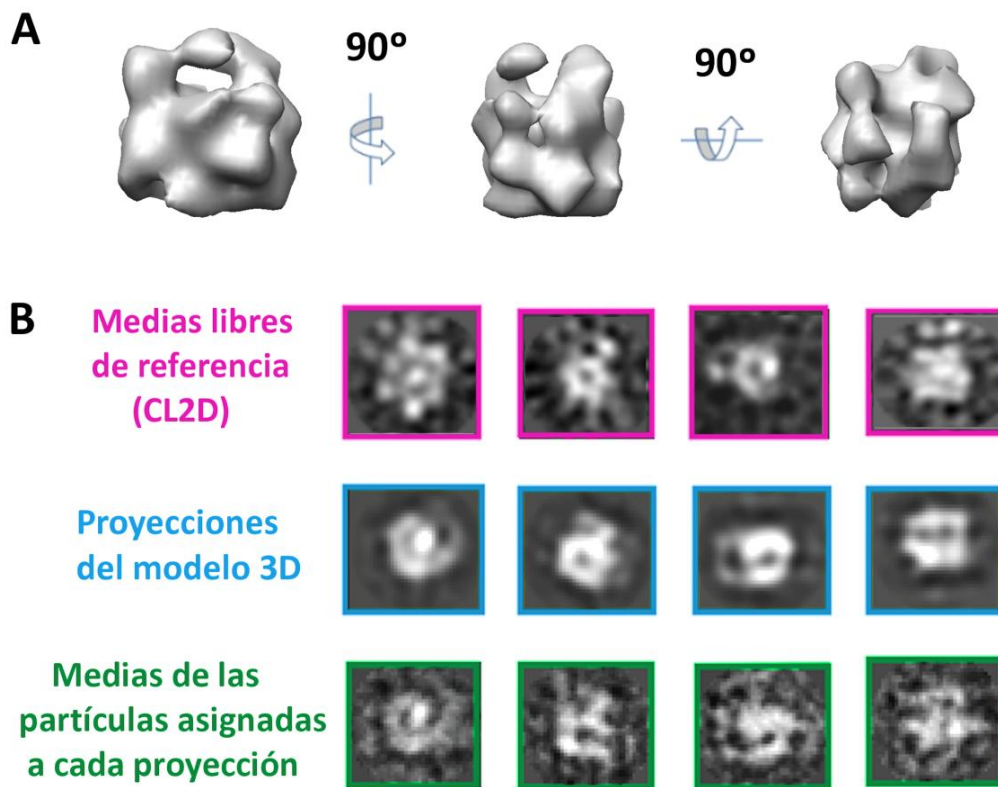


Figura 4.24: Reconstrucción del modelo 3D final del dímero de la proteína gp16. A) Se muestran las vistas características del volumen 3D del dímero de gp16 (lateral 1, lateral2 y frontal) refinado con el programa Projection Matching de Xmipp. B) Selección de vistas representativas procedentes de la clasificación bidimensional realizada con el programa CL2D de Xmipp así como selección de proyecciones y sus medias asociadas procedentes del modelo obtenido en la última ronda del refinamiento angular con el programa EMAN.

Como se vio en el apartado 4.4.2 de resultados, el extremo N-terminal de la proteína gp16 se localiza el dominio transglicosilasa y dicha región (130 primeros residuos) presenta homología estructural con la proteína Slt70 de *E.coli*. Del resto de la molécula no existe información atómica por lo que se decidió realizar un modelado por homología remota de la estructura terciaria utilizando el servidor Raptor X (Ma et al., 2013). El modelo obtenido con Raptor presenta una forma global de herradura y está compuesto por tramos de hélices- α antiparalelas, con el dominio N-terminal transglicosilasa unido al resto de la proteína por un lazo flexible de 113 aminoácidos. Está compuesto por 3 dominios. El primer dominio se corresponde con el dominio transglicosilasa y se construyó usando la estructura de la proteína

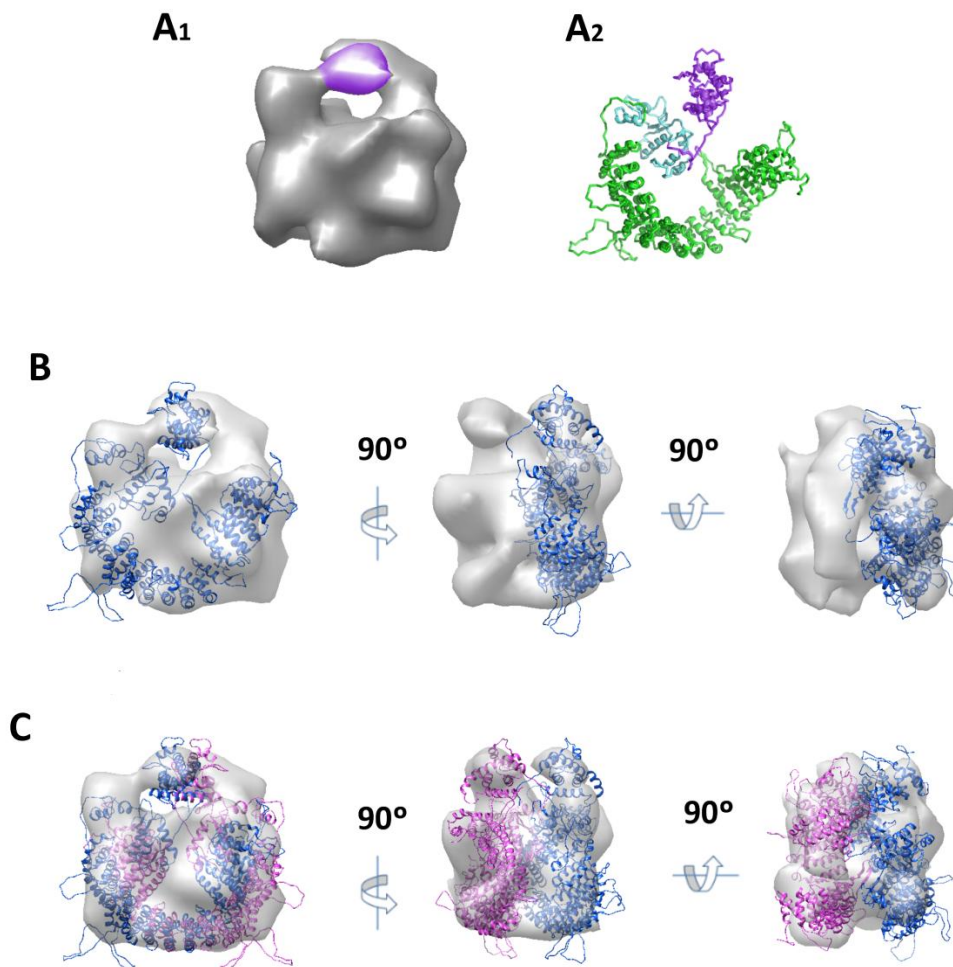


Figura 4.25 **Figura 4.24: Ajuste del modelo atómico predicho con Raptor X a nuestro modelo 3D de gp16 obtenido por ME.** A.1) Volumen final del dímero de gp16 obtenido por ME. Se ha coloreado en rojo la región propuesta como dominio N-terminal. A.2) Predicción del modelo atómico creado *de novo* con el servidor Raptor X. Con un círculo rojo señala el dominio transglicosilasa, con una flecha verde el dominio que emplea como molde la estructura de la proteína nitrato reductasa y con una flecha negra el dominio que utiliza la estructura de la proteína carioferina como referencia. B) Se muestran el ajuste de el modelo predicho con raptor en el volumen 3D final del dímero de gp16. C) Ajuste de dos unidades correspondientes a la predicción atómica de gp16 en nuestro volumen final del dímero

Slr70 como molde con un P-valor de $4,21 \cdot 10^{-5}$ (PDB 1qsaA; coloreado en morado en la figura 4.24 A.2). El segundo dominio, comprende desde el residuo 269 al 419 y se ha construido utilizando la proteína nitrato reductasa periplásmica (PDB 2jimA; coloreado en azul en la figura 4.24 A.2) con un P-valor de $4,72 \cdot 10^{-3}$. El tercer dominio se ha construido utilizando la estructura de la proteína carioferina (PDB 3w3zA; coloreado en verde en la figura 4.24 A.2) con un P-valor de $1,27 \cdot 10^{-6}$.

El P-valor se define como la probabilidad de que el modelo predicho sea peor que la mejor predicción de un conjunto de modelos generados al azar para esa proteína. Cuanto menor sea el P-valor, mayor será la calidad del modelo y en el caso de proteínas α -hélice, como lo es gp16, un P-valor inferior a 10^{-3} es un buen indicador, con lo que se puede estimar que la predicción de gp16 es de buena calidad.

El encaje del modelo atómico en el interior del modelo 3D generado por microscopía (ver apartado de métodos) mostraba que la densidad electrónica coincidía en tamaño y forma con el ajuste de dos moléculas de gp16, pudiendo proponer así un modelo atómico preliminar para el dímero de gp16. En este modelo los monómeros se encontrarían enfrentados de forma antiparalela (Fig. 4.24. C). Además, como se aprecia en la figura 4.24.A, el apéndice que protruye en cada una de las dos mitades de la reconstrucción del dímero, es semejante en cuanto a forma y dimensiones con el dominio transglucosilasa del modelo predicho con Raptor X. Así, se propone que en dicho apéndice podría localizarse el dominio transglucosilasa (coloreado en morado en la figura 4.24.A.).

4.4.6 Las proteínas recombinantes gp15 y gp16 interactúan *in vitro*.

Con el fin de estudiar si las proteínas gp15 y gp16 eran capaces de interactuar *in vitro* se incubaron ambas proteínas en una relación 1:1 durante 20 minutos a 30° C (ver apartado 3.2.3 de métodos) y se cargaron en una columna de filtración superosa 6 para tratar de aislar los complejos formados mediante cromatografía de exclusión molecular. Como se observa en la figura 4.25, en el cromatograma se observó un pico en los mililitros 13 y 14 que no se correspondía con los perfiles de migración de las proteínas gp15 y gp16 cargadas por separado en dicha columna (Fig. 4.25.A.1). Las fracciones cromatográficas se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes y se comprobó que las fracciones eluidas en los mililitros 13 y 14 contenían las proteínas gp15 y gp16 (Fig. 4.25.A.2). El análisis densitométrico del gel reveló que la relación molar entre las proteínas gp15 y gp16 era 2:1 (Fig 4.25 B.1). Esto explicaría por qué una fracción de la proteína gp16 no ha interactuado con gp15 y se ha eluido en el mililitro 15 (que es el patrón que presenta cuando se carga de forma individual en la columna de filtración superosa 6). Este resultado concuerda con la predicción

del estado de oligomerización de las proteínas del núcleo en el interior de la cabeza de T7, según la cual 8 unidades de gp15 interactúan con 4 unidades de gp16 (Agirrezabala et al., 2005). Sin embargo, cuando se observó al microscopio electrónico las fracciones que contenían las dos proteínas no se detectó ninguna partícula, pese a probar multitud de condiciones de preparación de la muestra. Puesto que la proteína gp16 purificada era inestable, se decidió someter a fijación química con glutaraldehído al 0,15% las fracciones procedentes de los mililitros 13 y 14 de la cromatografía (ver apartado 3.3.6 de métodos). Como se observa en la figura 4.25.B.2, el análisis electroforético de la proteína de la muestra fijada con glutaraldehído presenta una banda de una talla superior a los 250 KDa y no se detectan las formas monoméricas de gp15 y gp16. Esto confirma que ambas proteínas interactúan formando un complejo *in vitro*. Además, la observación de la muestra fijada mediante microscopía electrónica (Fig. 4.25.C) permitió detectar unas partículas de unos 20 nm de tamaño. Dichas partículas eran mayores que las partículas observadas en las micrografías de gp16 (Fig. 4.22), indicando nuevamente que se trataba de un complejo formado por ambas proteínas. El posterior estudio estructural de este complejo, junto con la información del modelo 3D del dímero de gp16, nos permitirá caracterizar estructuralmente la interacción entre gp15 y gp16.

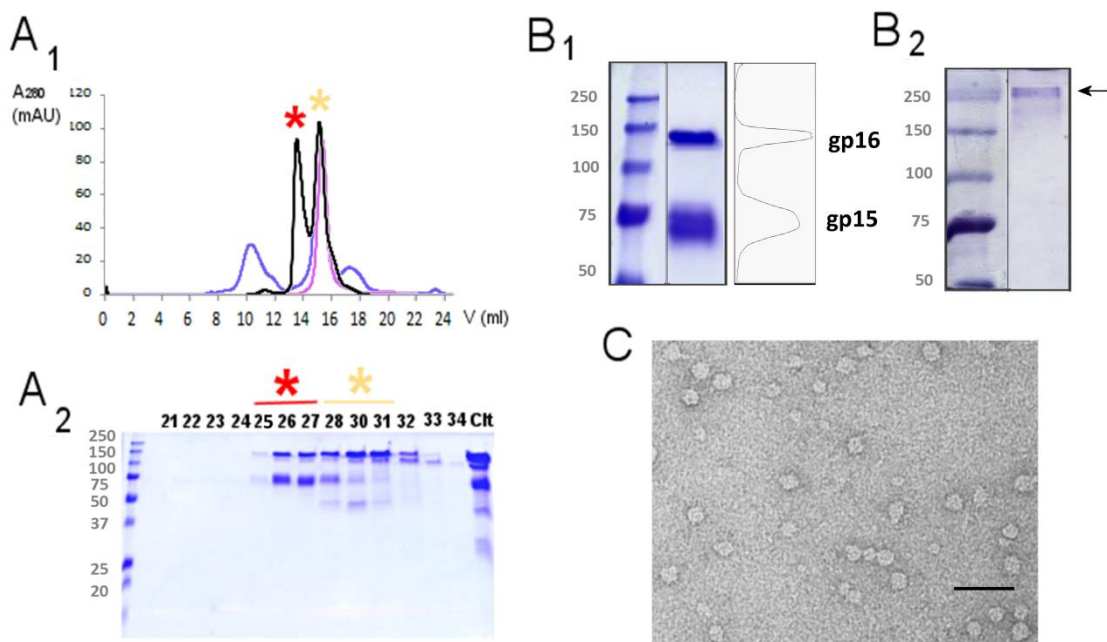


Figura 4.26: Purificación del complejo formado por gp15 y gp16. A) Cromatogramas de las filtraciones de exclusión molecular para gp15 (en morado), gp16 (en azul) y gp15 incubada con gp16 (en negro). Mediante un asterisco rojo se señala el pico correspondiente al complejo en el cromatograma y el el gel desnaturante de las fracciones cromatográficas (fracciones de 0,5 ml). El asterisco naranja indica el pico correspondiente a la proteína gp16 que no ha interactuado con gp15. B.1) Análisis densitométrico (con el programa Image J) del análisis electroforético del complejo formado por gp15 y gp16 purificado por cromatografía. B.2) Análisis electroforético del complejo purificado por cromatografía y fijado con glutaraldehído al 0,15 %. C) Micrografía electrónica del fijado con glutaraldehído al 0,15 %. La tinción se realizó con AcUr al 2% (p/v), las barras representan 50 nm.

Discusión

5.1. Reconocimiento del receptor.

5.1.1 El reconocimiento del receptor desencadena la unión irreversible del fago a la envuelta y la eyección completa de su genoma

5.1.2 Las porinas OmpA y OmpF de la membrana externa participan en la adsorción a la superficie bacteriana.

5.1.3 Los LPS de cepas *rough* de E.coli son el receptor del fago T7 y desencadenan la eyección del genoma *In vitro*.

5.2. Cambios estructurales observados en el virión T7 tras el reconocimiento del receptor.

5.2.1 : Las fibras cambian de orientación tras interactuar con los LPS de cepas *rough* y dicho cambio provoca la apertura del canal de la cola.

5.2.2 El complejo del núcleo no se localiza en el interior de la cabeza del fago T7 tras la eyección del genoma

5.3. Análisis de las proteínas recombinantes gp15 y gp16.

5.4. Modelo propuesto del mecanismo de infección del fago T7.

La mayoría de los bacteriófagos presentan una cola especializada en reconocer la superficie de su bacteria hospedadora y translocar el genoma viral al citoplasma bacteriano. Sin embargo, en función de la familia a la que pertenezcan, la morfología de la cola cambia considerablemente y la estrategia para internalizar su genoma también. Los fagos que pertenecen a la familia de los *Podoviridae* presentan una cola corta no contráctil y en el caso de aquellos que infectan bacterias Gram (-) , es incapaz de atravesar la envuelta bacteriana (Rakhuba et al.,2010). El mecanismo de infección por el cual estos fagos internalizan su genoma es todavía desconocido, aunque se ha propuesto que aquellos podovirus que presentan un núcleo proteico en el interior de la cabeza lo eyectan junto con el ADN, tras el reconocimiento de su receptor (épsilon 15, T7, K1E, P-SSP, etc) (Jiang et al., 2006; Chang et al., 2010; Hu et al.2013). Dicho núcleo proteico extendería la cola formando un canal que comunicaría la membrana externa con la membrana interna.

La identificación de los LPS de cepas *rough* de *E. coli* como receptor del fago T7 nos ha permitido caracterizar la eyección de su genoma *in vitro*. Así mismo, mediante criomicroscopía electrónica, se ha llevado a cabo un estudio estructural de la cola de los fagos que han eyectado su genoma. El clonaje y la expresión de las proteínas del núcleo proteico nos ha permitido constatar la flexibilidad y versatilidad conformacional de este complejo.

Con la información recogida en la presente investigación se ha propuesto un modelo para explicar el inicio de la infección del fago T7 en la cepa *E. coli*.

5.1.1. Reconocimiento del receptor

5.1.1 El reconocimiento del receptor desencadena la unión irreversible del fago a la envuelta y la eyección completa del genoma.

En nuestros experimentos de adsorción de fagos T7 a envueltas purificadas de *E. coli* BL21, se vió que aquellos viriones que se adsorbían a las envueltas y eyectaban su genoma, permanecían irreversiblemente unidos a las mismas. En ningún caso se detectaron fagos que eyectasen parcialmente su genoma ni por microscopía electrónica ni por ensayos de protección de ADN frente a la digestión por DNasa I (apartado 4.1.1 de resultados). Este resultado difiere de los estudios de eyección con bacterias completas publicados por García y Molinaux (García y Molineux, 1995). Dichos autores inactivaron la ARN polimerasa de bacterias *E. coli* K-12 con rifampicina y vieron que tras incubarlas 150 minutos con fagos T7, éstos sólo internalizaban una parte su genoma (entre 10 y 30 Kb del total de 40Kb). El prolongado tiempo de eyección de los fagos T7 incubados con las envueltas bacterianas (unos 120 minutos para detectar eyección en más de la mitad de la población viral) podría

relacionarse con la ausencia de transcripción, ya que estas muestras carecen de los componentes citoplasmáticos. Otra posible explicación para el incremento del tiempo de eyección sería que la cantidad de receptores bacterianos presente en las envueltas purificadas fuera insuficiente para el total de virus cargados en las reacciones de adsorción. Por otra parte, el mantenimiento del potencial de membrana citoplasmática parece ser un requisito necesario para la internalización del genoma de T7 (Zimkus et al., 1986; Molinaux 200, Hu et al, 2013). En nuestros experimentos, las envueltas no cuentan con la maquinaria bacteriana para generar energía por lo que el equilibrio de iones entre las membranas estará probablemente alterado, pudiendo afectar a la demora en el tiempo de eyección observada.

El estudio de la adsorción de T7 a las envueltas purificadas de *E. coli* BL21 nos sugiere que una vez se desencadena el mecanismo de eyección, el proceso es irreversible y no requiere la participación de la maquinaria celular para completarse en ausencia de presión citoplasmática. Esta hipótesis ha sido corroborada posteriormente con nuestros experimentos de eyección del genoma de T7 *in vitro* en presencia de LPS *rough* de *E. coli*.

5.1.2 Las porinas OmpA y OmpF de la membrana externa participan en la adsorción a la superficie bacteriana.

Existen numerosos casos en los que se ha comprobado que proteínas de la membrana externa actúan como receptor para fagos que infectan bacterias Gram (-) (apartado 1.2.1.2 de introducción). Puesto que las envueltas purificadas contenían el receptor de T7 responsable de desencadenar la apertura del canal de la cola, se decidió analizar el contenido proteico de dichas envueltas con el fin de identificar el receptor. Para ello se llevó a cabo un ensayo de interacción (VOPBA) entre los fagos T7 y las proteínas de las envueltas. Así se detectó que las proteínas OmpA y OmpF interaccionaban específicamente con el fago T7 (apartado 4.1.2 de resultados). Para caracterizar esta interacción se estudió la infección de T7 en un mutante de *E. coli* BL21 carente en OmpA, OmpF y OmpC y como control se estudió la infección de T7 en *E. coli* BL21 (DE3). Se analizó la morfología de las placas de lisis, la proporción de fagos adsorbidos mediante microscopía electrónica y se trazaron las curvas de crecimiento de T7 para ambas cepas. En todos los experimentos se observó un retraso en la infección de la cepa mutante y una menor proporción de fagos adheridos. Estos datos sugieren que OmpA y OmpF intervienen en la adsorción del fago T7 a la envuelta. No obstante, estas proteínas no constituyen el receptor de T7, puesto que en nuestros experimentos los fagos T7 podían infectar con éxito a la cepa mutante sin OmpA y OmpF.

Una posible explicación para la interacción de T7 con OmpA y OmpF observada es que los LPS regulan la correcta presentación de estas proteínas en la membrana externa. Los LPS mantienen estrechas interacciones con ambas proteínas, a nivel de su núcleo glucídico (Beher y Schnaitman, 1981; Sen y Nikaido, 1991). Dicha región es candidata a ser reconocida por las fibras de T7 (Quimron, 2006). La interacción de los LPS con las porinas podría dejar más accesible el núcleo de glucídico de los LPS, de modo que estas proteínas podrían facilitar el reconocimiento de los LPS.

Por otra parte, un estudio reciente de Zhao y colaboradores ha revelado que el podovirus Yep-phi (perteneciente al grupo del fago T7) reconoce específicamente a las proteínas de la membrana externa Ail y OmpF (Zhao et al., 2013). Al igual que T7, las fibras de este fago reconocen a los LPS de cepas *rough* de *E. coli*, pero además interaccionan con las mencionadas proteínas. Así mismo, en el citado estudio se realizaron ensayos de infectividad con mutantes para ambas proteínas. Los fagos Yep-phi eran capaces de infectar las cepas mutantes, aunque se observó una reducción notable de la infección en el doble mutante. La similitud entre las secuencias que codifican para las fibras de T7 y Yep-phi (un 38% de identidad para la proteína completa) induce a pensar que las fibras de T7 podrían interaccionar igualmente de forma específica con las proteínas OmpA y OmpF (Fig 5.1).

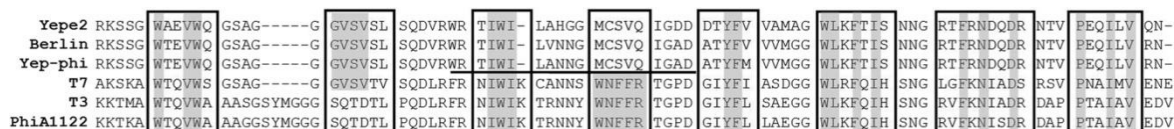


Figura 5.1: Alineamiento múltiple de secuencias para el extremo C-terminal de la fibra de Yep-phi y sus proteínas homólogas en fagos del grupo de T7. Las regiones de lámina β están señaladas por cajas y los residuos que presentan identidad se representan en gris. La secuencia señalada por una barra horizontal corresponde con la región de la fibra implicada en la interacción con las porinas OmpF y Ail. Figura reproducida de Zhao et al., 2013).

5.1.3 Los LPS de cepas *rough* de *E. coli* son el receptor del fago T7 y desencadenan la eyección del genoma *in vitro*.

A finales de los años 60, Michael apuntó que los LPS purificados de *E. coli* B tenían la capacidad de neutralizar a los fagos T7 y T3 (Michael, 1968) y unos años más tarde Lindberg indicó que T7 infectaba a cepas *rough* de *E. coli* (Lindberg, 1973). Sin embargo, a principios de los 2000 la tendencia era a considerar que los LPS actuaban como receptor primario, mediando una unión reversible a la superficie bacteriana y que la unión a otro receptor no identificado desencadenaría la eyección del genoma viral (Molineux, 2001). Sin embargo, en nuestros experimentos de eyección *in vitro* con LPS *rough* de *E. coli* DH100 hemos

demostrado que los LPS actúan como receptor único para el fago T7 y son responsables de mediar tanto la adsorción reversible inicial como desencadenar la cascada de cambios conformacionales que conducen a la eyección del genoma (apartado 4.2.1 de resultados).

El estudio de los fagos T7 adsorbidos a los LPS de *E. coli* DH100 mediante microscopía electrónica nos ha permitido observar que los fagos se asocian a los polímeros de LPS por medio de sus fibras y que, cuando las fibras cambian de conformación, se produce la eyección del genoma (ver figura 4.8.C de resultados). Además, los fagos que fueron incubados con LPS *smooth* de *E. coli* O111: B4 (con antígeno O) no interaccionaron con dichos LPS ni eyectaron su genoma, lo que sugiere que fibras permiten reconocer el serotipo correcto.

Por otra parte, en los experimentos de protección de ADN mediante digestión con DNasa I se vio que la eyección del genoma era completa, sin la participación de una fuente de energía externa. (apartado 4.2.1 de resultados). Los análisis cinéticos de la eyección mediante fluorescencia confirmaron que la liberación del genoma era un proceso unidireccional y continuo en ausencia de presión citoplasmática. Además, en estos experimentos se pudo estimar la constante de apertura del canal de la cola, en condiciones saturantes de receptor ($K_{\text{apertura}} \approx 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Dicha constante nos da una idea de la velocidad del proceso cuando existe exceso de receptor y nos permite comparar las cinéticas de eyección entre diferentes virus. La constante del fago T7 es muy similar a la del fago P22 ($4,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) que también utiliza LPS de la membrana externa como receptor (Andres et al., 2012). Sin embargo, el fago P22 reconoce el antígeno O de los LPS de *Salmonella typhimurium* y lo hidroliza a través de sus fibras, que presentan actividad ramnosidasa. Los siphovirus N9A y T5 presentan en cambio constantes muy superiores ($1,6 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) que reflejan el menor tiempo requerido para la apertura del canal de la cola y la eyección del genoma. Tanto el fago T7 como el fago P22 presentan proteínas en el interior de la cabeza relacionadas con la infección. Estas proteínas podrían ser eyectadas junto con el ADN a través de la cola, para asistir la internalización del genoma en la infección. La salida de estas proteínas junto al ADN viral podría explicar el retardo en la cinética de apertura respecto de los siphovirus N9A y T5.

5.2. Cambios estructurales observados en el virión T7 tras el reconocimiento de su receptor.

5.2.1 : Las fibras cambian de orientación tras interactuar con los LPS de cepas *rough* y dicho cambio provoca la apertura del canal de la cola.

La determinación de la estructura tridimensional de la conformación abierta de la cola mediante crió-microscopía electrónica nos ha permitido caracterizar los cambios conformacionales que conducen a la eyección del genoma tras el reconocimiento del receptor.

El modelo tridimensional para las partículas infectivas de T7 resuelto en nuestro laboratorio (Agirrezabala et al., 2005) revela que podría existir una válvula en el conducto de la cola que retuviera al ADN en el interior de la cabeza (ver figura 4.12.B.1 de resultados). Dicha válvula se localizaría en la región de contacto del hexámero de gp12 con el adaptador, que a su vez es la región donde se encajan las fibras (Cuervo et al., 2013a). En el modelo presentado para la cola abierta, las fibras han cambiado de orientación y el canal de la cola se observa completamente abierto (ver figura 4.12 de resultados). El cambio conformacional en la orientación de las fibras se aprecia mejor comparando nuestro modelo con el modelo de la cola cerrada resuelto recientemente por nuestro grupo (Cuervo et al., 2013a). La región proximal de las fibras gira 30 grados respecto al eje longitudinal de la cola y adopta una disposición perpendicular en dicho eje.

El cambio en la orientación de las fibras tras el reconocimiento del receptor también se ha descrito para los fagos epsilon 15 y P-SSP7, cuya estructura fue también resuelta mediante microscopía electrónica (Chang et al., 2010; Liu et al. 2010). Analizando los modelos 3D de estos fagos, se aprecia que el primer fragmento de ADN en ser translocado discurre por el canal que va desde el complejo del núcleo hasta la región de contacto entre el adaptador y el conducto de la cola (Fig. 5.5. A-D). Esto indica que también podrían presentar una válvula de cierre en dicha región que impediría que dicho fragmento se extendiera por todo el canal. El cambio en la orientación de las fibras podría ser el responsable de la apertura de la válvula. Una vez abierta, el ADN contenido en esa región probablemente se extenderá por todo el canal de la cola, impulsado por la elevada presión en el interior de la cabeza. Posiblemente este movimiento del extremo iniciador del ADN sea el responsable del cambio conformacional observado en las proteínas del conducto que conduce a la salida del ADN por el extremo apical de la cola. El análisis comparativo entre la proteína del conducto de estos virus con la gp12 del fago T7 llevado a cabo en nuestro laboratorio, revela una homología estructural entre las

proteínas del conducto para los fagos del grupo T7 (Fig. 5.5.C; Cuervo et al., 2013b) lo que induce a pensar que el mecanismo de eyección será también semejante.

El diámetro de la apertura del canal en la conformación abierta del fago T7 (40 Å) permitiría el paso del ADN junto a las proteínas desplegadas del núcleo proteico. No obstante, los datos actuales no permiten determinar si tales proteínas saldrían desplegadas junto con el ADN o si de alguna forma llegarían a eyectarse antes de la salida del ADN, para la formación del canal que extiende la cola.

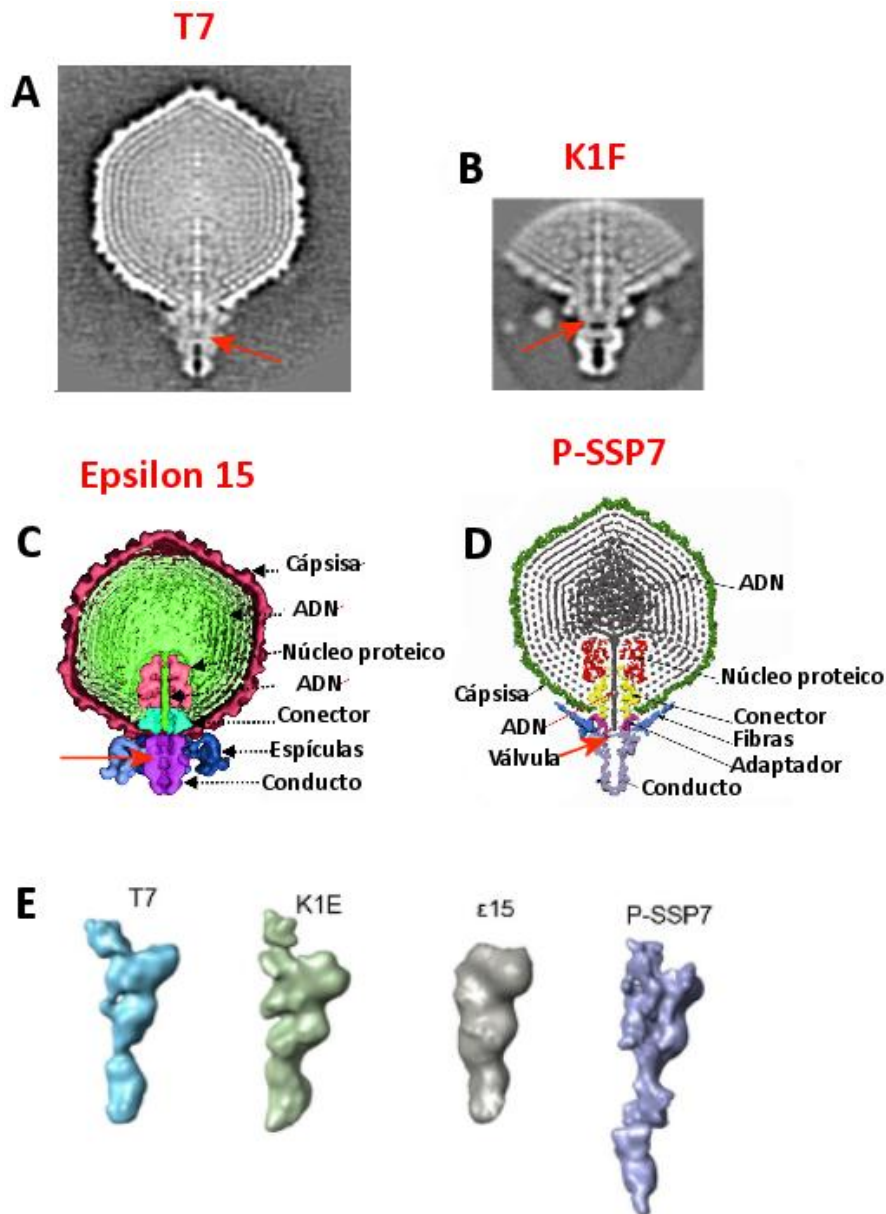


Figura 5.2: Cola de fagos del grupo T7. A ,B,C y D) Secciones transversales de las reconstrucciones de los fagos T7, K1F, épsilon 15 y P-SSP7 respectivamente, en las que se visualiza la posible válvula del conducto de la cola (señalada por una flecha roja). Las secciones fueron extraídas de la base de datos PDB en el caso de A y B. Las figuras C y D han sido modificadas de Jiang et al. (2006) y de Chang et al. (2010). E) Monómeros que constituyen el conducto de la cola en diferentes fagos del grupo T7. Figura procedente de Cuervo et al. (2013b).

5.2.2 El complejo del núcleo no se localiza en el interior de la cabeza del fago T7 tras la eyección del genoma.

Tanto en el caso de los fagos incubados con las envueltas purificadas de *E. coli* BL21 como aquellos incubados con los LPS de *E. coli* EH100, una vez los viriones eyectan el ADN, no se detecta el complejo proteico del núcleo en el interior de la cabeza mediante microscopía electrónica. Así mismo, en el análisis electroforético de los fagos incubados durante 3 h con los LPS no se detectaron las proteínas del núcleo ni las proteínas 6.7 y 7.3, mientras que el resto de las proteínas estructurales permanecían intactas (ver figuras 4.13 y 4.14 de resultados).

Como se menciona en la introducción (apartado 1.3.2.1), el complejo del núcleo proteico experimenta un cambio conformacional drástico tras el empaquetamiento del genoma durante la morfogénesis de T7 (Fig. 5.3). En el interior de la cabeza madura, adopta una conformación en anillos coaxiales que se asemeja a la estructura de otras proteínas que se unen al ADN o que forman poros en las membranas celulares (Kelman et al., 1995; Goodsell y Olson, 2000). Estos anillos presentan diferente orden de simetría (Agirrezabala, X., et al. 2005). El desajuste en el orden de simetría de los anillos puede facilitar que las interacciones entre las proteínas del núcleo y el conector no sean muy estables, lo que facilitaría la desorganización del complejo del núcleo durante la translocación del ADN. Las interacciones entre oligómeros que presentan el mismo orden de simetría son mucho más estables (Goodsell y Olson, 2000). Prueba de ello es que el conector (simetría dodecamérica) permanece asociado con las proteínas de la cola (simetría hexamérica) cuando se rompen los virus con el tratamiento de calor y EDTA (ver figura 4.9).

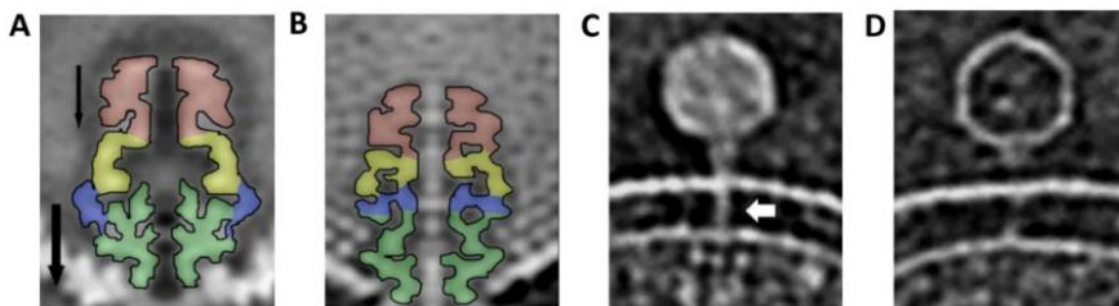


Figura 5.3: El complejo del núcleo de T7 adopta conformaciones muy diferentes. A y B) Secciones transversales de las reconstrucciones de la precabeza y la cabeza madura de T7 en las que se visualiza el vértice donde se ancla el conector. Las proteínas del complejo del núcleo se han coloreado en azul, amarillo y rojo, correspondiendo a gp14, gp15 y gp16 respectivamente. Imagen extraída de Agirrezabala et al. (2005). C y D) Secciones de tomograma de virus infectando minicélulas de *E. coli*. Una estructura tubular aparece extendiendo la cola (C) y dicha estructura no se visualiza pasado un tiempo (D). Se ha propuesto que dicha estructura se corresponde con el complejo del núcleo. Imagen adaptada de Hu et al.(2013)

Existen otros ejemplos de podovirus con una estructura semejante en el interior de la cabeza (fig 5.4). En todos ellos la longitud del complejo del núcleo asociado al conector es similar ($\approx 300\text{\AA}$) y el ADN viral se encuentra enrollado alrededor de estas estructuras. En el caso del podovirus P22 es el dominio C-terminal del conector el que forma una estructura tubular del interior de la cabeza madura (Olia et al., 2011). Olia y colaboradores relacionan este dominio del conector de P22 con el complejo del núcleo visto en otros podovirus. Sugieren que dicho dominio podría servir para contener el extremo iniciador del ADN, que es el primero en ser eyectado. Este dominio tubular estaría además relacionado con la forma en la que el ADN se ordena en el interior de la cabeza, así como con la eyección del mismo en la infección. Recientemente Serwer y Jiang han rescatado una hipótesis propuesta anteriormente por Hendrix (Hendrix, 1978) en la que la energía asociada al empaquetamiento activo del ADN al interior de la cabeza se almacena en forma de energía potencial. Esta energía estaría disponible por tanto para impulsar el movimiento del ADN y del complejo del núcleo durante la translocación del genoma en la infección (Serwer y Jiang, 2012). En la eyección también parece tener un papel fundamental la distribución de las moléculas de agua en el interior de la cabeza viral. Estudios mediante microscopía de fuerzas atómicas en el fago $\phi 29$ revelan que las cápsidas virales liberan el ADN como respuesta a una deshidratación ultra rápida provocada mediante un sistema de vacío (Carrasco et al., 2009).

Como se menciona en la introducción, Hu ha demostrado que tras el cambio conformacional de las fibras, aparece una estructura tubular que extiende la cola del fago T7 a través de la envuelta bacteriana. Dicha estructura parece estar formada por las proteínas del núcleo interno, pues éstas ya no se localizan en el interior de la cabeza tras la eyección. Además ha señalado que tras la internalización del genoma, dicha estructura se desensambla; probablemente para impedir que se disipe el potencial de membrana y preservar así la integridad celular (Hu et al., 2013). Por otra parte, mediante fraccionamiento celular de

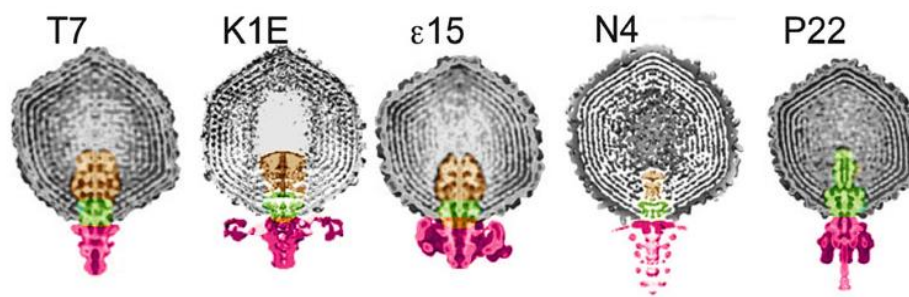


Figura 5.4: Ejemplo de podovirus con una estructura tubular en el interior de la cabeza: Se muestran las secciones transversales de 5 modelos 3D de podovirus reconstruidos por criomicroscopía electrónica. El complejo del núcleo se representa en naranja, el conector en verde y el complejo de la cola en rosa. Figura modificada de Casjens y Molineux (2012).

bacterias *E. coli* infectadas con T7, Chang y colaboradores localizaron la proteína gp14 del núcleo en la membrana externa y las proteínas gp15 y gp16 en el espacio periplásmico, lo que sustenta la hipótesis de la eyección del núcleo proteico durante la infección (Chang et al., 2010).

Existen ejemplos de otros fagos pertenecientes al grupo de T7 cuyo núcleo proteico tampoco se localiza en la cabeza viral tras la eyección de su genoma. Mediante tomografía electrónica Chang y colaboradores demostraron que una estructura tubular extiende la cola de epsilon 15 durante la infección. Al mismo tiempo, el complejo del núcleo deja de localizarse en el interior de la cabeza (Chang et al., 2010). El fago P-SSP7 constituye otro ejemplo de podovirus en el que se ha observado el mismo fenómeno (Liu et al., 2010).

5.3. Análisis de las proteínas recombinantes gp15 y gp16.

Tanto gp15 como gp16 han sido propuestas por Chang C., como responsables de la conducción del ADN al citoplasma bacteriano (Chang C. et al., 2010). El análisis bioinformático de la estructura secundaria de estas proteínas revela que están constituidas por hélices- α y bucles desordenados alternativamente, lo que las confiere una gran flexibilidad. Esto podría favorecer el desplegamiento de las proteínas y su posterior reordenación en el espacio periplásmico, para formar un sistema transportador del ADN viral a través de la envuelta. De hecho, en la predicción bioinformática con el programa DNABindR realizada en este trabajo, gp15 es una proteína de unión al ADN (apartado 4.4.2 de resultados). Esto explicaría por qué se observa protección frente a la digestión del ADN de T7 con *Bst*BI cuando incubamos la reacción en presencia de gp15, lo que sugiere una interacción entre dicha proteína del núcleo y el ADN de T7 (apartado 4.4.3.1 de resultados).

La proteína gp15 expresada *in vitro* es termoestable, sin embargo la proteína gp16 recombinante tiende a asociarse a las membranas de diálisis en los pasos de purificación y no es estable a temperatura ambiente (ver apartado 4.4.3.1 de resultados). Esta inestabilidad de la proteína podría estar relacionada con el desensamblaje de la estructura tubular tras la eyección del ADN de T7 observada por Hu, pues la proteína gp16 recombinante purificada presenta actividad transglicosilasa y una talla acorde con su masa molecular en los análisis electroforéticos (≈ 144 KDa), lo que nos lleva a pensar que ha sido correctamente expresada y purificada. Los diferentes estados oligoméricos detectados con el análisis GraFix para la proteína gp16 (Fig. 4.22 de resultados) ilustran la variabilidad conformacional de las proteínas del núcleo. Tanto las predicciones bioinformáticas para gp15 como nuestros datos bioquímicos apuntan a que es una proteína muy soluble en medio acuoso (ver figura 4.15 y apartado 4.4.3.1 de resultados). Por contra, una parte de la proteína gp 16 expresada *in vitro* se localiza

en la fracción membranosa (ver gel de la figura 4.15.A), y es necesario añadir detergente (N-dodecil-maltósido) para su purificación. Además, el análisis bioinformático de gp16 con el programa WHAT 2.0 predice que presenta una región transmembrana en el extremo C-terminal (en la secuencia que va desde el residuo 1100 hasta el 1250).

El análisis de la estructura de la proteína gp16 recombinante mediante ME revela que presenta un apéndice unido a una masa de forma rectangular (Fig 4.23 de resultados). El encaje de la estructura atómica modelada *de novo* con el servidor Raptor X, nos permite proponer que dicho apéndice se corresponde con el dominio transglicosilasa presente en el extremo N-terminal de la proteína. La actividad transglicosilasa de gp16 es esencial para explicar cómo se produce la translocación del ADN a través de la envuelta. Las colas de los Caudovirales son demasiado gruesas como para atravesar las envueltas bacterianas a través de los canales de las proteínas embebidas en las membranas, por lo que para internalizar su genoma, es necesario que establezcan un sistema transportador propio que conecte la cola viral con la membrana citoplasmática bacteriana. Para ello han de degradar el peptidoglicano de la pared.

Se han identificado proteínas implicadas en la infección con actividad transglicosilasa en las tres familias de Caudovirales. Así por ejemplo, el trímero de la proteína gp5 del fago T4, presente en la placa basal de la cola, presenta un dominio tipo lisozima para degradar el peptidoglicano de la pared bacteriana (Kanamaru et al., 2002; Letellier et al., 2004). La actividad transglicosilasa también se encuentra en las propias bacterias, pues para llevar a cabo procesos como la división celular o la inserción de estructuras que atraviesan la envuelta (flagelos, sistemas transportadores, etc) han de degradar parcialmente la rígida capa de peptidoglicano (Scheurwater et al., 2008). Esto hace pensar que los fagos han adquirido los genes que codifican para proteínas con actividad transglicosilasa por transferencia genética horizontal procedentes de las bacterias hospedadoras, del mismo modo que se han relacionado las colas de los myovirus y siphovirus con los sistemas transportadores bacterianos (ver apartado 1.2.2.2.2 de introducción). De hecho, como se menciona en el apartado 4.4.2 de resultados, la bacteria *Pseudomonas* sp. R81 presenta una transglicosilasa que alinea en un 98% de la secuencia (con un 42% de identidad) con la proteína gp16 del fago T7.

Por otra parte, el apéndice del modelo 3D del dímero de gp16 es la región que más varía en los tres modelos iniciales obtenidos durante el procesamiento, lo que indicaría que dicha región es flexible. Esto sería coherente con la predicción del modelo atómico, donde el dominio transglicosilasa está conectado por un largo lazo al resto de la molécula. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas que codifican para la proteína gp16 del T7 y de otros podovirus relacionados (Fig. 4.17) permite detectar que la región de la secuencia que

codifica para el dominio transglicosilasa es la menos conservada. En nuestra predicción del modelo atómico, la región correspondiente a la parte más conservada de la secuencia que codifica para gp16 está formada por helices- α antiparalelas que se ordenan dando una estructura con forma global de herradura. Dicha estructura la hemos asociado con la densidad más estable de nuestro modelo, que es además compatible en cuando a dimensiones con dicha región de la predicción.

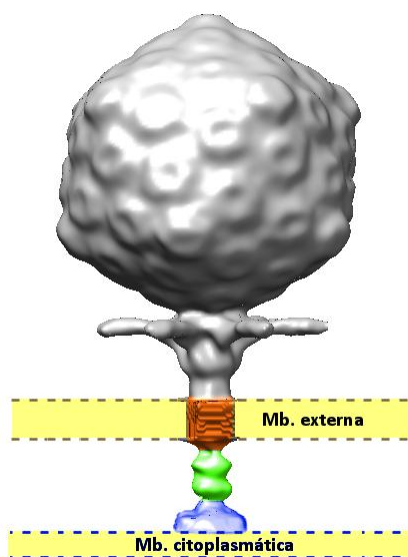


Figura 5.5: Posible localización de las proteínas gp15 y gp16 en el espacio periplásmico tras la eyección. Se muestra el mapa 3D del fago T7 con la cola extendida resuelto mediante tomografía electrónica por Hu y colaboradores (Hu et al., 2013). Se ha segmentado en azul la región que podría corresponder con gp16, en verde la región que podría corresponder con gp15 y en naranja se indica la posible localización de gp14 en la membrana plasmática.

Por último, las proteínas gp15 y gp16 expresadas *in vitro* no oligomerizan formando anillos de orden de simetría 8 y 4 como está propuesto que hacen en el interior de la cabeza de partículas virales infectivas (Agirrezabala et al., 2005). Sin embargo, tras la incubación de éstas proteínas a temperatura ambiente, hemos podido detectar un complejo formado por ambas proteínas en una relación 2:1 (ver figura 4.25 de resultados). Esto nos induce a pensar que podrían existir interacciones entre las proteínas gp15 y gp16 que podrían tener relación con las diferentes conformaciones observadas del complejo del núcleo y que, de hecho, sería la interacción de ambas proteínas entre sí lo que definiría las estructuras más complejas encontradas en el núcleo viral y/o en el canal de eyección del ADN.

Puesto que el pH del tampón en el que se purificó el complejo es el mismo que el pH del espacio periplásmico de *E. coli* (pH 7.5-7.6), podemos suponer que este complejo presentará una conformación más similar a la que adoptarían las proteínas del núcleo en el espacio periplásmico, si se confirmase que extienden la cola durante la translocación del genoma. Al mismo tiempo,

el hecho de que haya que fijar el complejo de gp15 y gp16 con glutaraldehído para su estabilización (ver apartado 4.4.5 de resultados) sugiere que dicho complejo es transitorio. Esto podría estar relacionado con la inestabilidad de la proteína gp16 anteriormente comentada. No se descarta que en la estabilización del complejo formado por gp15 y gp16 puedan participar otras proteínas, como la gp14 del núcleo proteico o la proteína 6.7, cuya localización se desconoce, aunque ha sido propuesta como de la cabeza de T7 y está relacionada con la eficacia de la infección (Kemp et al., 2005).

De confirmarse que el complejo del núcleo extiende la cola tras la infección, podríamos sugerir que la proteína gp16 se localizaría en contacto con la membrana citoplasmática junto con gp15, puesto que hemos demostrado que ambas proteínas son capaces de interactuar *in vitro* y hemos predicho un dominio transmembrana para la proteína gp16 (Fig 5.4). Así se respetarían las interacciones entre los diferentes oligómeros del complejo del núcleo que se dan en la cabeza de las partículas infectivas. Tras el reconocimiento de los LPS y el cambio conformacional en las fibras, las proteínas del núcleo se eyectarían. La proteína gp14 contactaría con el conducto de la cola en la membrana externa y con la proteína gp15. Dicha proteína gp15 se localizaría en el espacio periplásmico y gp16 se dispondría en contacto con gp15 y con la membrana citoplasmática. Esto explicaría por qué una parte de la proteína gp16 expresada *in vitro* se localiza en la fracción membranosa (ver gel de la figura 4.15.A), mientras que gp15 es completamente soluble.

5.4. Modelo propuesto del mecanismo de infección del fago T7.

Pese a la gran variedad de estrategias para la infección viral que se ha mencionado en la introducción para los fagos que pertenecen a las tres familias de Caudovirales, existen características comunes a todos ellos. El reconocimiento específico de un receptor en la superficie de la bacteria receptora desencadena una cascada de cambios conformacionales en las proteínas del complejo de la cola, que se traducen en la apertura del canal interno al mismo tiempo que se establece una conexión entre el extremo apical de la cola y la membrana citoplasmática bacteriana para la internalización del genoma viral. Los resultados presentados en esta tesis doctoral nos permiten definir la secuencia de pasos necesaria para que el fago T7 internalice su genoma en el citoplasma de cepas *rough* de *E. coli*.

Mediante el estudio de adsorción de T7 a envueltas purificadas de *E. coli* se han detectado las diferentes orientaciones con las que los fagos contactan con la superficie bacteriana, en la adsorción reversible e irreversible (Fig. 5.6.A y B). Los análisis de eyección *in vitro* nos han permitido caracterizar la velocidad del proceso en ausencia de presión citoplasmática (Fig 5.6.C) y comparar la cinética de la eyección con la de otros fagos para los que existen referencias bibliográficas. Así, hemos podido confirmar que las diferencias en las colas de las tres familias de Caudovirales determinan diferentes cinéticas y por tanto mecanismos, de eyección del genoma viral. Los análisis bioquímicos de las proteínas del complejo del núcleo apoyan la hipótesis de que gp15 y gp16 sean eyectadas junto con el ADN y formen un complejo en el espacio periplásmico. Por último, la resolución de la estructura de la cola de las partículas que han eyectado su genoma mediante crío-microscopía electrónica nos

ha permitido indentificar los cambios conformacionales que se producen en las proteínas de la cola para que tenga lugar la eyección (Fig 5.6.D).

Con la información recogida en los análisis mencionados, hemos elaborado un modelo detallado para la infección del bacteriófago T7, que se describe a continuación:

Primero, los fagos T7 se adsorben reversiblemente a la membrana externa por medio de sus fibras, que se disponen alrededor de la cabeza viral. Las proteínas OmpA y OmpF de la membrana externa son reconocidas por los fagos T7 e intervienen en esta primera fase de adsorción reversible. A continuación se da el reconocimiento de los LPS por parte de alguna de las fibras de T7. Dicho reconocimiento hace que la fibra quede anclada por su extremo C-terminal a la membrana externa. El cambio se transmitirá hasta la región proximal de la fibra, en contacto con el conducto de la cola. Cuando todas las fibras cambien de conformación, a consecuencia de su interacción con los LPS, la válvula del conducto de la cola se abrirá. Este cambio de conformación se debe transmitir al extremo apical de la cola, que se abrirá permitiendo la salida del ADN. Las proteínas del núcleo serán eyectadas y participarán en la conducción del ADN al citoplasma bacteriano. Seguidamente, el genoma viral será traducido por la ARN polimerasa bacteriana y por la ARN polimerasa viral, una vez sea expresada por la bacteria. El ciclo infectivo continuará con la replicación del genoma y la morfogénesis de la progenie viral.

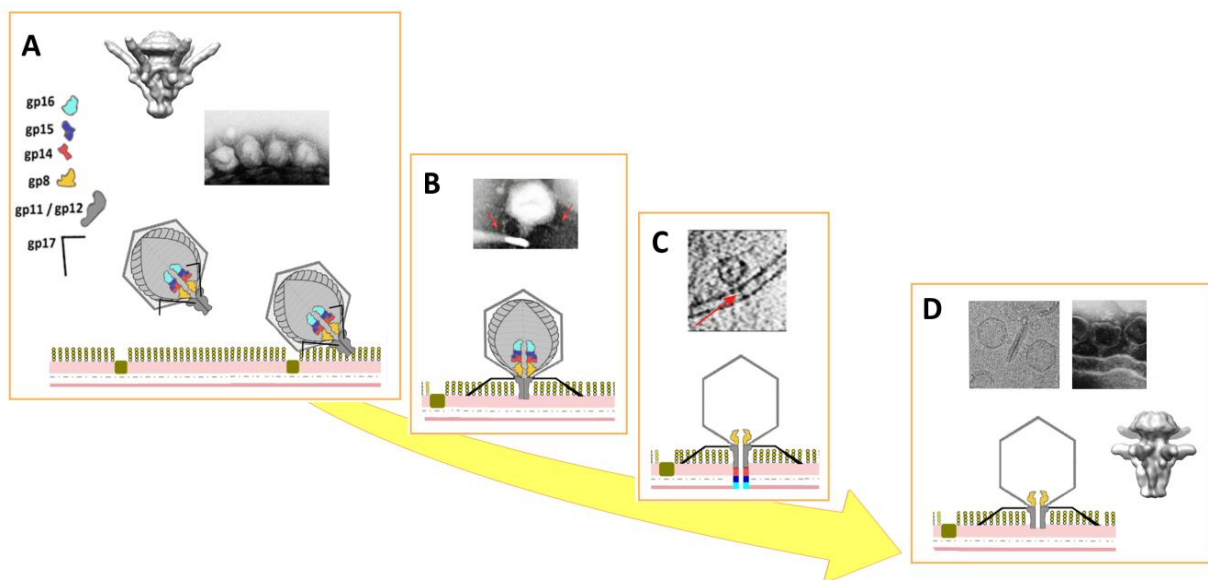


Figura 5.6: Modelo propuesto para la infección del fago T7. A) El fago T7 se adsorbe primero de forma reversible a la superficie bacteriana en busca de su receptor, proceso en el que participan las proteínas OmpA y OmpF. **B)** una vez que sus 6 fibras interactúan con los LPS de la membrana externa, la adsorción es irreversible y se desencadenan los cambios conformacionales responsables de la apertura del canal de la cola y la eyección del genoma viral. **C)** El complejo del núcleo es eyectado para mediar la internalización del genoma en el citoplasma. **D)** El resto de la partícula viral permanece adsorbida a la superficie bacteriana tras la eyección de su genoma. En cada recuadro se muestra la información que hemos obtenido mediante microscopía electrónica para cada etapa.

Conclusiones

1. La caracterización de los componentes proteicos y lipídicos bacterianos implicados en la infección de T7 mostró que las proteínas OmpA y OmpF de la membrana externa están implicadas en la adsorción a la superficie bacteriana y que los LPS de cepas *rough* actúan como receptor para el fago T7 desencadenando la eyección del genoma *in vitro*. El dominio de reconocimiento de los LPS se localiza en las fibras del complejo de la cola de T7.
2. En ausencia de presión citoplasmática, la eyección del genoma de T7 es un proceso continuo y unidireccional que presenta similitudes con los mecanismos de eyección de otros sistemas virales.
3. El núcleo proteico desaparece en virus que han eyectado su genoma tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto implica que las proteínas del núcleo proteico deben translocarse a lo largo del canal de la cola. El análisis bioinformático y estructural de las proteínas gp15 y gp16 confirma una flexibilidad estructural para dichas proteínas consistente con esta hipótesis.
4. Las proteínas gp15 y gp16 purificadas son capaces de formar complejos *in vitro*; asimismo su caracterización bioquímica mostró que gp15 era capaz de interactuar con el ADN y que gp16 conservaba su actividad transglicosilasa, indicando que las proteínas purificadas se encontraban en su conformación nativa.
5. En ausencia de otros componentes virales gp16 se ensambla formando dímeros. El modelo atómico generado sugiere que los monómeros, con forma de herradura, interactuarían a través del dominio C-terminal y que el dominio N-terminal (con actividad transglicosilasa) se encontraría unido al mismo a través de una región flexible.
6. La reconstrucción tridimensional del complejo de la cola antes y después de la eyección del genoma permite su comparación y revela un cambio drástico en la disposición de las fibras y un cambio conformacional en las proteínas gp12 del conducto que conduce a la apertura del canal interno. El canal tiene un diámetro medio de 40 Å, por lo que podría acomodar al ADN viral junto a las proteínas deslegadas del complejo del núcleo.

Bibliografía

Ackermann, H.-W. (2009). Phage Classification and Characterization. Bacteriophages. M. J. Clokie and A. Kropinski, Humana Press. **501**: 127-140.

Ackermann, H. W. (2007). "Bacteriophages: Tailed." eLS.

Adams, M. H. (1959) "Bacteriophages". Interscience Publishers, Inc., N. Y., Appendix, p. 473 ff.

Agirrezabala, X., Velázquez-Muriel, J. A., Gómez-Puertas, P., Scheres, S. H., Carazo, J. M., & Carrascosa, J. L. (2007). "Quasi-atomic model of bacteriophage t7 procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold". Structure, **15 (4)**: 461-472.

Agirrezabala, X., et al. (2005). "Maturation of phage T7 involves structural modification of both shell and inner core components." The EMBO journal **24(21)**: 3820-3829.

Agirrezabala, X., et al. (2005). "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(5)**: 895-902.

Andres, D., Roske, Y., Doering, C., Heinemann, U., Seckler, R., & Barbirz, S. (2012). "Tail morphology controls DNA release in two Salmonella phages with one lipopolysaccharide receptor recognition system". Molecular microbiology, **83(6)**: 1244-1253.

Bamford, D. H., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2005). "What does structure tell us about virus evolution?" Current opinion in structural biology **15(6)**: 655-663.

Basak, S., Turner, H., & Parr, S. (1994). "Identification of a 40-to 42-kDa attachment polypeptide for canine parvovirus in A72 cells". Virology, **205(1)**: 7-16.

Bebeacua, C., Bron, P., Lai, L., Vegge, C. S., Brøndsted, L., Spinelli, S., ... & Cambillau, C. (2010). Structure and molecular assignment of lactococcal phage TP901-1 baseplate. Journal of biological chemistry **285(50)**: 39079-39086.

Behr, M. G., & Schnaitman, C. A. (1981). "Regulation of the OmpA outer membrane protein of *Escherichia coli*". Journal of bacteriology, **147(3)**: 972-985.

Brahmbhatt, H., & Macdiarmid, J. (2010). European Patent No. EP 1636344. Munich, Germany: European Patent Office.

Braun, V., Sieglin, U.(1970). "The covalent murein-lipoprotein structure of the *Escherichia coli* cell wall. The attachment site of the lipoprotein on the murein". Eur. J. Biochem. **13**: 336-346.

Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W. D. (2004). "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion." Microbiology and Molecular Biology Reviews **68(3)**: 560-602.

Carrasco, C., Douas, M., Miranda, R., Castellanos, M., Serena, P. A., Carrascosa, J. L., ... & de Pablo, P. J. (2009). "The capillarity of nanometric water menisci confined inside closed-geometry viral cages". Proceedings of the National Academy of Sciences, **106(14)**: 5475-5480.

Casjens, S. R. (2005). "Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages." Current opinion in microbiology **8(4)**: 451-458.

Casjens, S. R. and I.J. Molineux (2012). Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses. Viral Molecular Machines, Springer: 143-179.

Castón, J. R. (2013). "Conventional Electron Microscopy, Cryo-Electron Microscopy and Cryo-Electron Tomography of Viruses". In Structure and Physics of Viruses (pp. **79-115**). Springer Netherlands.

Cerritelli, M. E., Conway, J. F., Cheng, N., Trus, B. L., & Steven, A. C. (2003). "Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment." Advances in protein chemistry **64**: 301-323.

Cerritelli, M. E., Trus, B. L., Smith, C. S., Cheng, N., Conway, J. F., & Steven, A. C. (2003). "A second symmetry mismatch at the portal vertex of bacteriophage T7: 8-fold symmetry in the procapsid core." Journal of molecular biology **327(1)**: 1-6.

Chang, C. Y., Kemp, P., & Molineux, I. J. (2010). "Gp15 and gp16 cooperate in translocating bacteriophage T7 DNA into the infected cell." Virology **398(2)**: 176-186.

Chang, J. T., Schmid, M. F., Haase-Pettingell, C., Weigele, P. R., King, J. A., & Chiu, W. (2010). "Visualizing the Structural Changes of Bacteriophage Epsilon15 and Its Salmonella Host during Infection." Journal of molecular biology **402(4)**: 731-740.

Chang, J., Liu, X., Rochat, R. H., Baker, M. L., & Chiu, W. (2012). "Reconstructing virus structures from nanometer to near-atomic resolutions with cryo-electron microscopy and tomography." Adv Exp Med Biol **726**: 49-90.

Cuervo A, Chagoyen M, Pulido-Cid M, Camacho A, Carrascosa JL.(2013). "Structural characterization of T7 tail machinery reveals a conserved tubular structure among other *Podoviridae* family members and suggests a common mechanism for DNA delivery". Bacteriophage. 3:e27011; <http://dx.doi.org/10.4161/bact.27011>

Cuervo, A., Pulido-Cid, M., Chagoyen, M., Arranz, R., González-García, V. A., Garcia-Doval, C., ... & Carrascosa, J. L. (2013). "Structural characterization of the bacteriophage T7 tail machinery". Journal of Biological Chemistry, **288(36)**: 26290-26299.

Cuervo, A. and J. L. Carrascosa (2012). "Bacteriophages: structure." eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. UK

Davidson, A. R., Cardarelli, L., Pell, L. G., Radford, D. R., & Maxwell, K. L. (2012). Long noncontractile tail machines of bacteriophages. Viral Molecular Machines, Springer: 115-142.

Desmyter, A., Farenc, C., Mahony, J., Spinelli, S., Bebeacua, C., Blangy, S., ... & Cambillau, C. (2013). "Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies." Proceedings of the National Academy of Sciences **110(15)**: E1371-E1379.

Estrela, A. I., Pooley, H. M., de Lencastre, H., & Karamata, D. (1991). "Genetic and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* 168 mutants specifically blocked in the synthesis of the teichoic acid poly (3-O- β -d-glucopyranosyl-N-acetylgalactosamine 1-phosphate): gneA, a new locus, is associated with UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase activity." Journal of general microbiology **137(4)**: 943-950.

Feige, U. and S. Stirm (1976). "On the structure of the *Escherichia coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its ϕ X174 receptor region." Biochemical and biophysical research communications **71(2)**: 566-573.

Fernandez, J. J., Luque, D., Caston, J. R., & Carrascosa, J. L. (2008). "Sharpening high resolution information in single particle electron cryomicroscopy." J Struct Biol **164(1)**: 170-175.

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., & Leith, A. (1996). "SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields." J Struct Biol **116(1)**: 190-199.

García-Doval, C. and M. J. van Raaij (2012). "Structure of the receptor-binding carboxy-terminal domain of bacteriophage T7 tail fibers." Proceedings of the National Academy of Sciences **109(24)**: 9390-9395.

García, L.R., and Molineux, I.J. (1996) "Transcription-independent DNA translocation of bacteriophage T7 DNA into *Escherichia coli*". J Bacteriol **178**: 6921-6929.

Geller, B. L., Ivey, R. G., Trempy, J. E., & Hettinger-Smith, B. A. R. B. A. R. A. (1993). "Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2." Journal of bacteriology **175(17)**: 5510-5519.

German, G. J. and R. Misra (2001). "The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage." Journal of molecular biology **308(4)**: 579-585.

Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2000). "Structural symmetry and protein function". Annual review of biophysics and biomolecular structure, **29(1)**, 105-153.

Gómez-Moreno, C., & Sancho Sanz, J. (2003). Estructura de proteínas. *Barcelona*: Ariel Ciencia.

Guo, F., Liu, Z., Vago, F., Ren, Y., Wu, W., Wright, E. T., ... & Jiang, W. (2013). "Visualization of uncorrelated, tandem symmetry mismatches in the internal genome packaging apparatus of bacteriophage T7". Proceedings of the National Academy of Sciences, **110(17)**: 6811-6816.

- Hendrix, R. W. (1978). "Symmetry mismatch and DNA packaging in large bacteriophages". Proceedings of the National Academy of Sciences, **75(10)**: 4779-4783.
- Heller, K. and V. Braun (1982). "Polymannose O-antigens of Escherichia coli, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers." Journal of virology**41(1)**: 222-227.
- Heller, K. J. and H. Schwarz (1985). "Irreversible binding to the receptor of bacteriophages T5 and BF23 does not occur with the tip of the tail." Journal of bacteriology **162(2)**: 621-625.
- Heymann, J. B. and D. M. Belnap (2007). "Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy." J Struct Biol **157(1)**: 3-18.
- Hirons, G. T., Fawcett, J. J., & Crissman, H. A. (1994). "TOTO and YOYO: new very bright fluorochromes for DNA content analyses by flow cytometry". Cytometry **15(2)**: 129-140.
- Ho, T. D. and J. M. Slauch (2001). "OmpC is the receptor for Gifsy-1 and Gifsy-2 bacteriophages of Salmonella." Journal of bacteriology **183(4)**: 1495-1498.
- Hu, B., Margolin, W., Molineux, I. J., & Liu, J. (2013). "The bacteriophage t7 virion undergoes extensive structural remodeling during infection." Science **339(6119)**: 576-579.
- Jacobson, E. D. and O. E. Landman (1977). "Adsorption of bacteriophages phi 29 and 22a to protoplasts of Bacillus subtilis 168." Journal of virology **21(3)**: 1223-1227.
- Jiang, W., Chang, J., Jakana, J., Weigele, P., King, J., & Chiu, W.(2006). "Structure of epsilon15 bacteriophage reveals genome organization and DNA packaging/injection apparatus". Nature, **439 (7076)**: 612-616.
- Jonic, S., & Vénien-Bryan, C. (2009)." Protein structure determination by electron cryo-microscopy". Current opinion in pharmacology.**9(5)**: 636-642.
- Kanamaru, S. (2009). "Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**:4067–4068.
- Kanamaru, S., P.G. Leiman, V.A. Kostyuchenko, P.R. Chipman, V.V. Mesyanzhinov, F. Arisaka & M.G.Rossmann. (2002) "Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4". Nature **415**: 553-557
- Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server". Nature protocols, **4(3)**, 363-371.

Kelman Z, Finkelstein J, O'Donnell M.(1995). "Why have six-fold symmetry?" Curr.Biol. **5**: 1239–42

Kemp, P., Garcia, L. R., & Molineux, I. J. (2005). "Changes in bacteriophage T7 virion structure at the initiation of infection." Virology **340**(2): 307-317.

Kleinschmidt, J. H. (2006). "Folding kinetics of the outer membrane proteins OmpA and FomA into phospholipid bilayers." Chemistry and physics of lipids **141**(1): 30-47.

Koraimann, G. (2003). "Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **60**(11): 2371-2388.

Koudelka, K. J., Rae, C. S., Gonzalez, M. J., & Manchester, M. (2007). "Interaction between a 54-kilodalton mammalian cell surface protein and cowpea mosaic virus". Journal of virology, **81**(4): 1632-1640.

Kremer Jr, Mastronarde Dn, McIntosh Jr (1996) "Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD". J Struct Biol, **116**: 71-76.

Krupovič, M. and D. H. Bamford (2010). "Order to the viral universe." Journal of virology **84** (24): 12476-12479.

Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., & Pelletier, J. (2006). "Comparative genomic analysis of 18 Pseudomonas aeruginosa bacteriophages". Journal of bacteriology **188**(3): 1184-1187.

Leiman, P. G., & Shneider, M. M. (2012). "Contractile tail machines of bacteriophages". In Viral Molecular Machines (pp. 93-114). Springer US.

Leiman, P. G., Arisaka, F., van Raaij, M. J., Kostyuchenko, V. A., Aksyuk, A. A., Kanamaru, S., & Rossmann, M. G. (2010). "Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers." Virology journal **7**(1): 355.

Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., ... & Mekalanos, J. J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**:4154–4159.

Leiman, P. G., Battisti, A. J., Bowman, V. D., Stummeyer, K., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., ... & Molineux, I. J. (2007). "The structures of bacteriophages K1E and K1-5 explain processive degradation of polysaccharide capsules and evolution of new host specificities." Journal of molecular biology **371**(3): 836-849.

Letellier, L., Plancon, L., & Boulanger, P. (2007). "Transfer of DNA from phage to host." Bacteriophage: genetics and molecular biology: 1209.

Letellier, L., Boulanger, P., Plançon, L., Jacquot, P., & Santamaria, M. (2004). "Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake." Frontiers in bioscience: a journal and virtual library **9**: 1228.

Lin, T. Y., Lo, Y. H., Tseng, P. W., Chang, S. F., Lin, Y. T., & Chen, T. S. (2012). "A T3 and T7 recombinant phage acquires efficient adsorption and a broader host range". PLoS one **7(2)**: e30954.

Lindberg, A. A. (1973). "Bacteriophage receptors." Annual Reviews in Microbiology **27(1)**: 205-241.

Liu, X., Zhang, Q., Murata, K., Baker, M. L., Sullivan, M. B., Fu, C., & Chiu, W. (2010). "Structural changes in a marine podovirus associated with release of its genome into *Prochlorococcus*". Nature structural & molecular biology **17(7)**, 830-836.

Luque, D., González, J. M., Garriga, D., Ghabrial, S. A., Havens, W. M., Trus, B., ... & Castón, J. R. (2010). "The T=1 capsid protein of *Penicillium chrysogenum* virus is formed by a repeated helix-rich core indicative of gene duplication." J Virol **84(14)**: 7256-7266.

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.

Ma, J., Wang, S., Zhao, F., & Xu, J. (2013). "Protein threading using context-specific alignment potential". Bioinformatics, **29(13)**: i257-i265.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). "Brock Biology of microorganisms 12th edn." International Microbiology **11**: 65-73.

Mindell, J. A. and N. Grigorieff (2003). "Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy." J Struct Biol **142(3)**: 334-347.

Michael, J. G. (1968). "The surface antigens and phage receptors in *Escherichia coli* B". In Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY) **128 (2)**: 434-438.

Miroux B, Walker JE. (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels". J Mol Biol. **260(3)**:289-298.

Moak, M., & Molineux, I. J. (2004). "Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions". Molecular microbiology, **51(4)**: 1169-1183.

Moak, M., & Molineux, I. J. (2000). "Role of the Gp16 lytic transglycosylase motif in bacteriophage T7 virions at the initiation of infection". Molecular microbiology, **37(2)**: 345-355.

Molineux, I. J. and D. Panja (2013). "Popping the cork: mechanisms of phage genome ejection." Nature Reviews Microbiology. **11(3)**:194-204

Molineux, I. J. (2001). "No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven." Molecular microbiology **40(1)**: 1-8.

Mosig, G. and F. Eiserling (2006). "T4 and related phages: structure and development." The bacteriophages. 225-267.

Nakasu, S., Fujisawa, H., & Minagawa, T. (1985). "Purification of characterization of gene 8 product of bacteriophage T3." Virology **143(2)**: 422-434.

Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." Microbiology and Molecular Biology Reviews **67(4)**: 593-656.

Oliveira, L., Alonso, J. C., & Tavares, P. (2005). "A Defined n Vitro System for DNA Packaging by the Bacteriophage SPP1: Insights into the Headful Packaging Mechanism". Journal of molecular biology, **353(3)**: 529-539.

Orlova, E. V. (2012). Bacteriophages and Their Structural Organisation. Bacteriophages. D. I. Kurtboke: 3-30.

Orlova, E. V. and H. R. Saibil (2011). "Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy." Chemical reviews **111(12)**: 7710-7748.

Perez, G. L., Huynh, B., Slater, M., & Maloy, S. (2009). "Transport of phage P22 DNA across the cytoplasmic membrane." Journal of bacteriology **191(1)**: 135-140.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25(13)**: 1605-1612.

Puig, A., Araujo, R., Jofre, J., & Frias-Lopez, J. (2001). "Identification of cell wall proteins of *Bacteroides fragilis* to which bacteriophage B40-8 binds specifically". Microbiology, **147 (2)**: 281-288.

Prilipov A., Phale P.S. , Van Gelder P., Rosenbusch J.P, Koebnik R. (1998). "Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*". FEMS Microbiology Letters **163**: 65-72

Qiao, X., Qiao, J., Onodera, S., & Mindich, L. (2000). "Characterization of ϕ 13, a bacteriophage related to ϕ 6 and containing three dsRNA genomic segments." Virology **275(1)**: 218-224.

Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D., & Russel, M. (2011). "Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications". Current issues in molecular biology, **13(2)**: 51.

Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). "Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell". Pol. J. Microbiol, **59**: 145-155.

Roeder, G.S., Sadowski, P.D., 1977. "Bacteriophage T7 morphogenesis: phage-related particles in cells infected with wild-type and mutant T7 phage". Virology **76**: 263–285.

Romantschuk, M. and D. H. Bamford (1985). "Function of Pili in Bacteriophage ϕ 6 Penetration." Journal of general virology **66(11)**: 2461-2469.

Rossmann, M. G., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., & Leiman, P. G. (2004). "The bacteriophage T4 DNA injection machine". Current opinion in structural biology **14(2)**: 171-180.

Rost, B.; Yachdav, G.; and Liu, J. (2004) "The PredictProtein server". Nucleic Acids Res, 32

Ryter, A., Shuman, H. & Schwartz, M. (1975). "Intergration of the receptor for bacteriophage lambda in the outer membrane of Escherichia coli: coupling with cell division." Journal of bacteriology **122(1)**: 295-301.

Sambrook, J., Russell, D. ., & Russell, D. W. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual". (3-volume set).

Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). "Revenge of the phages: defeating bacterial defences." Nature Reviews Microbiology. **11(10)**: 675-687

São-José, C., Baptista, C., & Santos, M. A. (2004). "Bacillus subtilis operon encoding a membrane receptor for bacteriophage SPP1." Journal of bacteriology **186(24)**: 8337-8346.

Saxton, W. O., & Baumeister, W. (1982)." The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. Journal of Microscopy **127(2)**: 127-138.

Scheres, S. H., Núñez-Ramírez, R., Sorzano, C. O., Carazo, J. M., & Marabini, R. (2008). "Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP." Nat Protoc **3(6)**: 977-990.

Scheurwater, E., Reid, C. W., & Clarke, A. J. (2008). "Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins". The international journal of biochemistry & cell biology **40(4)**: 586-591.

Sen, K., & Nikaido, H. (1991). "Lipopolysaccharide structure required for in vitro trimerization of Escherichia coli OmpF porin". Journal of bacteriology **173(2)**: 926-928.

Serwer, P., & Jiang, W.(2012)." Dualities in the analysis of phage DNA packaging motors". Bacteriophage, **2(4)**: 7-6.

Serwer, P. (1976). "Internal proteins of bacteriophage T7." J Mol Biol **107**(3): 271-291.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Higgins, D. G. (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega". Molecular systems biology **7**(1)

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**(5): a000414.

Sorzano, C. O. S., Marabini, R., Velázquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J. R., Scheres, S. H., Carazo, J. M., & Pascual-Montano, A. (2004). "XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy." J Struct Biol **148**(2): 194-204.

Steinbacher, S., Baxa, U., Miller, S., Weintraub, A., Seckler, R., & Huber, R. (1996). "Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with Salmonella sp. O-antigen receptors". Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(20): 10584-10588.

Steven, A. C., & Trus, B. L. (1986). "The structure of bacteriophage T7". Electron microscopy of proteins, (5): 1-35.

Steven, A. C., Trus, B. L., Maizel, J. V., Unser, M., Parry, D. A. D., Wall, J. S., ... & Studier, F. W. (1988). "Molecular substructure of a viral receptor-recognition protein: The gp17 tail-fiber of bacteriophage T7." Journal of molecular biology **200**(2): 351-365.

Steven, A., & Belnap, D. (2005). "Electron microscopy and image processing: an essential tool for structural analysis of macromolecules". Current Protocols in Protein Science **17-2**.

Sun, L., Young, L. N., Zhang, X., Boudko, S. P., Fokine, A., Zbornik, E. & Fane, B. A. (2014). "Icosahedral bacteriophage [Phi] X174 forms a tail for DNA transport during infection". Nature **505**(7483): 432-435.

Tatusova, T. A., & Madden, T. L. (1999). "BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences". FEMS microbiology letters,174(2), 247-250.

Traurig, M. and R. Misra (1999). "Identification of bacteriophage K20 binding regions of OmpF and lipopolysaccharide in Escherichia coli K-12." FEMS microbiology letters **181**(1): 101-108.

Valpuesta, J. M. and J. L. Carrascosa (1994). "Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging." Quarterly reviews of biophysics **27**: 107-107.

van Duin, J. (1988). Single-stranded RNA bacteriophages. The bacteriophages, Springer: 117-167.

van Heel, M. and M. Schatz (2005). "Fourier shell correlation threshold criteria." J Struct Biol **151**(3): 250-262.

- Veesler, D. and C. Cambillau (2011). "A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries." Microbiology and Molecular Biology Reviews **75(3)**: 423-433.
- Vinga, I., Sao-jose, C., Tavares, P., & Santos, M. A. (2006). "Bacteriophage entry in the host cell." Modern Bacteriophage Biology and Biotechnology, Wegrzyn G (ed), pp 165–203.
- Wang, H. H., Isaacs, F. J., Carr, P. A., Sun, Z. Z., Xu, G., Forest, C. R., & Church, G. M. (2009). "Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution". Nature **460(7257)**: 894-898.
- Webster, R. (1996). "Biology of the filamentous bacteriophage". Academic Press, New York 1-20.
- Wendlinger, G., Loessner, M. J., & Scherer, S. (1996). "Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself." Microbiology **142(4)**: 985-992.
- Wietzorrek, A., Schwarz, H., Herrmann, C., & Braun, V. (2006). "The genome of the novel phage Rtp, with a rosette-like tail tip, is homologous to the genome of phage T1." Journal of bacteriology **188(4)**: 1419-1436.
- Williams, R. C., & Fisher, H. W. (1970). "Electron microscopy of tobacco mosaic virus under conditions of minimal beam exposure". Journal of molecular biology, **52(1)**: 121-123.
- Xiang, Y., & Rossmann, M. G. (2011). Structure of bacteriophage ϕ 29 head fibers has a supercoiled triple repeating helix-turn-helix motif. Proceedings of the National Academy of Sciences, **108(12)**: 4806-4810.
- Yan, C., Terribilini, M., Wu, F., Jernigan, R. L., Dobbs, D., & Honavar, V. (2006). "Predicting DNA-binding sites of proteins from amino acid sequence". BMC bioinformatics, **7(1)**: 262.
- Young, F. (1967). "Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **58(6)**: 2377.
- Yu, F. & Mizushima, S. (1982). "Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4". Journal of bacteriology, **151(2)**: 718-722.
- Yu, F., Yamada, H., & Mizushima, S. (1981). "Role of lipopolysaccharide in the receptor function for bacteriophage T4 in *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **148(2)**: 712-715.
- Zhai, Y., & Saier, M. H. (2001) "A web-based program (WHAT) for the simultaneous prediction of hydropathy, amphipathicity, secondary structure and transmembrane topology for a single protein sequence". Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, **3(4)**: 501-502.

Zhao, X., Cui, Y., Yan, Y., Du, Z., Tan, Y., Yang, H., ... & Yang, R. (2013). "Outer membrane proteins Ail and OmpF of *Yersinia pestis* are involved in the adsorption of T7-related bacteriophage Yep-phi". Journal of virology **87(22)**: 12260-12269.

Zimkus, A.Z., Zavriev, S.K., and Grinius, L.L. (1986) "Role of ATP and membrane potential in phage T7 penetration into cell". Mol Biol (Moscow) **20**: 155-160.