VISUALIZACIÓN MEDIANTE EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS DEL CONECTOR DEL BACTERIÓFAGO ₱ 29 SUMERGIDO EN SOLUCIÓN

Vélez M,¹ Carrascosa JL,² Müller DJ^{3,4} y Engel A³

¹Laboratorio de Bajas Temperaturas C-III, Departamento Física de la Materia Condensada y ²Centro Nacional de Biotecnologia, CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Madrid, España.
³M.E.Müller-Institute for Microscopic Structural Biology, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland.
⁴Forschungszentrum Jülich, IBI-2: Structural Biology, D-52425 Jülich, Germany.

Introducción

El ensamblaje de los virus bacteriófagos requiere que los distintos componentes estructurales del mismo interaccionen de forma secuencial y específica. En este complejo proceso, las proteínas que forman la región que conecta la cabeza con la cola del virus (conectores) participan activamente en el ensamblaje de las procabezas y, posteriormente, en el reconocimiento y empaquetamiento del DNA viral dentro de la cabeza del fago (1).

La microscopia electrónica ha permitido obtener amplia información estructural sobre el conector del bacteriófago Φ29 (2, 3). Sin embargo, las limitaciones técnicas de las reconstrucciones tridimensionales obtenidas por microscopia eléctronica no han permitido obtener información detallada sobre la topografía de la superficie del conector, a pesar de la importancia que esta información tendría para entender el proceso de interacción con DNA y los otros ligandos que participan en el proceso de reconocimiento y empaquetamiento de DNA. El microscopio de fuerzas atómicas operando en líquidos ha demostrado recientemente ser capaz de proporcionar imágenes topográficas con resolución subnanométrica de proteínas de membrana (4).





Figura 1. Topografía con alta resolución de la superficie de un cristal bidimensional de conectores de $\Phi 29$. Conectores visualizados aplicando una fuerza de 50-100 pN (a) y de 150 pN (b). Las barras equivalen a 50 nm. La escala de grises abarca un rango de 4 nm .

Hemos utilizado esta técnica para estudiar la superficie de cristales bidimensionales de conectores de Φ29 adsorbidos sobre mica. La nueva información estructural adquirida complementa la obtenida por crioelectromicroscopía.

Resultados

Se tomaron imágenes de la superficie de cristales bidimensionales de conectores adsorbidos firmemente sobre la superficie de mica y sumergidos en solución tampón (5).

En la imagen presentada en la Figura 1 pueden observarse los detalles estructurales de la superficie de cada conector. En las imágenes tomadas aplicando menor fuerza (Figura 1a) se distinguen claramente los extremos estrechos de los conectores sobresaliendo de la superficie del cristal. Sólo pueden observarse los detalles estructurales del extremo más ancho cuando imperfecciones del cristal (círculo blanco en la Figura 1a) permiten que la punta penetre hasta ellos. Si se aplica con la punta mayor fuerza se desplazan reversiblemente los extremos estrechos de los conectores y se distinguen entonces las doce subunidades y el orificio central de la base más ancha (Figura 1b).

Las imágenes obtenidas con microscopía de fuerzas confirman la localización de dos conectores por celda unidad orientados en direcciones opuestas, tal y como lo indica el grupo p42₁2 descrito anteriormente (3). Permiten también determinar que la altura mínima del conector es de 7,6 \pm 0,5 nm y estimar que la altura del extremo estrecho es de 5,0 \pm 0,6 nm mientras que la del extremo más ancho es de 2,6 \pm 0,6 nm. Se observa también que la forma del canal no es cilíndrica sino tronco-cónica. Otra información relevante obtenida es la vorticidad que presenta la superficie de las doce subunidades del extremo ancho del conector. Estos datos contribuyen a refinar el modelo tridimensional del conector existente (Figura 2c).

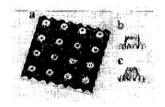


Figura 2. a) Vista en perspectiva de la imágen promediada y simetriza-da de la topografía del cristal del Φ29. La topografia se obtuvo a partir de promedios simetrizados del extremo estrecho y del extremo ancho del conector. La celda unidad (señalada por las cuatro esquinas blancas) mide 16,5 nm x 16,5 nm. b) Vista lateral de la reconstrucción tridimensional del conector obtenida a partir de imágenes inclinadas de cristales teñidos negativamente (adaptado de (2)) c) Vista lateral del modelo tridimensional obtenidos de los datos en b) después de combinar con la información obtenida con el microscopio de fuerzas atómicas.

- Valpuesta JM, Carrascosa JL. Structure of viral connectars and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. Quarf Rev. Biophys 1994;27:107.
- 2. Carazo JM, Donate LE, Herranz L, Secilla JP, Carrascosa JL. Three-dimensional reconstruction of the connector of bacteriophage of Ф29 at 1.8 nm resolution. J Mol Biol 1986; 192:853.
- Valpuesta JM, Carrascosa JL, Henderson R. Analysis of electron microscope images and electron diffraction patterns of thin crystals of Φ29 connectors in ice.
 J Mol Biol 1994;240:251.
- Schabert FA, Henn CK, Engel A. Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. Science 1995;268:92.
- 5. Mülier OJ, Engel A, Carrascosa JL, Vélez M. The bacteriophage Ф29 headtail connector imaged at high resolution with atomic force microscopy in buffer solution. EMBO J 1997;16(10):2547.