1. Introducció..... 1

1.1. La infecció vírica a Bacillus subtilis..... 3

1.2. El fag ϕ29..... 4
1.2.1. Organització genètica i transcripcional..... 5
1.2.1.1. Situació dels promotors en el mapa genètic..... 5
1.2.2. Funcionament general de la transcripció a ϕ29..... 7
1.2.2.1. Regulació transcripcional..... 8
1.2.2.2. Els llocs d'unió de p4..... 10
1.2.3. Control de la transcripció per la proteïna p4..... 11
1.2.3.1. Repressió del promotor primerenc A2b..... 11
1.2.3.2. Repressió del promotor primerenc A2c..... 12
1.2.3.3. Activació del promotor tardà A3..... 13
1.2.4. Regions comunes activen i reprimeixen promotors..... 14
1.2.5. La proteïna p6..... 15
1.2.5.1. Complex p6-nucleoproteïna..... 16
1.2.5.2. Implicacions funcionals del complex de nucleoproteïna... 18
1.2.6. Control de la transcripció pel complex p4-p6..... 19
1.2.6.1. Repressió del promotor A2b pel complex p4-p6..... 19
1.2.6.2. Repressió del promotor A2c pel complex p4-p6..... 20
1.2.6.3. Activació del promotor A3 pel complex p4-p6..... 21
1.2.7. Coexistència de 2 mecanismes de regulació in vivo..... 21

1.3. L'enzim RNA polimerasa..... 22
1.3.1. L'holoenzim..... 23
1.3.2. Les subunitats de l'RNA polimerasa..... 24
1.3.2.1. La subunitat α..... 24
1.3.2.2. Les subunitats β i β'..... 25
1.3.2.3. La subunitat ω..... 26
1.3.2.4. La subunitat σ..... 26
1.3.2.5. Funcions del factor σ..... 28
1.3.2.5.1. El domini σ1.1..... 28
1.3.2.5.2. El domini σ2..... 28

1.3.2.5.3. El domini σ3 i el loop σ3.2..... 29
1.3.2.5.4. El domini σ4..... 29
1.3.3. El camí de l'inici de la transcripció a l'elongació..... 29
1.3.3.1. El complex tancat..... 30
1.3.3.2. Passos intermedis..... 30
1.3.3.3. El complex obert..... 30
1.3.3.4. Escapament del promotor..... 31

1.4. Regulació de la transcripció..... 33
1.4.1. Elements que intervenen en la regulació de la transcripció..... 33
1.4.2. Reguladors de classe I: el domini carboxi-terminal de la subunitat α..... 33
1.4.3. Estructurra del complex DNA-CAP-αCTD..... 35

2. Objectius..... 37

3. Materials i Mètodes..... 41

3.1. Preparació de la mostra de proteïna..... 43
3.1.1. Expressió i purificació de la proteïna p4..... 43
3.1.2. Solubilització de la proteïna..... 43
3.1.3. Determinació de la concentració de proteïna..... 44

3.2. Preparació i purificació dels complexos de proteïna i DNA..... 44
3.2.1. Preparació dels complexos..... 45
3.2.2. Purificació dels complexos p4-DNA..... 45
3.2.3. Detecció dels complexos per SDS-PAGE..... 46
3.2.4. Determinació de la concentració de complex p4-DNA..... 47

3.3. Cristal·lització..... 47
3.3.1. Muntatge en crioloops, crioprotecció i congelació dels cristalls... 48
3.3.1.1. Harvesting: addició gradual de l'agent crioprotector... 49
3.3.2. Derivatització de la proteïna amb àtoms pesants..... 50

3.4. Recollida de les dades de difracció de raigs X..... 51

3.4.1. Procediment de recollida de dades..... 52
3.4.1.1. Experiment MAD: el cristall derivatitzat..... 52
3.4.1.2. Cristall de proteïna p4..... 53
3.4.1.3. Cristall del complex p4-DNA..... 53
3.4.2. Dany per radiació..... 54

3.5. Processament de les dades de difracció de raigs X..... 55
3.5.1. Indexació, integració i escalat..... 55
3.5.2. Indicadors de qualitat : els factors R i altres paràmetres..... 56
3.5.2.1. El Rsym..... 56
3.5.2.2. El Rmerge..... 57
3.5.2.3. La Completeness..... 57
3.5.2.4. La Multiplicitat..... 58

3.6. Resolució del problema de la fase..... 58
3.6.1. Resolució del problema de la fase utilitzant la dispersió anòmala: el mètode MAD..... 59
3.6.1.1. El programa SOLVE..... 60
3.6.1.2. Millora de les fases i modificació de la densitat electrònica ..60
3.6.1.3. Extensió de les fases..... 61
3.6.1.4. La simetria no cristal·logràfica..... 62
3.6.1.5. El programa RESOLVE..... 62
3.6.2. Resolució del problema de la fase amb un model per homologia: el reemplaçament molecular i el programa AMoRe..... 63

3.7. Construcció del model de proteïna..... 65
3.7.1. Càlcul del mapa de densitat electrònica..... 65
3.7.2. El traçat de l'estructura..... 65
3.7.2.1. Construcció automàtica del model de proteïna amb el programa RESOLVE..... 67
3.7.2.2. Construcció manual del model de proteïna..... 67

3.8. Afinament del model de proteïna..... 67

3.9. Avaluació del model molecular..... 69
3.9.1. Estereoquímica de la cadena principal: els diagrames de Ramachandran..... 70
3.9.1.1. Altres mesures estereoquímiques..... 70
3.9.2. El Rfactor..... 71
3.9.3. El model de DNA..... 71

3.10. El fitxer PDB..... 72

4. Resultats i Discussió..... 73

4.1. Clonació, expressió i purificació de la proteïna p4..... 75
4.1.1. Solubilització de la proteïna..... 75
4.1.2. Preparació dels complexes amb DNA..... 75
4.1.3. Purificació dels complexes amb DNA..... 78
4.1.4. Cristal·lització..... 79
4.1.5. Crioprotecció i congelació dels cristalls..... 84
4.1.5.1. Soakings..... 85
4.2. Recollida de les dades de difracció del cristall derivatitzat..... 85
4.2.1. Processament de les dades de difracció C2221..... 86
4.2.2. Resolució del problema de la fase pel mètode MAD..... 88
4.2.3. Inspecció i validació de les posicions..... 89
4.2.4. Extensió de les fases..... 91
4.2.5. Construcció del model a 3 Å..... 93
4.2.6. Afinat de l'estructura a 3 Å amb fases experimentals..... 94
4.3. Processament de les dades de difracció p212121..... 97
4.3.1. Resolució del problema de la fase pel mètode del reemplaçament molecular..... 98
4.3.2. Construcció i afinat del model a 2 Å..... 100
4.3.3. Descripció de l'estructura..... 103
4.3.4. El dímer..... 104
4.3.5. Cavitat interior..... 106
4.3.6. L'extrem N-terminal..... 107
4.3.7. Comparació entre monòmers..... 108

4.3.8. Comparació amb altres estructures..... 109
4.3.9. Identificació de la regió d'unió a DNA..... 110
4.3.10. El diagrama de Ramachandran..... 111
4.4. Processament de les dades de difracció P2..... 112
4.4.1. Resolució del problema de la fase pel mètode del reemplaçament molecular..... 114
4.4.1.1. Tria dels models de cerca..... 114
4.4.2. Afinat i finalització del model de l'estructura..... 120
4.4.3. Descripció de l'estructura..... 124
4.4.4. El dímer..... 125
4.4.5. L'hèlix α4..... 126
4.4.6. Unió al DNA..... 127
4.4.7. Zona del loop de reconeixement..... 128
4.4.7.1. Canvis en l'interacció del monòmer B..... 132
4.4.8. Zona de dimerització..... 134
4.4.9. Validació de l'estructura: el diagrama de Ramachandran..... 136
4.4.10. Estructura del DNA..... 138
4.4.11. Canvis en la proteïna a l'unir-se al DNA..... 140

5. Discussió general: implicacions biològiques..... 141

5.1. Mutagènesi..... 143
5.2. Comparació amb altres proteïnes homòlogues..... 145
5.3. Unió al DNA de p4..... 146
5.4. Regió carboxi-terminal de p4: l'hèlix α4..... 148
5.5. Model d'interacció amb la RNA polimerasa..... 149
5.6. Discussió del rol de la proteïna p4 en la regulació transcripcional..... 154

6. Conclusions..... 155

7. Bibliografia..... 161