

LOS VIRUS COMO SISTEMA MODELO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

MARGARITA SALAS *

* Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Facultad de Ciencias de la U.A.M. Cantoblanco 28049 Madrid

RESUMEN

Los virus han sido y seguirán siendo modelo en Biología Molecular. De hecho, el nacimiento de la Genética Molecular surgió a comienzos de los años 50 gracias al estudio de los virus bacterianos, que han servido para descifrar los mecanismos básicos de transferencia de la información genética: los procesos de replicación, transcripción y traducción.

En la actualidad, gracias al estudio de los virus, conocemos los distintos mecanismos utilizados para la replicación del material genético, ya sea éste DNA o RNA, así como el modo específico de iniciación de la replicación viral. La replicación ha resultado ser un proceso mucho más complejo de lo que se pensaba en un principio y en él intervienen, además de la DNA polimerasa replicativa, un gran número de proteínas llamadas accesorias a la DNA polimerasa cuyo conjunto forman lo que se conoce con el nombre de “replisoma”.

El estudio de los virus también nos ha permitido profundizar en los mecanismos de control de la expresión génica, con el descubrimiento de proteínas activadoras y represoras que, mediante su unión a secuencias específicas en el DNA, activan o reprimen, respectivamente, la transcripción realizada por la RNA polimerasa.

Por otra parte, los virus son excelentes sistemas modelo para estudiar los procesos de morfogénesis, es decir, cómo se forma una estructura definida a partir

de sus componentes, que en el caso de los virus son mayoritariamente proteínas y ácido nucleico (DNA o RNA). Es relevante señalar el descubrimiento de las llamadas proteínas morfogenéticas, que intervienen en la formación de la partícula viral, pero que finalmente no forman parte del virus maduro.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE Ø29

El bacteriófago Ø29, que infecta a *Bacillus subtilis*, es un sistema muy apropiado para su estudio a nivel molecular. Por una parte, es de pequeño tamaño, unas diez veces menor que el fago T4 que infecta a *Escherichia coli*, y por otra, su partícula es compleja desde el punto de vista estructural, lo que hace que sirva de modelo en estudios de morfogénesis de virus (ver Figura 1).



Figura 1. Fotografía al microscopio electrónico del fago Ø29.

El material genético de $\phi 29$ es un DNA lineal de doble cadena de tan solo 19.285 pares de bases, con capacidad para codificar a unos 20 genes y otras tantas proteínas. Además, tiene la característica interesante de poseer una proteína unida covalentemente a los extremos 5' del DNA del virus. Dicha proteína es el producto del gen 3 viral, y por ello, se la ha denominado p3, aunque más frecuentemente se la conoce con el nombre de proteína terminal o TP (Salas, 1991).

Mediante el uso de mutantes letales condicionales, tanto sensibles a temperatura (ts) como sensibles a supresor (sus), se han caracterizado un total de 19 genes que se han localizado en un mapa genético lineal (Figura 2). Los genes tempranos, que se expresan inmediatamente después de la infección mediante la RNA polimerasa de *B. subtilis*, que reconoce los llamados promotores tempranos del fago, están localizados en los dos extremos del DNA viral, y codifican a proteínas implicadas en la replicación del DNA de $\phi 29$

(p1, p2, p3, p5, p6, p16.7 y p17) y a la proteína p4 que se requiere para la activación de la transcripción tardía del DNA del fago. Los genes tardíos codifican a las proteínas estructurales que forman la partícula viral (p8, p8.5, p9, p10, p11 y p12), a proteínas morfogénicas (p7, p13 y p16), que se requieren para la morfogénesis del virus pero que no forman parte del virus maduro, y a las proteínas p14 y p15, encargadas de la lisis de la bacteria infectada cuando se ha producido una cantidad elevada de virus progenie (unas 1000 partículas virales por cada bacteria infectada) (Salas y Rojo, 1993).

ESTRUCTURA Y MORFOGÉNESIS DE $\phi 29$

Mediante experimentos de disociación parcial del virus y electroforesis de las estructuras resultantes en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico se ha caracterizado que la proteína p8 es la mayoritaria que forma la cabeza del virus, la p8.5

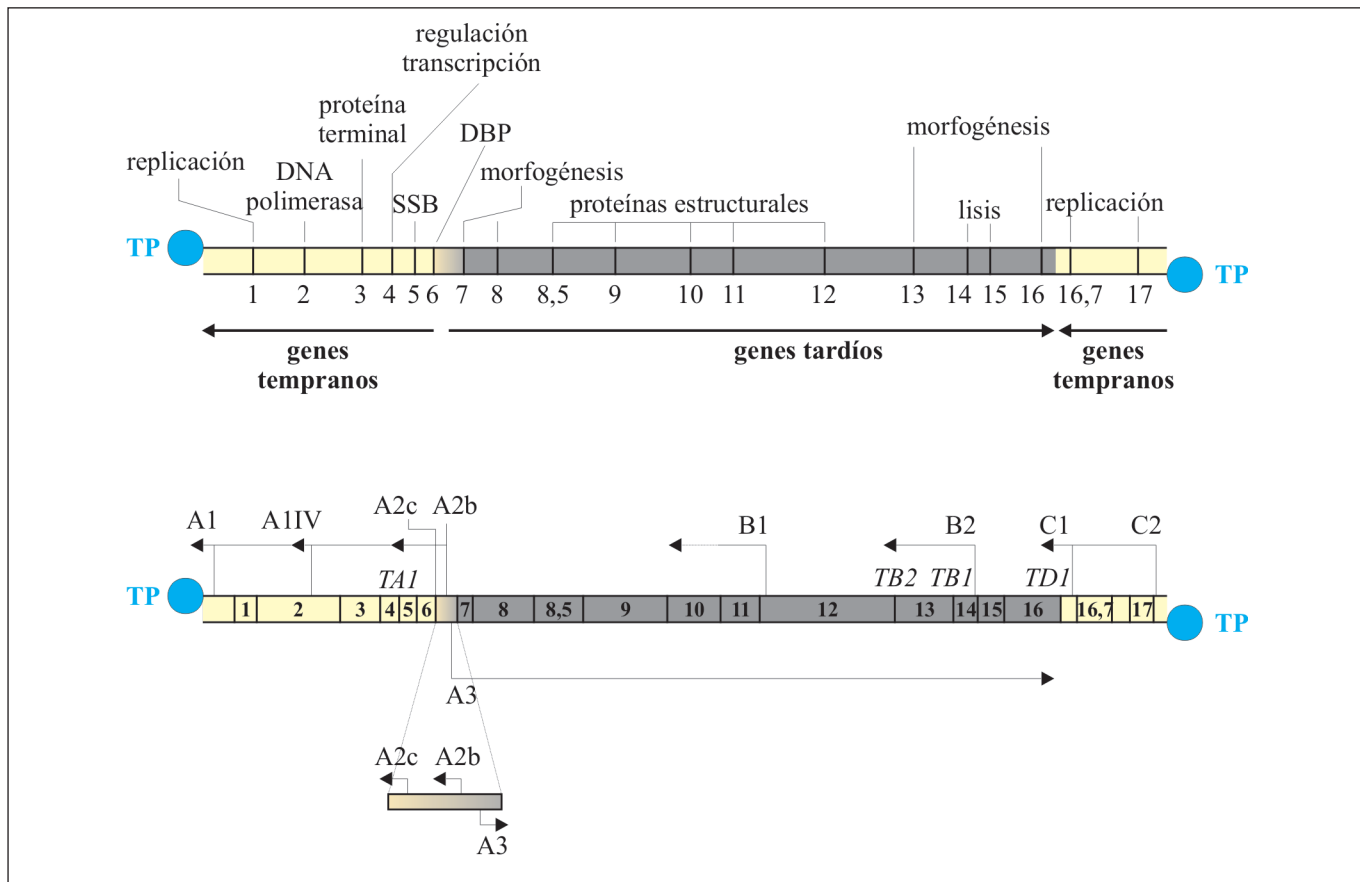


Figura 2. Mapa genético y de transcripción del DNA del fago $\phi 29$.

forma las fibras que irradian de la cabeza, la p9 forma la cola, la p10 y la p11 forman el collar superior e inferior, respectivamente, y la p12 forma los apéndices del cuello. Dichos apéndices son la estructura que reconoce la pared bacteriana y confiere especificidad para infectar determinadas bacterias y no otras (Salas, 1999).

Mediante el uso de bacterias infectadas con mutantes *ts* y *sus* de $\phi 29$ en condiciones restrictivas, es decir condiciones en las que la mutación se expresa, se ha podido determinar la ruta morfogenética de $\phi 29$, es decir como se ensamblan las distintas proteínas y el DNA para dar lugar al virus maduro. En primer lugar, en presencia de las proteínas que forman la cabeza del virus, el collar superior, las fibras y la proteína morfogenética p7, llamada proteína de armadura, se forman lo que se llaman las precabezas. Si la proteína que forma el collar superior no está presente, se forman cabezas isométricas en vez de las cabezas alargadas normales. Por otra parte, en ausencia de la proteína de armadura no se pueden formar las precabezas virales. Una vez formadas las precabezas se empaqueta el DNA viral con la ayuda de un RNA de pequeño tamaño, llamado pRNA y de la proteína p16 que es una ATPasa. Una vez empaquetado el DNA viral en la precabeza, la estructura de ésta se modifica, probablemente debido a la salida de la proteína de armadura, y se ensamblan, sucesivamente, el collar inferior, la proteína de la cola, ésta con la ayuda de la proteína morfogenética p13, y los apéndices del cuello (Salas, 1999).

Dentro de la cabeza del fago el DNA está empaquetado a una gran presión, que puede alcanzar hasta 60 atmósferas. Esta presión probablemente contribuye a que el DNA viral sea inyectado en el interior de la bacteria en el proceso de infección. Una de las proteínas virales sintetizadas al comienzo de la infección, la p6, compacta el DNA viral unas 6 a 8 veces, lo que posiblemente facilite el alto grado de empaquetamiento del DNA dentro de la cabeza del fago, si bien la proteína p6 no se ha detectado en la partícula viral.

TRANSCRIPCIÓN

Existe una región central en el DNA de $\phi 29$ que tiene un interés especial desde el punto de vista del control de la transcripción. Como se muestra en la

Figura 2, en dicha región están localizados los promotores tempranos A2b y A2c, y el promotor tardío A3. Los promotores A2b y A2c tienen las regiones consenso -10 y -35, por lo que son reconocidos por la RNA polimerasa bacteriana al comienzo de la infección. El promotor tardío tiene región -10 pero carece de región -35, lo que hace que la RNA polimerasa de la bacteria no sea capaz de reconocer a dicho promotor. Sin embargo, contiene un sitio de unión de la proteína reguladora p4, que solapa con la región -35 del promotor A2b. Por ello, cuando se sintetiza la proteína p4, ésta se une a su sitio en el promotor A3, promoviendo la unión de la RNA polimerasa a dicho promotor activando la transcripción del mismo, y desplazándole a su vez del promotor temprano A2b, dando lugar a la represión de su transcripción. Por otra parte, por encima de la región -35 del promotor A2c existe otro sitio de unión de la proteína p4. Cuando ésta se une a dicho sitio, interacciona fuertemente con la RNA polimerasa, impidiendo que ésta prosiga a la fase de polimerización y, por tanto, reprimiendo la transcripción de dicho promotor. Así pues, la proteína p4 tiene una acción dual, activando al promotor tardío A3, y reprimiendo a los promotores tempranos A2b y A2c (Rojo et al., 1998). Otra proteína viral, p6, que como se dijo anteriormente se une al DNA compactándolo, coopera con la proteína p4, tanto en la activación de la transcripción desde el promotor A3 como en su represión desde los promotores A2b y A2c (Elías-Arnanz y Salas, 1999).

REPLICACIÓN

Teniendo en cuenta que las DNA polimerasas no pueden iniciar nuevas cadenas de DNA, sino solamente polimerizar a partir de un grupo 3' hidroxilo de un ácido nucleico, hacia el año 1970, Arthur Kornberg se planteó el problema de cómo se inicia la síntesis de DNA por la DNA polimerasa. Kornberg postuló y demostró que un mecanismo para dicha iniciación es la síntesis de un RNA iniciador mediante una RNA polimerasa específica, que en algunos casos, es resistente a rifamicina, a diferencia de la RNA polimerasa implicada en el proceso de transcripción, que es sensible a dicho antibiótico (Kornberg y Baker, 1992). Posteriormente se demostró la existencia de otros mecanismos para iniciar la replicación, tales como el uso de mRNAs en el caso de la replicación del DNA

mitocondrial, tRNA en el caso de los retrovirus, o los propios extremos 3'OH del DNA creados bien por rotura específica de una de las cadenas de DNAs circulares de doble banda, o por formación de las llamadas horquillas de replicación en los extremos de DNAs lineales. El descubrimiento de la TP, primero en el caso del fago $\phi 29$ (Ortín et al., 1971) y posteriormente en el caso de adenovirus (Robinson et al., 1973), llevó al descubrimiento de un nuevo mecanismo de iniciación de la replicación, en el cual el grupo hidroxilo requerido por la DNA polimerasa es suministrado por un aminoácido, que en el caso de ambos, $\phi 29$ y adenovirus, es una serina específica de la TP (Salas, 1991).

Así pues, la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ se inicia en cualquiera de los dos extremos del DNA. Para ello, se forma un heterodímero de una molécula de TP y de DNA polimerasa de $\phi 29$; dicho heterodímero reconoce los orígenes de replicación en los extremos del DNA e interacciona con la TP paterna y con secuencias específicas en los extremos del DNA para comenzar la iniciación de la replicación formando, en presencia del nucleótido iniciador, dATP, un enlace covalente TP-dAMP catalizado por la DNA polimerasa viral. La iniciación de la replicación no ocurre utilizando como molde el nucleótido 3' terminal (T), sino el segundo nucleótido desde el extremo 3' terminal, que es otra T. A continuación tiene lugar un mecanismo de deslizamiento hacia atrás en el cual el dAMP unido covalentemente a la TP se aparea con la T 3' terminal, por lo que la segunda T actúa de nuevo como molde para la incorporación del segundo residuo de dAMP por la misma DNA polimerasa viral, que continúa el proceso de polimerización. La disociación de la DNA polimerasa de la TP que ha iniciado la replicación no ocurre inmediatamente después de la adición del primer nucleótido, sino que tiene lugar cuando el décimo nucleótido se ha incorporado a la cadena de DNA naciente. La DNA polimerasa continúa la polimerización con desplazamiento simultáneo de la banda paterna. Sin embargo, antes de que ésta llegue a desplazarse totalmente, comienza la replicación en el otro extremo del DNA y, cuando las dos horquillas de replicación se juntan, se separan las dos moléculas de DNA para completar su replicación.

Se ha desarrollado un sistema de replicación *in vitro* con la TP y la DNA polimerasa de $\phi 29$ purificadas. Ambas proteínas, en presencia de TP-DNA, son

capaces de iniciar la replicación formando un complejo covalente TP-dAMP en presencia de dATP, así como de polimerizar el DNA dando lugar a la síntesis *in vitro* de DNA de $\phi 29$ de longitud unidad (Blanco y Salas, 1984; Blanco et al., 1989). Adicionalmente, cuando se estudia la replicación del DNA de banda simple (~ 7 kb) del fago M13 utilizando un oligonucleótido como iniciador, la DNA polimerasa de $\phi 29$ es capaz de copiar más de 10 veces el círculo mediante el mecanismo conocido como rueda giratoria, lo que implica que es muy procesiva (> 70 kb) y que tiene capacidad de desplazamiento de banda (Blanco et al., 1989). Estas dos propiedades de la DNA polimerasa de $\phi 29$ han sido explotadas para su aplicación biotecnológica para amplificación de DNA, como se verá posteriormente.

Además de sus actividades de iniciación y polimerización, la DNA polimerasa de $\phi 29$ tiene actividad 3'-5' exonucleasa, correctora de pruebas, encargada de eliminar nucleótidos insertados incorrectamente en el proceso de polimerización. Ello hace que la DNA polimerasa de $\phi 29$ posea una alta fidelidad (Garmendia et al., 1992).

Todas estas actividades y propiedades de la DNA polimerasa de $\phi 29$ han hecho de ella una proteína muy adecuada para realizar estudios estructura-función. Así, basándonos en una serie de regiones de homología de secuencia de aminoácidos en DNAs polimerasas de diferentes orígenes, realizamos mutagénesis dirigida en los aminoácidos conservados para estudiar la actividad afectada en cada caso como resultado de la mutación. De esta forma pudimos definir que la región amino terminal de la DNA polimerasa de $\phi 29$ está implicada en las actividades 3'-5' exonucleasa y de desplazamiento de cadena, mientras que la región carboxi terminal está implicada en las actividades de iniciación y polimerización. Por otra parte, pudimos definir aminoácidos implicados en la interacción con el DNA, con la TP o con el nucleótido. También definimos una zona de comunicación entre la actividad exonucleolítica y sintética (Blanco y Salas, 1996).

En relación con la TP que actúa de iniciadora en la replicación del DNA de $\phi 29$, se ha caracterizado que es la serina 232 de la TP la que suministra el grupo hidroxilo a la DNA polimerasa de $\phi 29$. La especificidad del proceso es muy alta, pues cuando, por muta-

génesis dirigida, se cambia la serina 232 en treonina, la TP mutante es incapaz de suministrar el grupo hidroxilo para iniciar la replicación (Garmendia et al., 1988).

Otras proteínas necesarias para la replicación del DNA de $\phi 29$ son las proteínas p5 y p6, ambas muy abundantes en bacterias infectadas ($\sim 10^6$ copias por

bacteria). La proteína p5 es una proteína de unión a DNA de banda simple (SSB), que se une a la banda simple que se va desplazando en el proceso de replicación del DNA de $\phi 29$, y evita la acción de las nucleasas, así como la formación de estructuras secundarias ya que esta proteína tiene actividad desestabilizadora de hélice, capaz de abrir pequeñas regiones de DNA de doble cadena. La proteína p6 ó DBP se une a

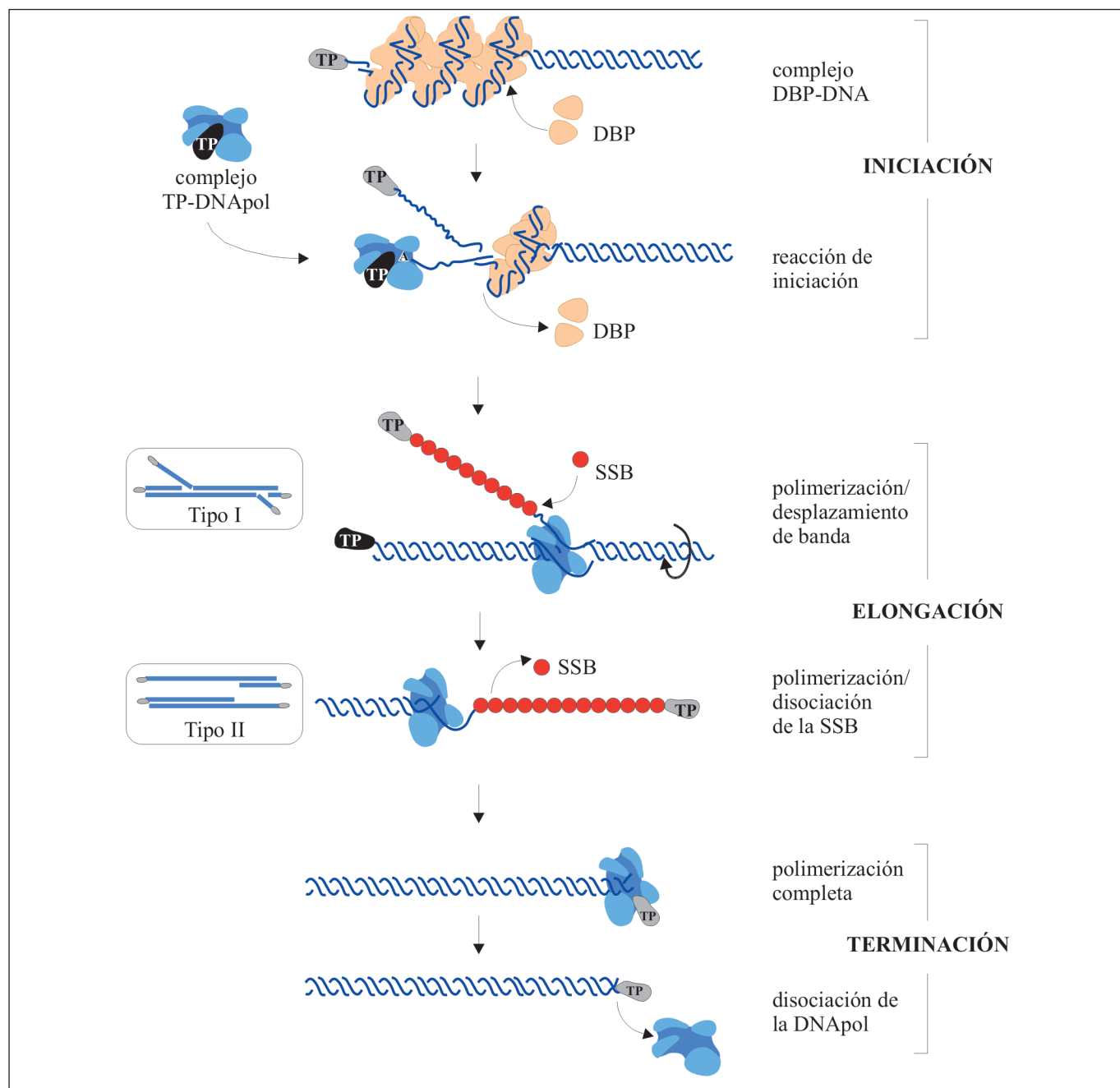


Figura 3. Mecanismo de replicación del DNA del fago $\phi 29$.

los extremos del DNA de $\phi 29$ formando un complejo nucleoprotéico que favorece la apertura de los extremos del DNA para la iniciación de la replicación. La Figura 3 muestra un esquema del proceso de replicación del DNA de $\phi 29$, con la implicación de la TP, DNA polimerasa, SSB y DBP. Además, la proteína p17, sintetizada al comienzo de la infección, interacciona con la DBP, y favorece la unión de ésta a los extremos del DNA de $\phi 29$ para iniciar la replicación (Meijer et al., 2001a). Por otra parte, existen dos proteínas virales, p1 y p16.7, que están unidas a la membrana bacteriana, probablemente facilitando la unión a ésta del complejo de replicación (Bravo y Salas, 1997; Meijer et al., 2001b).

Teniendo en cuenta el mecanismo de replicación del DNA de $\phi 29$, por el que se amplifica *in vivo* unas 1000 veces en el proceso de la infección viral, estudiamos si dicha amplificación podía obtenerse *in vitro* con las cuatro proteínas virales esenciales en la replicación del DNA de $\phi 9$: TP, DNA polimerasa, SSB y DBP. Cuando se utiliza como molde una cantidad pequeña de TP-DNA (0.5 ng), en presencia de las cuatro proteínas virales indicadas antes, se obtiene una amplificación de 1000 veces (0.5 μ g de DNA sintetizado) en 1 hora de incubación a 30°C. El DNA amplificado *in vitro* tiene el tamaño correspondiente al DNA de $\phi 29$ y, lo que es más importante, es infectivo, obteniéndose una infectividad similar a la que se alcanza con el DNA aislado de partículas virales (Blanco *et al.*, 1994). Estos resultados indican que se ha amplificado el DNA de $\phi 29$ *in vitro* con una gran fidelidad.

DNA POLIMERASA DE $\phi 29$. APLICACIONES EN AMPLIFICACIÓN DE DNA

Las características de la DNA polimerasa de $\phi 29$ de procesividad (> 70 kb), capacidad de desplazar banda y fidelidad hacen que esta polimerasa sea única para amplificar DNA mediante el mecanismo de círculo giratorio. Así, partiendo de DNA circular de cadena simple al que se unen hexámeros al azar, la DNA polimerasa de $\phi 29$ es capaz de iniciar la replicación a partir de cada uno de los hexámeros, con el correspondiente desplazamiento de cadena. La cadena de DNA desplazada, a su vez, es sitio de reconocimiento para los

hexámeros que inician la síntesis de DNA a partir de cada uno de ellos. La polimerización y desplazamiento de cadena continuada da lugar a ramificación y exposición de nuevos sitios de reconocimiento a los hexámeros. Eventualmente, se produce la liberación de fragmentos de DNA de doble cadena de longitud 1x, 2x, 3x a nx el tamaño unidad del DNA circular inicial, que se acumulan de un modo exponencial. Esta amplificación se conoce con el nombre de hiperramificación y puede general hasta 10^9 copias de cada molde circular (Clark y Pickering, 2000). Una pequeña cantidad del DNA amplificado por este mecanismo puede usarse directamente para su secuenciación.

CONCLUSIONES

Es evidente que el fago $\phi 29$ ha resultado ser un sistema modelo excelente a nivel molecular en los siguientes aspectos: 1) en estudios de morfogénesis, con el descubrimiento de proteínas morfogenéticas y de un RNA viral implicado en el empaquetamiento del DNA; 2) en estudios de transcripción, con el descubrimiento de una proteína reguladora que es, a la vez, activadora y represora de ciertos promotores virales, así como del papel de otra proteína viral multifuncional que coopera con la proteína reguladora en los procesos de activación y represión; 3) en estudios de replicación, con el descubrimiento de la proteína terminal y de un nuevo mecanismo de iniciación de la replicación, extrapolable a otros virus de gran interés sanitario y económico como el adenovirus humano que causa transformación oncogénica, y el virus de la poliomielitis, entre otros; 4) descubrimiento de la DNA polimerasa viral con propiedades de procesividad, desplazamiento de cadena y fidelidad que la hacen única entre todas las DNA polimerasas conocidas para la amplificación eficiente y rápida de DNA mediante el mecanismo que se conoce con el nombre de círculo giratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco, L. and Salas, M. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5325-5329.
2. Blanco, L. and Salas, M. (1996). J. Biol. Chem. 271, 8509-8512.

3. Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martín, G., Garmendia, C. and Salas, M. (1989). *J. Biol. Chem.*, 264, 8935-8940.
4. Blanco, L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Bonnin, A. and Salas, M. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12198-12202.
5. Bravo, A. and Salas, M. (1997). *J. Mol. Biol.* 269, 102-112.
6. Clark, Z. and Pickering, J. (2000). *Life Science News* 6, 18-21.
7. Elías-Arnanz, M. and Salas, M. (1999). *Genes Dev.* 13, 2502-2513.
8. Garmendia, C., Bernad, A., Esteban, J.A., Blanco, L. and Salas, M. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 2594-2599.
9. Garmendia, C., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1988). *Nucl. Acids Res.*, 16, 5727-5740.
10. Kornberg, A. and Baker, T.A. (1992). *DNA replication*. W.H. Freeman & Co., New York, N.Y.
11. Meijer, W.J.J., Horcajadas, J.A. and Salas, M. (2001a). *Microb. Mol. Biol. Rev.* 65, 261-287.
12. Meijer, W.J.J., Serna-Rico, A. and Salas, M. (2001b). *Mol. Microbiol.* 39, 731-746.
13. Ortín, J., Viñuela, E., Salas, M. and Vázquez, C. (1971). *Nature New Biology*, 234, 275-277.
14. Robinson, A.J., Younghusband, H.B. and Bellett, A.J. (1973) *Virology* 56, 54-69.
15. Rojo, F., Mencía, M., Monsalve, M. and Salas, M. (1998). *Progress Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 60, 29-46.
16. Salas, M. (1991). *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 39-71.
17. Salas, M. (1999) In R.G. Webster and A. Granoff (eds.) *Encyclopedia of Virology*, 2nd ed. Academic Press, Ltd. London, United Kingdom, Vol. 1 p. 119-130.
18. Salas, M. and Rojo, F. (1993). In A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and R. Losick (eds.). *Bacillus subtilis*, the Model Gram-Positive Bacterium: Physiology, Biochemistry and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 843-858.