



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DINÁMICA DE LA ELONGACIÓN DE LA
TRANSCRIPCIÓN DE LA ARN
POLIMERASA DE *Mycobacterium
tuberculosis* A NIVEL DE MOLÉCULAS
INDIVIDUALES

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

KEREN ANTONIETA ESPINOZA HUERTAS

LIMA – PERÚ
2018

Dr. Daniel Guerra Giraldez

ASESOR

JURADO EVALUADOR DE TESIS

DRA. PATRICIA HERRERA VELIT (PRESIDENTA)

DR. MIRKO ZIMIC PERALTA (VOCAL)

DR. PABLO TSUKAYAMA CISNEROS (SECRETARIO)

DEDICATORIA

A mi madre Elena Huertas Abal y a mi hermana Daniela Espinoza por creer en mí y ser mi principal apoyo y motivación en cada paso que doy.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel Guerra (UPCH) y al Dr. Carlos Bustamante (U.C. Berkeley) por su apoyo y asesoría constante durante todo el proceso de elaboración de este trabajo. Su confianza y paciencia hicieron posible concretar este trabajo.

A Omar Herrera, Robert Sosa y Cristhian Cañari por la ayuda, sugerencias y consejos durante la ejecución de este proyecto.

A mi madre, mi hermana y a Diego V. por su paciencia y apoyo incondicional.

Keren Espinoza Huertas es becaria del Programa de Bioquímica y Biología Molecular, CONV-00031-2015-FONDECYT-DE

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
III.	JUSTIFICACIÓN.....	9
IV.	MARCO TEÓRICO.....	11
V.	HIPÓTESIS.....	22
VI.	OBJETIVOS.....	23
	1. Objetivo general.....	23
	2. Objetivos específicos.....	23
VII.	MATERIALES.....	24
	1. Plásmidos y Cepas.....	24
	2. Proteínas.....	25
	3. Fragmentos de ADN y oligonucleótidos.....	25
	4. Reactivos y equipos para obtención de la ARNP-Mtb y el ADN molde.....	26
	Enzima ADN polimerasa Phusion, Buffer PCR <i>Phusion 5X</i> , (<i>Neb</i>), desoxinucleótidos (dNTPs de <i>Fermentas</i>), loading dye 6X (<i>ThermoFisher</i>), Marcador de peso molecular (<i>Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus</i>), Agarosa (<i>Cleaver Scientific Ltd</i>), <i>Syber safe</i> (<i>ThermoFisher</i>), Imidazol, Agua ultrapura, GeneJET PCR purification kit (<i>ThermoFisher</i>), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (<i>ThermoFisher</i>).....	26
	Termociclador (AB Applied Biosystems), Transiluminador (<i>Dark Reader</i>) y Nanodrop.....	26
VIII.	METODOLOGÍA.....	29
IX.	RESULTADOS.....	50
X.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	67
XI.	CONCLUSIÓN.....	79
XII.	RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	80
XIII.	REFERENCIAS.....	81

XIV. ANEXOS	90
Anexo 1: Composición de los buffers para la Purificación ARNP-Mtb	90
Anexo 2: Condiciones de filtrado de datos en el programa Matlab 13.0	92

ABREVIATURAS

ARNP: ARN Polimerasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

NTPs: Nucleótidos trifósforo

Mtb: *Micobacterium Tuberculosis*

Rif: Rifampicina

WLC (*worm like chain*): Cadena vermiforme. Modelo mecánico estadístico de polímeros flexible que relaciona fuerza y extensión

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) es el agente infeccioso causante de más de un millón de muertes anuales a nivel mundial. Una de las estrategias terapéuticas más importantes para combatir a Mtb es la inhibición de ARN polimerasa (ARNP), por lo que una caracterización detallada de esta enzima y su actividad es necesaria para comprender los mecanismos de resistencia antibiótica y contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos. Dado el crecimiento lento de Mtb, sus mecanismos de regulación son probablemente muy diferentes a lo observado en los sistemas de transcripción procarionte más conocidos actualmente (*E. coli* y *Archaea*).

Este estudio aprovecha los recientes avances en la purificación de la enzima ARNP de Mtb para caracterizar su actividad, específicamente en la fase de elongación de la transcripción. Mediante la manipulación con pinzas ópticas, describimos por primera vez la elongación realizada por moléculas individuales de ARNP de Mtb y reportamos la velocidad promedio en nucleótidos incorporados por segundo, la distribución de tiempos de pausa, la velocidad libre de pausas, y la dependencia de estas variables con respecto a la fuerza. Esta novedosa aproximación bioquímica permitirá estudios posteriores en la regulación de la expresión genética, la interacción con inhibidores y las consecuencias funcionales de los polimorfismos asociados a resistencia antibiótica.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is an infectious agent that causes more than one million of annual deaths worldwide. RNA polymerase (RNAP) is one of the most important therapeutic targets to fight Mtb, therefore a detailed characterization of this protein and its activities is necessary to understand the mechanisms of antibiotic resistance and contribute to the development of new treatments against this bacterium. Given the slow growth of Mtb, its regulatory mechanisms are probably very different from what is observed in the currently most well-known transcription systems (mainly *E. coli* and *Archaea*).

This study takes advantage of recent advances in the purification of the Mtb RNAP to characterize its activity in the phase of transcription elongation. Using optical tweezers, we have manipulated individual molecules of RNAP and we report, for the first time, a description of the Mtb RNAP's dynamics. The average speed as number of nucleotides incorporated per second, the distribution of pause times, the pause-free velocity, and the force dependence of these variables were reported. Moreover, this novel biochemical approach will allow subsequent studies in the regulation of gene expression, interaction with inhibitors and the functional consequences of polymorphisms associated with antibiotic resistance.

I. INTRODUCCIÓN

La transcripción es un proceso imprescindible para la supervivencia de todos los organismos vivos que asegura la expresión regulada de los genes para el suministro de proteínas y moléculas de ARN necesarias en el correcto funcionamiento de la célula. La regulación de la expresión génica en bacterias que les permite responder a condiciones específicas (disponibilidad de alimento, oxígeno, densidad poblacional, temperatura, etc.) se da principalmente a nivel de la transcripción (1,2). Si bien son muchas las proteínas involucradas en el proceso, es en la ARN polimerasa (ARNP) que convergen finalmente todas las formas de regulación de la transcripción a partir de diversas rutas de información. Aunque la estructura del sitio activo de ARNP y su mecanismo catalítico son altamente conservados (3), las interacciones con múltiples factores regulatorios divergen significativamente, y por lo tanto el estudio detallado de la bioquímica de esta enzima resulta central para la comprensión de la biología de una especie bacteriana y su capacidad de responder a estímulos del ambiente o condiciones adversas.

Probablemente debido a su carácter esencial y a la intensa competencia que existe entre microorganismos, la ARNP es el blanco de muchas moléculas inhibitoras (4,5). Dado que las polimerasas bacterianas difieren mucho de las polimerasas de mamíferos, los inhibidores que tienen como blanco a esta enzima pueden actuar de manera específica contra la célula bacteriana y ser útiles como medicamentos. Con esta motivación se ha estudiado varios inhibidores que tienen capacidad bacteriostática ó antibiótica, y algunos de estos bloquean la síntesis del

ARN, por ejemplo la familia de las Rifamicinas y los péptidos MCJ25 y Capistrum, mientras que otros bloquean la formación del complejo abierto durante la iniciación, como la fidaxomicina (6–9).

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) es el agente infeccioso causante de la tuberculosis, enfermedad de gran importancia mundial debido a su alta prevalencia. Durante la infección, esta bacteria debe adaptarse al cambio del entorno que experimenta en su hospedero, así como a condiciones adversas, tales como una activa respuesta inmune, la fagocitosis por macrófagos alveolares y eventualmente el efecto de tratamientos antibióticos. Son varias las características biológicas distintivas de Mtb a las que posiblemente podemos atribuir parte de su éxito como agente infeccioso en humanos y la dificultad que representa ante medidas de tratamiento, prevención y salud pública. Entre ellas tenemos la baja permeabilidad de su compleja pared celular, y un período de incubación muy variable (9,10). Además, la multiplicación de Mtb es muy lenta, cada ciclo de duplicación dura de 16 a 20 horas. Además, ante circunstancias desfavorables puede entrar en estado durmiente, y retrasar su multiplicación, pudiendo sostener una infección latente asintomática hasta por varios años. Estas características, junto a su alta patogenicidad, hacen además que el estudio de este organismo en cultivo resulte muy difícil (11,12).

Como parte de la adaptación de Mtb a los distintos tratamientos, han surgido cepas drogo-resistentes que se han convertido en uno de los principales problemas de salud global. Circunstancias adversas como la práctica de tratamientos inadecuados sin diagnóstico personalizado, la poca cooperación de los pacientes y

la baja de adherencia de éstos al régimen de medicación agravan la selección y el incremento en la proporción de cepas resistentes a antibióticos. Cepas multi-drogo resistentes (TB-MDR), cepas de resistencia extendida (TB-XDR), que resisten a fármacos de primera y segunda línea se han convertido en un gran problema de salud pública a nivel mundial(12).

Las mutaciones que confieren resistencia a Rifampicina (Rif) han surgido como consecuencia de la existencia de polimorfismos del gen *rpoB*. Estas mutaciones no solo impiden la acción de la Rif sobre la ARNP de Mtb, si no que también producen cambios en el crecimiento y composición de la bacteria que han sido poco caracterizados a la fecha (13,14). Además, se han identificado otras mutaciones en las cepas resistentes más frecuentes en la población de pacientes. La frecuencia de aparición de estas mutaciones adicionales demuestra que incrementan el *fitness* de las cepas resistentes, aparentemente por compensar los efectos fisiológicos que surgen de la mutación que les otorga resistencia (15,16). El hecho de que estas mutaciones compensatorias surjan en la misma enzima y no en otras moléculas que intervienen en la transcripción, indica que el costo biológico de la resistencia a Rif debe estar contenido en la bioquímica de la misma ARNP de Mtb. Por lo tanto, será necesario caracterizar la bioquímica de esta enzima para poder entender cómo se relaciona los polimorfismos que confieren resistencia a Rif con la fisiología de la bacteria y su *fitness* biológico.

Las peculiaridades del desarrollo de la Mtb y el surgimiento de cepas resistentes a los tratamientos indican que es necesario estudiar las características propias de la ARNP de Mtb. Sin embargo, la mayor parte del conocimiento actual

acerca de la transcripción bacteriana y la enzima ARNP se ha obtenido de estudios estructurales de enzimas termófilas y de estudios bioquímicos con la bacteria modelo *Escherichia coli*. A partir del secuenciamiento del genoma de Mtb y, más recientemente, de la producción de ARNP micobacteriana por técnicas recombinantes, se han identificado una serie de unidades de transcripción, promotores, factores sigma y factores reguladores que expanden nuestra comprensión del proceso de transcripción de Mtb. Estos estudios delatan importantes diferencias que el sistema de Mtb presenta en comparación con el modelo *E. coli*, tales como la inestabilidad de los complejos de iniciación, la diferente sensibilidad a secuencias de terminación, y la diferente función de proteínas inicialmente consideradas como homólogas (17–20).

Los métodos de moléculas individuales ofrecen la mejor oportunidad disponible actualmente para descifrar las incógnitas alrededor de la actividad de la ARNP de Mtb. Estudios a nivel de moléculas individuales han mostrado que la elongación de la transcripción en *E. coli* es un proceso discontinuo que alterna periodos de elongación activa con periodos de pausas. La duración y densidad de las pausas son puntos importantes de regulación y estos pueden verse afectados por las condiciones ambientales de la bacteria. Pese a su importancia y a las diferencias ya mencionadas con la bacteria *E. coli*, los estudios bioquímicos con la enzima de Mtb son escasos y la caracterización de su dinámica a nivel de moléculas individuales aún no se ha realizado.

En el presente estudio se caracteriza la dinámica de elongación de la transcripción de la ARNP de Mtb a nivel de moléculas individuales, lo que

permitirá conocer su velocidad catalítica, su alternancia con estados de pausa y su capacidad de ejercer fuerza como motor molecular. Los resultados de este estudio servirán como base para posteriormente evaluar el efecto de factores reguladores, de transcripción, mutaciones vinculadas a resistencia antibiótica y la acción de nuevos posibles antibióticos para la ARNP de esta bacteria.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) es un agente infeccioso que constituye uno de los problemas sanitarios de mayor gravedad a nivel mundial. La tuberculosis (TBC) es la segunda causa de muerte más común debido a enfermedades infecciosas. Esta enfermedad mata alrededor de 1,4 millones de personas cada año. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con esta bacteria, y durante el transcurso de sus vidas, 5-10% de ellos desarrolla la enfermedad. Cada año se diagnostica TBC a 10 millones de pacientes, de los cuales, 95% radican en países en vías de desarrollo (12).

Mtb es una bacteria ácido-resistente Gram-positiva que posee características peculiares. Es un organismo intracelular obligado, aerobio e inmóvil. La envoltura de Mtb es compleja. Su pared celular es muy rica en lípidos, que constituyen el 20% del peso seco de la bacteria. Además, otra característica importante es que la tasa de multiplicación de *Mtb* es muy lenta, de 16 a 20 horas, mientras que para *E. coli* dura de 20 a 30 minutos (21,22).

Las características peculiares de Mtb exigen una comprensión detallada de los diferentes procesos moleculares esenciales, incluyendo la transcripción. La secuenciación del genoma de esta bacteria hizo posible obtener información sobre la función de los genes y mecanismos de esta bacteria. El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (cepa sensible) contiene aproximadamente 4,000 genes. De todos esos genes, se identificó gran número de ellos que

corresponden a factores reguladores de la transcripción, mostrando la importancia del proceso y su regulación para Mtb (10).

Los genes involucrados en la regulación de la transcripción en Mtb son esenciales en los mecanismos de adaptación de esta bacteria. Mtb debe adaptarse a las condiciones cambiantes de su entorno en el hospedero durante la infección, enfrentar la respuesta inmune y reprogramar su fisiología para sobrevivir. En condiciones muy adversas, esta bacteria es capaz de entrar en fase de dormancia, en el que disminuye su metabolismo al mínimo, y puede permanecer durante mucho tiempo e incluso varios años (23). Estos procesos adaptativos requieren de una reprogramación en la expresión de genes, y la transcripción sería el proceso principal de este control.

Actualmente se conoce poco sobre las características de la transcripción propias de Mtb. La mayor parte de las características de este proceso que se conocen a la fecha se han obtenido de estudios en *E. coli*. Dado el alto grado de conservación de la secuencia de la ARN polimerasa (ARNP) entre especies, se ha asumido que el proceso de transcripción es también muy similar. Sin embargo, estudios recientes han revelado que la ARNP de Mtb tiene una estabilidad y eficiencia de transcripción distintas a la de *E. coli* y requiere de factores adicionales (2,24). Si bien se han identificado una serie de unidades de transcripción, promotores, factores sigma y factores reguladores, se ignora el mecanismo por el cual las mutaciones asociadas a resistencia a Rif originan cambios bioquímicos en la bacteria. La aparición de mutaciones que incrementan la virulencia de Mtb, probablemente mediante la compensación de los defectos

acarreados por la resistencia antibiótica, delatan lo poco que aun comprendemos de la transcripción bacteriana y la información pertinente que debe estudiarse específicamente en el sistema de Mtb. (2).

Recientemente se ha publicado la estructura de la ARNP de Mtb en complejo con ADN con una resolución de 4.4 Å. Si bien se ha corroborado que la organización general de la holoenzima es muy similar la reportada para *E. coli* y *Thermus thermophilus*, se han reportado dos diferencias estructurales importantes. En primer lugar, se ha identificado una secuencia de inserción en la subunidad β' de la ARNP de Mtb que está ausente en *E. coli* y que tendría importancia asegurando al ADN en el sitio activo. Por otro lado, la orientación de la región σ 1.1 es distinta en Mtb (25).

La mayoría de los estudios de la transcripción en Mtb se han enfocado en la caracterización e identificación del proceso de iniciación y los factores necesarios para esta. Pese a su importancia, el proceso y la dinámica de la elongación de la transcripción solo ha sido estudiado con detalle para las enzimas de *E. coli*, bacteriófago T7 y *Saccharomices cerevisiae*.

III. JUSTIFICACIÓN

Las características peculiares de *Mtb* y su importancia biomédica exigen una comprensión detallada de sus procesos moleculares esenciales, la manera en que estos evolucionan en relación a los tratamientos antibióticos, y las oportunidades que nos ofrecen en la lucha contra la enfermedad. La transcripción es un proceso vital para la supervivencia de todos los organismos, y la ARNP es pieza clave en este proceso. Dado que las polimerasas bacterianas difieren mucho de las polimerasas de virus y mamíferos, la ARNP ha sido ampliamente utilizada como blanco de una gran variedad de drogas que buscan inhibir este proceso (26). Por ejemplo, la Rifampicina es uno de los medicamentos principales de la terapia anti-TBC y se une a la ARNP, bloqueando el proceso de transcripción (27).

Las características del proceso de transcripción bacteriana que se conocen a la fecha han sido obtenidas principalmente de estudios realizados en la bacteria modelo *E. coli* y se han generalizado a todas las bacterias. Dado el alto grado de conservación de la secuencia de la ARNP polimerasa de *E. coli* y la ARNP de *Mtb* se ha asumido que el proceso de transcripción es también muy similar(28,29). Sin embargo, considerando que la transcripción en *Mtb* puede ser hasta 60 veces más lento que el de *E. coli*, podría esperarse que el proceso en ambas bacterias tenga diferencias importantes. Trabajos bioquímicos y de biología molecular han mostrado que la actividad de la ARNP de *Mtb* posee diferencias importantes y por lo tanto es posible que el proceso de transcripción también posea estas diferencias.

Los primeros estudios sobre elongación con pinzas ópticas se llevaron a cabo en la ARNP de *E. coli* (30–34). Estos estudios mostraron que la elongación consistía de una fase de elongación activa y una fase compuesta por varios estados observados como pausas (34). Ambas fases de la elongación son de interés, ya que diferentes factores de transcripción pueden interactuar con la polimerasa y modificar su ciclo activo o la probabilidad de entrar o permanecer en un estado de pausa (35,36).

En vista de las diferencias en la actividad de la ARNP de *Mtb* con la ARNP de *E. coli*, es necesaria la caracterización de la dinámica de ARNP de *Mtb*. La comprensión del proceso de transcripción y la ARN polimerasa de *Mtb* tiene gran importancia biomédica. Este proyecto propone el primer estudio de caracterización de la ARNP de *Mtb* en su desplazamiento durante la elongación. A través de la descripción de la dinámica de la elongación en *Mtb* se busca aportar al conocimiento del proceso de expresión genética de este microorganismo. Este estudio es solo el primer paso hacia un grupo de investigaciones que son necesarias para mejorar nuestra comprensión sobre la biología de este patógeno, tanto de las cepas sensibles como de las resistentes a antibióticos.

IV. MARCO TEÓRICO

1. Moléculas individuales

Los métodos de moléculas individuales han permitido obtener información única sobre la dinámica de procesos de transcripción. Los trabajos sobre transcripción que se realizan tradicionalmente, estudian el proceso como un promedio de las características y actividad de muchas moléculas dentro de una población. Este enfoque ha brindado grandes aportes para el entendimiento del proceso global de transcripción; sin embargo, no permite obtener información fundamental sobre el comportamiento individual de cada molécula (37). Por el contrario, los métodos de moléculas individuales permiten seguir las trayectorias y comportamiento de moléculas individuales durante la transcripción en tiempo real, permitiendo superar las limitaciones de los métodos tradicionales (38).

Desde hace un par de décadas, diversos métodos de manipulación de moléculas individuales han sido empleados para caracterizar las etapas de la transcripción (microscopia de fuerza atómica, pinzas ópticas, etc). Experimentos en pinzas ópticas con la enzima ARNP han permitido medir con precisión fuerzas y desplazamientos a escala nanométrica. De este modo, las pinzas ópticas han proporcionado información única sobre la ARNP y su dinámica durante el proceso de transcripción (37,39–41).

1.1. Pinzas ópticas

La dinámica temporal y espacial de la elongación llevada a cabo por la ARNP durante la transcripción se ha caracterizado principalmente a través de experimentos con pinzas ópticas. El instrumento de pinzas ópticas utiliza láseres enfocados que capturan objetos de alto índice de refracción. La luz que incide sobre la partícula genera un *momentum* (fuerza) sobre ella y, según el ángulo de difracción, empuja la partícula en dirección opuesta con la misma fuerza. Si la luz incide en el centro de la partícula, los 2 ángulos de difracción se cancelan resultando en una fuerza total que atrapa a la partícula en el centro del foco (42) (Ver figura 1). Por otro lado, una porción de la energía de la luz incidente se dispersará debido a la reflexión sobre la superficie de la partícula (*scattering*). Esta fuerza no compensada resulta en un vector que aleja a la partícula de la trampa óptica. En el caso de trampas ópticas con un ángulo de enfoque muy agudo, esta fuerza no es despreciable y puede desplazar a la partícula, imposibilitando la captura. Por esta razón, algunas pinzas ópticas utilizan dos haces de luz de propagación opuesta (42).

El equipo de pinzas ópticas arroja un valor de desplazamiento en nanómetros que es dependiente de la fuerza de la trampa óptica. Si se considera la trampa óptica como un resorte virtual que atrae a la partícula hacia el centro de la trampa, entonces la fuerza de la trampa se define por $F = k \Delta x$, donde Δx es el desplazamiento de la partícula en la trampa (nm) y k la constante del resorte (stiffness) (pN/nm) (Ver figura 1). A pesar de que en un rango de fuerzas bajas, la trampa óptica es lineal y puede transformarse directamente un valor de fuerza en una distancia en nanómetros recorridos, el fenómeno es más complejo cuando los

rangos de fuerzas son mayores pues a diferente fuerza el ADN tendrá un diferente número de nucleótidos por nanómetro de desplazamiento, según WLC (43–45).

Aprovechando las propiedades de los láseres, es posible medir las perturbaciones que ocurren cuando una microesfera atrapada en una trampa óptica es desplazada del centro. Así, las trampas ópticas permiten manipular objetos pequeños como microesferas de poliestireno con una alta precisión, y registrar en tiempo real los desplazamientos y fuerzas que actúan sobre ellas.

Para aprovechar estas capacidades en el estudio de la transcripción, moléculas de ARNP en elongación son unidas a la superficie de una microesfera que es sostenida en una trampa óptica, mientras que uno de los extremos del ADN molde está unido a otra. Durante el proceso de elongación, se puede inferir la posición de la ARNP en el ADN molde mediante el monitoreo del movimiento de las dos microesferas. Además, el trabajo con pinzas ópticas permite la aplicación de fuerza sobre la enzima mientras esta se desplaza a lo largo del molde. Estudiar el efecto de la fuerza sobre el movimiento de la ARNP ayuda a comprender cómo este motor molecular transforma la energía química en trabajo mecánico (46).

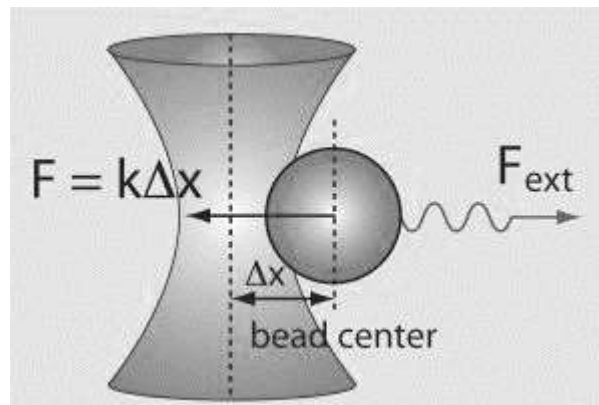


Figura 1. Esquema general de la acción de la fuerza sobre el bead en la trampa óptica. Figura tomada de <http://maillardlab.org/optical-tweezers/>

2. Transcripción bacteriana

La transcripción es un proceso altamente regulado durante el cual la información genética almacenada en el ADN es copiada a ARN. El ARN producido durante el proceso puede ser traducido a proteínas (ARN mensajero), o cumplir de frente alguna función, ya sea de transferencia (ARN de transferencia), regulación (micro ARN), estructural (ARN ribosoma) o catálisis (ribozimas).

La transcripción es un proceso complejo y puede dividirse en tres etapas básicas: Iniciación, elongación y Terminación. Durante la iniciación se da el reconocimiento del promotor, la separación de las cadenas de ADN y la síntesis inicial del ARN para formar el complejo ternario. Una vez establecido el complejo ternario la ARNP se libera del promotor y la enzima inicia la elongación hasta alcanzar una señal terminadora y finalizar el proceso (1).

2.1. Elongación de la Transcripción

La elongación se inicia una vez que se ha sintetizado un ARN de 9-11nt que estabiliza el complejo ternario y entonces la ARNP se libera del promotor. El complejo ternario de elongación (TEC), formado por ADN, ARN y ARNP, es muy estable gracias a las interacciones ADN-ARN, ADN-ARNP y el plegamiento del ARN naciente y puede resistir una tensión de hasta 3 pN (47-51).

La elongación es una fase muy compleja que puede dividirse en dos etapas: elongación activa, donde se sintetiza ARN a través de la condensación de nucleótidos y liberación de pirofosfato (PPi), y una fase de pausas que consiste en estados incompetentes para elongación (47).

Elongación Activa (“*on-pathway*”)

En esta fase la polimerización del ARN por la enzima es muy procesiva y la ARNP se desliza sobre el ADN molde incorporando nucleótidos que obtiene de la reacción de condensación de los NTPs (49). La ARNP utiliza la energía de la incorporación de NTPs en la cadena de ARN para avanzar sobre el ADN dando pasos de $3.7 \pm 0.6 \text{ \AA}$ (valor experimental entre bases y que es muy similar a la distancia entre pares de bases en el ADN-B: $3.4 \pm 0.5 \text{ \AA}$) (52). El modelo más aceptado para el desplazamiento de la ARNP durante la elongación es el de “*sliding-clamp*”. Este modelo sostiene que la ARNP sufre movimientos oscilatorios hacia atrás y hacia adelante sobre el ADN (53) y que la incorporación de NTPs dirige el movimiento downstream sobre el molde. La ARNP trasloca de forma uniforme con una tasa de transcripción promedio de 9 – 15 nt/s (53–58).

La ARNP durante la elongación se comporta como un motor molecular que convierte energía química en trabajo mecánico y el modelo más aceptado de como realiza esta conversión es el “*Brownian ratchet*”. Este modelo plantea que la ARNP experimenta un movimiento browniano, y se encuentra fluctuando entre el estado traslocado y no traslocado y que una dirección (downstream en el ADN molde) es estabilizada por la unión e hidrólisis de NTPs originando el desplazamiento neto unidireccional de la enzima (47).

El modelo cinético actual reconoce 4 estados durante la fase de elongación “*on pathway*”: Pre-translocación, post-translocación, unión y estabilización de NTP, y adición de 1 nt al ARNm y liberación de pirofosfato (PPi) (37).

Pausas (“*off-pathway*” o fuera de ruta)

Durante la actividad de la ARNP, el estado de elongación activa se encuentra interrumpido por pausas de distinta duración y frecuencia (38,40,59). Las pausas son importante blanco de reguladores de transcripción como NusA, NusG, GreA, GreB (60,61). Durante las pausas, la enzima se moviliza en ambas direcciones sobre el ADN (0 – 5 pb), pero sin polimerización del ARN (62). Con métodos de moléculas individuales se ha estudiado el origen de las pausas, y se ha planteado que estas son de naturaleza difusiva. Muchos experimentos apoyan este modelo difusivo y proponen que el movimiento de la ARNP en pausas es impulsado por la energía térmica del medio (41,51,56).

Las pausas son muy diversa y pueden clasificarse de distintas maneras. De acuerdo a su vida media, se dividen en cortas (< 20 segundos) con desplazamientos estimados de 0 – 2 nt, y largas (mayor a 20 segundos) con desplazamientos de 3 – 5 nt (62,63). Por otro lado, las pausas pueden clasificarse según su origen en: pausas inducidas por el *backtracking* de la ARNP sobre el ADN (*upstream*) e introducción del extremo 3' del ARN en el canal secundario de la ARNP; pausas inducidas por horquillas en el ARN naciente; pausas inducidas como “mecanismo de corrección de errores”; y pausa elemental ó ubicua, caracterizada por la ausencia de desplazamiento y que precede a todas las mencionadas (47).

3. La ARN polimerasa

Las ARNP multiméricas se conservan en gran parte de los organismos vivientes y en bacterias un solo tipo de ARNP es la encargada de la síntesis de todos los ARNs (ARNm, ARNt y ARNr). Las subunidades de la ARNP están codificadas en los genes *rpoA* (subunidad α), *rpoB* (β), *rpoC* (β'), *rpoD* (σ) y *rpoZ* (ω) (64). Esta enzima se encuentra en dos formas: la ARNP núcleo y la holoenzima. La ARNP núcleo tiene un peso molecular aproximado de 400 kDa y está conformada por dos subunidades α (αI y αII) y las subunidades β , β' y ω . La holoenzima está formada por la enzima núcleo unida a la subunidad σ , y tiene un peso total aproximado de 470 kDa (varía dependiendo del tipo de factor σ) (65).

Las estructuras de la holoenzima ARNP han sido determinadas con alta resolución en *E. coli* y *T. thermophilus* (3.7 y 2.6 Å, respectivamente) (66,67). Las subunidades α de ambas tienen dos dominios funcionales conectados por un puente (13-36 aminoácidos). Los dominios amino-terminal de la subunidad α (α -NTD) se unen entre sí para formar el núcleo al cual se unen las subunidades β y β' (68). Por otro lado, los dominios carboxilo-terminal (α -CTD) son sitios de unión para factores de transcripción y pueden unirse cada uno a un elemento *upstream* (UP) del ADN (69–71).

Las subunidades β y β' forman juntas la denominada “Pinzas de cangrejo” de la ARNP, y en la unión de estas se encuentra el sitio activo de la enzima y el sitio de unión al ADN (68). En el sitio activo (en la subunidad β') se reconocen los dominios *Trigger loop/helix* (TLH) y *Bridge helix* que cumplen funciones en la unión, hidrólisis y adición NTPs (72–74). En el sitio activo se encuentra el

motivo DFDGD, del dominio *double-psi* β barrel (PDBB), encargado de quelar dos átomos de Mg^{+2} que forman complejos de coordinación con los NTPs y son esenciales para la polimerización del ARN (75).

Por otro lado, la ARNP tiene un canal secundario para el ingreso de los NTPs (10 – 12 Å de diámetro) y un canal salida para el ARNm naciente (3) . (Ver figura 2).

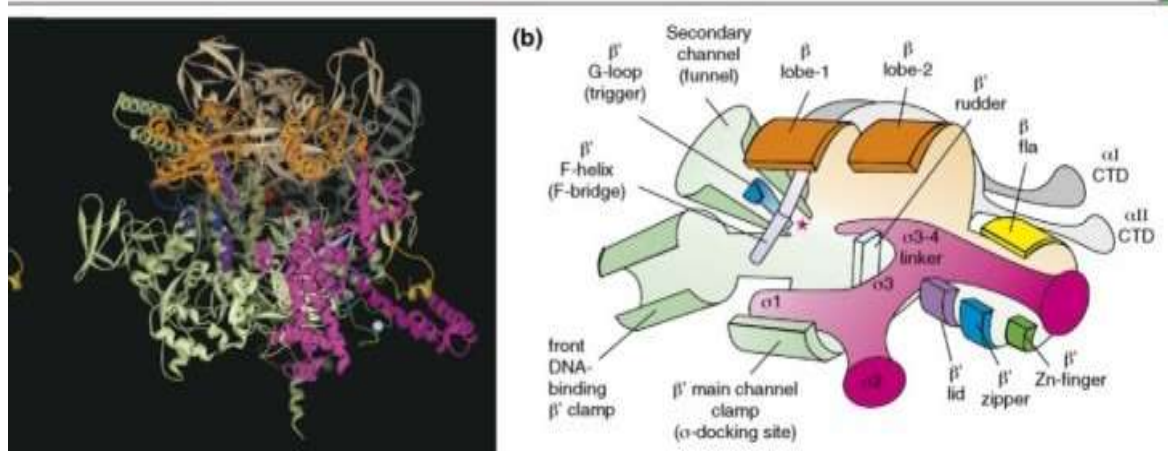


Figura 2. Estructura y función principal de las subunidades de la ARNP. A la izquierda se muestra la estructura real. La parte b (a la derecha) muestra un esquema donde se observan las subunidades principales y las estructuras internas que se mencionan en el texto. Los colores en ambas figuras corresponden a: naranja=subunidad β , rosado=subunidad σ , verde=subunidad β' , gris=subunidad α . Tomado de *RNA polymerase:vehicule of transcription* (76).

El borde delantero del TLH (β' 930-941 y β' 1130-1137) se encuentra desorganizado formando el *trigger loop*, pero tras interactuar con los NTPs, se pliega en dos α -hélices (*trigger helix*) y ubica de forma estérica a los reactantes de la catálisis (73,74). El TLH de la ARNP de *E. coli* tiene una gran inserción (Eco β' í6, β' 942-1129) que separa al TLH en dos regiones: TLH I (β' 930-941) y TLH II (β' 1130-1137). Eco β' í6 por sí solo se encuentra normalmente desorganizado, pero una vez que interactúa con el ADN cumple una función muy importante en la

formación de complejos abiertos (RPO), el ingreso a pausas en elongación y terminación de la transcripción (3,77).

La subunidad omega (ω), es la más pequeña y se ubica en la base de β' (77). La subunidad ω favorece la formación del complejo $\alpha 2\beta\beta'$, y es necesaria para impedir la agregación de la proteína (70). La ARNP núcleo puede realizar la catálisis, pero no puede reconocer promotores específicos y requiere de la subunidad σ para iniciar la búsqueda del promotor y formar el complejo transcripcional (78).

4. La ARN polimerasa de Mtb

La ARNP de Mtb, al igual que la de otras bacterias; es una proteína multimérica formada por 2 subunidades α , una β , una β' , una ω y una σ . Las secuencias de estas subunidades son altamente conservadas y la forma en que se organizan en el espacio e interactúan, entre sí y con el ADN, es similar a lo reportado para la enzima de *E. coli* y *Thermus Thermophilus* (10,25).

Gracias a la reciente obtención de cristales de la ARNP de Mtb en complejo con ADN, se han revelado detalles desconocidos de la estructura de esta enzima. Se corroboró las similitudes estructurales con la ARNP de *E. coli* y *T. Thermophilus*, pero además se ha identificado un módulo estructural específico de la ARNP de Mtb. Esta estructura específica de Mtb consiste de una secuencia de inserción (SI-Mtb) de alrededor de 100 residuos de aminoácidos en la subunidad β' de la enzima. La SI-Mtb se pliega formando un α -hélice de aproximadamente 70 Å de largo que serviría como una "puerta" que ayuda a atrapar y asegurar el ADN dentro de la hendidura del centro activo (Figuras 3A-B) (25).

En segundo lugar, la estructura de la ARNP de *Mtb* proporcionó información que indica que la orientación de la región σ R1.1 de esta enzima es diferente a la de la ARNP de *E. coli*. Mientras que en la ARNP de *E. coli* está orientada perpendicularmente al sitio de unión del ADN de doble cadena, en *Mtb* está orientado paralelo a este sitio y conjuntamente con el segmento SI-*Mtb* mantiene al ADN en el centro activo (Figuras 3B) (25).

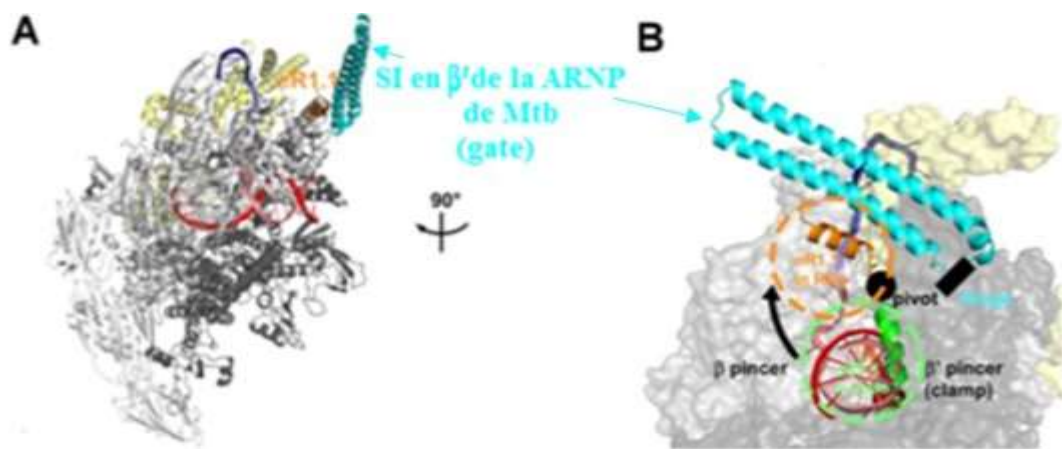


Figura 3: Estructura de la ARNP de *Mtb*. Se muestra en: gris, ARNP; amarillo, sigma A; azul, elemento -10 de la cadena de ADN no molde; rosado, resto de la cadena de ADN no molde; rojo, cadena molde de ADN; turquesa, secuencia de inserción específica de la subunidad β' de Mt; naranja, σ R1.1. A) Estructura general de la ARNP de *Mtb* en complejo con una molécula de ADN. B) Captura del ADN de cadena doble en el centro activo de la ARNP por SI-*Mtb* y σ R1.1. α -hélice verde (σ R1.1 en la holoenzima de *E. coli*) y anaranjada (σ R1.1 en la holoenzima de *Mtb*). Tomado de (25)

Por otro lado, varios trabajos recientes han mostrado que la actividad y regulación de la ARNP de *Mtb* es distinta a la de *E. coli*. Varios experimentos han demostrado que la enzima de *Mtb* por sí sola tiene menor actividad y forma complejos de iniciación menos estables que la enzima de *E. coli* (29) y requiere de la proteína CarD para formar complejos ternarios de elongación abiertos estables(29,79,80). Por otro lado, algunos factores de regulación de la transcripción presentes en ambas bacterias, tienen características estructurales y

funcionales distintas en *Mtb*. Por ejemplo, la proteína NusB regula la terminación de la transcripción al igual que su homólogo en *E.coli*; sin embargo, las diferencias en su estructura han sugerido que su acción se da de manera distinta (81,82)

5. Mutaciones para ARNP y cepas de *Mtb* resistentes

La aparición de cepas drogo-resistentes es actualmente uno de los principales problemas de salud global. La poca cooperación de los pacientes y la baja de adherencia de estos al régimen de medicación han producido la selección y el incremento cada vez mayor en la proporción de cepas resistentes a antibióticos. Cepas multi-drogo resistentes (TB-MDR), capaces de medrar aun en presencia de antibióticos de primera línea (rifampicina e isoniazida), y cepas de resistencia extendida (XDR-TB), que resisten a fármacos de primera y segunda línea se han convertido en un gran problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que en el año 2014 surgieron 159 000 nuevos casos de TB-MDR, y que anualmente surgen alrededor de 40 mil casos nuevos de TB-XDR a nivel mundial (83,84). En el año 2014 se reportó un total de aproximadamente 300 000 casos de TB-MDR en todo el mundo, y se estimó que el 9,7% de ellos eran TB-XDR (12).

La rifampicina (Rif) es un antibiótico de amplio espectro, clave en la estrategia propuesta por la OMS (85). Esta droga se une a la ARNP, bloqueando el inicio de la elongación del transcrito, proceso clave para la supervivencia de la bacteria y de gran interés como blanco terapéutico (27). Además, se ha sugerido que la resistencia a RIF en cepas de *Mtb* perjudica la eficiencia de la actividad de la ARNP, aunque este fenómeno no ha sido completamente entendido (14,86,87).

RIF ejerce su efecto antibacteriano mediante la unión a la subunidad β de la ARNP, a una distancia de 12\AA del sitio activo de la enzima. La droga bloquea

estéricamente el canal de salida de los transcritos de ARN cuando estos alcanzan 2-3 nucleótidos de longitud, inhibiendo así el paso a la etapa de elongación (27). La resistencia a RIF en Mtb se produce en un 95% a 98% por mutaciones en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARNP, y altera residuos que forman contactos directos con la droga (88).

La mayor parte de las mutaciones responsables de la resistencia RIF de las cepas de Mtb se localizan en un corto segmento de aproximadamente 81pb que incluye los codones 507 a 533 del gen *rpoB* (13,89,90). Las mutaciones en esta región incluyen deleciones, inserciones y sustituciones, siendo más frecuentes las mutaciones en los codones asparagina 516, histidina 526 y serina 531, aunque se han encontrado mutaciones en otras regiones del gen, pero con menor frecuencia. Ser531Leu es la mutación predominante en las cepas de MTB resistentes a Rif(13,89–92). Estas mutaciones al afectar la subunidad β alteran no solo la unión de la droga, si no que cambian también la estructura del canal de salida del ARN. Se ha observado que la modificación estructural del canal de salida del ARN disminuye el fitness de la bacteria mutante, y este fenómeno podría ser consecuencia de una pérdida de eficiencia de la transcripción (14).

V. HIPÓTESIS

Los primeros estudios sobre elongación con pinzas ópticas se llevaron a cabo en la ARNP de *E. coli*. Estos estudios mostraron que la elongación consistía de dos fases: 1) una fase de elongación activa donde se sintetiza el ARN, y 2) una fase compuesta por pausas. Ambas fases de la elongación son de interés, ya que diferentes factores de transcripción pueden interactuar con la polimerasa y

modificar su ciclo activo o la probabilidad de entrar o permanecer en un estado de pausa.

Las características del proceso de transcripción que se conocen a la fecha han sido obtenidas de estudios realizados en la bacteria modelo *E. coli* y se han generalizado a todas las bacterias; sin embargo, es necesario estudiar el proceso en *Mtb*. Dado el alto grado de conservación de la secuencia de la ARNP polimerasa de *E. coli* y la ARNP de *Mtb* se ha asumido que el proceso de transcripción es también muy similar. Sin embargo, considerando que la transcripción en *Mtb* puede ser hasta 60 veces más lento que la de *E. coli*, y que trabajos bioquímicos y de biología molecular, así como la reciente estructura publicada de esta enzima, han mostrado que la ARNP de *Mtb* posee diferencias importantes con respecto a la de *E. coli*, podría esperarse que la dinámica de transcripción en ambas bacterias posea también importantes diferencias.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Caracterizar la actividad de la ARN polimerasa durante el proceso de elongación de la transcripción en *Mycobacterium tuberculosis* a nivel de moléculas individuales.

2. Objetivos específicos

- Caracterizar las pausas de la elongación de la ARNP de *Mtb*.
- Caracterizar la cinética de la fase activa de la elongación de la ARNP de MTB.

- Identificar la fuerza máxima ejercida por la ARNP de Mtb (fuerza de arresto)

VII. MATERIALES

1. Plásmidos y Cepas

Para la expresión de la enzima ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizó un stock de glicerol (20% glicerol) de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) almacenada a -80. Esta cepa de expresión contiene dos plásmidos *pETDuet BC_Avi* y *pAcycDuet_AOS* que contienen todas las subunidades de la enzima ARN polimerasa de *Mtb*. El plásmido *pETDuet_BC_avi* contiene las secuencias para la expresión de las subunidades β y β' y una etiqueta de reconocimiento para la enzima BirA (sitio de biotilación Avi-Tag); mientras que el plásmido *pAcycDuet_AOS* posee las secuencias de las subunidades α , ω y σ . (Ver figura 4). Todas las secuencias de los genes fueron optimizadas para la traducción en *E. coli*.

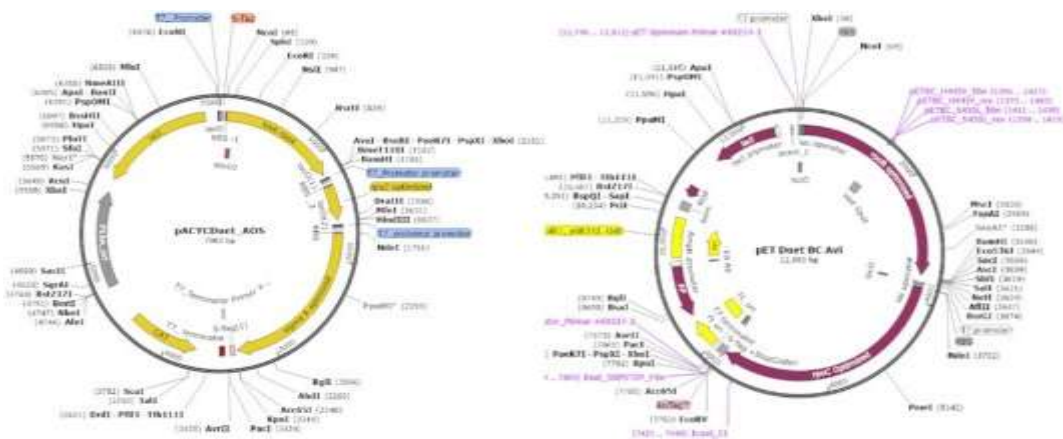


Figura 4: Plásmidos para la expresión de la enzima ARN de *Mtb*. **Izquierda:** *pAcycDuet_AOS* contiene las secuencias de ADN *his-rpoA* (codifica la subunidad α etiquetada con cola de histidina), *rpoZ* (codifica la subunidad ω) y *rpoS* (codifica la subunidad sigma A). **Derecha:** *pETDUET_BC_avi* contiene las secuencias de ADN *rpoB* (codifica la subunidad β), *rpoC* (codifica la subunidad β') y AviTag (codifica la secuencia para reconocimiento por BirA). (93)

Para la obtención de este ADN molde para elongación, se utilizó la cepa *E. coli DH5α* que contiene el plásmido *pUC19_AC50_rpoBC* (Laboratorio de moléculas individuales).

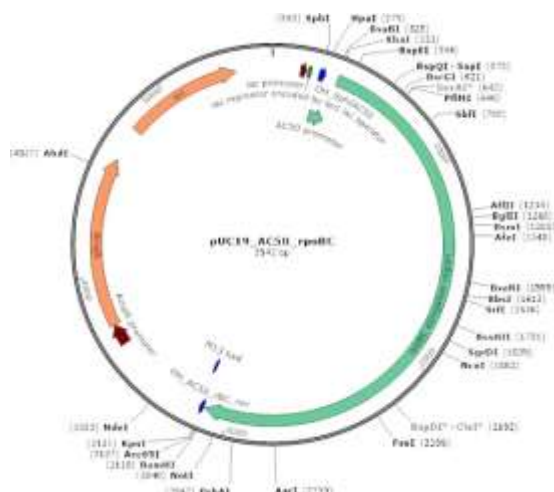


Figura 5. Plásmido *pUC19_AC50_rpoBC* que contiene el segmento de ADN molde para la transcripción de la ARN polimerasa de *Mtb*. (Ref: laboratorio de moléculas individuales).

2. Proteínas

- Proteínas Bir A y Car D (purificadas previamente en el laboratorio de moléculas individuales por el biólogo Omar Herrera).
- ARNP de *E.coli* está siendo usada como control positivo de biotilación (Enzima purificada y proporcionada por el Laboratorio del Profesor Carlos Bustamante, Berkeley, Ca., y cuyo porcentaje de biotilación se ha estimado de más de 80 %).
- ADN polimerasa Phusion (2U/ul) de *Neb*.

3. Fragmentos de ADN y oligonucleótidos

Tabla 1. ADN y oligonucleótidos utilizados en este estudio

Objetivo	Oligos	Secuencia	Referencia
Molde de elongación	F: OH_SphIAC50	'ttgcatgccgacggccagtgaattcaaatattt'	Laboratorio MI
	R:	'/5DiGN/'ccgggtaccgagctcgaattca'	

	Dig_OH_AC50_rB C		
Ensayo de actividad ARNP-Mtb	ARN 7FL	56fam-5-UUCAUCCCCGAGAGG-3	Kireva, 2011
	NDS45	5-CCTATAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACAAGGCGAAAAGAG-3	
	TDS45	5-CTCTTTTCGCCTACTCCCTCTCGATGGCTGTAAGTATCCTATAGG-3	
ADN <i>handle</i>	---	---	Meng Wee, Berkeley, Ca.
ADN con Cy3	---	---	C. Cañari, Berkeley, Ca.

4. Reactivos y equipos para obtención de la ARNP-Mtb y el ADN molde

Enzima ADN polimerasa Phusion, Buffer PCR *Phusion 5X*, (*Neb*), desoxinucleótidos (dNTPs de *Fermentas*), loading dye 6X (*ThermoFisher*), Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb *DNA Ladder Plus*), Agarosa (*Cleaver Scientific Ltd*), *Syber safe* (*ThermoFisher*), Imidazol, Agua ultrapura, GeneJET PCR purification kit (*ThermoFisher*), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (*ThermoFisher*)

Termociclador (AB Applied Biosystems), Transiluminador (*Dark Reader*) y Nanodrop.

5. Reactivos y equipos para el estudio de la elongación de la ARNP

Heparina de sodio grado I-A (SIGMA-ALDRICH), microesferas de poliestireno de 1.0 µm cubierta con estreptavidina y microesferas de carboxyl-poliestireno de 1.0 µm (Spherotech), Trisma® base (SIGMA), KCl (Merk), MgCl₂ hexahidratado (Merk), Ditiotreitól (DTT) (ENZO® life sciences), DMP (Thermoscientific Pierce 21666), anticuerpo policlonal de oveja de anti-digoxigenina (200 µg), BSA (NEB), filtros 0.22µm (Millipore), Jeringas 2ml,

beads magnéticos de streptavidina, biotina, ATP, enzima BirA (*homemade*),
secuencia de ADN marcado con Cy3 que contiene el promotor AP3.

6. Sistema de microfluídica

Microcover glass rectangular N°1, 25x60 mm (1 x 23/8"); nescofilm con orificios hechos con láseres en los extremos; *microcover glass* rectangular con orificios hechos con láseres, *tubbing king* precisión glass 0.025x0.01 mm (IDxOD) para dispensadores; *tubbing king* precision glass 0.040x0.01 mm (IDxOD) para micropipeta; tubo de polietileno P10 0.28x0.64 mm (IDxOD); tubo de polietileno P50 0.58x0.99 mm (IDxOD), Jeringas de 1 ml, agujas, soporte o holder para microcámara.

7. Microscopio de pinzas ópticas.

Microscopio de Pinzas Ópticas de alta resolución. Este equipo tiene una resolución de fuerza de 1pN (picoNewton), de distancia de 0.5 nm (nanómetros) y temporal de 1 ms (milisegundos).

VIII. METODOLOGÍA

1. Obtención de ARNP de Mtb

La enzima ARNP de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa *H37Rv* ha sido expresada y purificada utilizando el protocolo estandarizado por el biólogo Omar Herrera (93). En todos los casos, las bacterias fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con el antibiótico correspondiente a 10µg/ml (Ampicilina para la que contenía a *pAcyc Duet_AOS*, y Cloranfenicol para la que contenía a *pETDuet_BC_avi*).

1.1. Plaqueo y selección de la colonia de expresión

Se tomó una alícuota de stock de glicerol de la bacteria BL21 (DE3) que contiene los plásmidos *pETDuet_BC_avi* y *pAcycDuet_AOS* y se plaqueó por agotamiento en una placa de medio LB con agar y los antibióticos adecuados. Se dejó crecer a 37 °C por 16 horas y luego de eso se seleccionó 4 colonias al azar y se preparó cultivos preinóculo de 1ml (1 para cada colonia) y se dejó creciendo 16 horas a 37°C y a 220rpm. Con cada preinóculo se inoculó cultivos de 100 ml de LB, suplementado con los antibióticos respectivos, (1 matraz de 100 ml por cada colonia) y se dejó crecer nuevamente a 37°C y a 220rpm por alrededor de 4 horas (OD_{600 nm}=0.7). Una vez obtenido el OD adecuado, se agregó IPTG a una concentración final de 0.3mM y se dejó induciendo por 4 horas. Finalmente se obtuvo el pellet bacteriano para cada cultivo centrifugando a 10000 rpm por 20 minutos y se guardó en frío.

LISIS: Se lisó cada pellet resuspendiéndolo en 500 ul de buffer de lisis y se purificó parcialmente en 100 ul de resina de níquel previamente equilibrada con Buffer de lavado. (La composición de los buffers se especifica en el anexo 1). Finalmente, se espera que la enzima ARNP de Mtb quedé unida a la resina. Con la enzima unida a la resina se evaluó la actividad y la expresión de cada colonia.

Ensayo de expresión: se corrió las muestras de ARNP unida a la resina de níquel y el *flowthrough* respectivo en un gel de electroforesis de poliacrilamida al 8 % (SDS-PAGE 8%) junto a un marcador de peso molecular para comparar la cantidad de enzima retenida. (Ver figura 6a).

Ensayo de actividad: se llevó a cabo ensayos de transcripción en gel de poliacrilamida al 20% con urea. En estos experimentos se utilizó el oligo marcado con fluoresceína (RNA 7FL) y una burbuja artificial de iniciación. El experimento se realizó según la referencia y el protocolo se resume en la tabla 2 (48,94). Los resultados pueden verse en la figura 6b. La presencia e intensidad de las bandas G7, G8 y A9 son indicadores directos de actividad de elongación de la ARNP de Mtb. Se observa que el carril correspondiente a la colonia 1 es el que muestra mayor actividad de elongación.

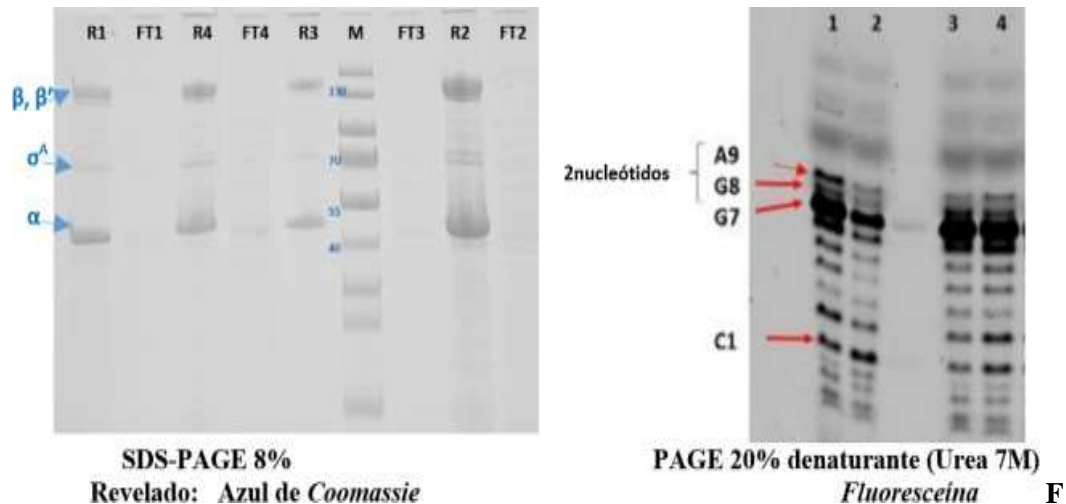


Figura 6. Comparación de la actividad y expresión de la ARNP de *Mtb* entre colonias de *E.coli* recombinante. 6a. SDS-PAGE 8% que muestra el *flowthrough* (FT) y la fracción unida a la resina de níquel (R) para cada una de las colonias. Las bandas señaladas corresponden a las subunidades de la ARNP de *Mtb*. **6b.** Resultados del ensayo de actividad de la enzima ARNP de *Mtb* de cada una de las 4 colonias evaluadas. Los carriles 1-4 (enzima de las colonias 1 al 4 respectivamente) muestran todas las bandas de ARN (G7, G8, A9) que indican la actividad de elongación de la ARNP. C1, G7, G8 y A9 representan que dicha banda corresponde al transcrito hasta la citosina en la posición +1, guanina en la posición +7 (*Stall complex*), guanina en la posición +8 y adenina en la posición +9, respectivamente.

1.2. Cultivo e inducción

Se cultivó la bacteria BL21 (DE3) que contiene los plásmidos *pETDuet_BC_avi* y *pAcycDuet_AOS* en 3 litros de medio LB suplementado con Ampicilina [100ug/ml] y cloranfenicol ([30ug/ml]) utilizando preinóculos de 5ml por cada litro de cultivo. Se dejó crecer el cultivo a 37°C y en agitación fuerte (220rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (OD600) de 0.7. Luego se añadió IPTG a una concentración de 0.3mM y se dejó expresando overnight a temperatura ambiente (25°C) y 220rpm.

Se obtuvo el pellet del cultivo centrifugando a 6mil rpm por 30 minutos.

Este pellet bacteriano de 9.45g se resuspendió 40ml de buffer PBS 1x, pH

7,4 (al que se le añadió justo antes de usar Beta-mercapto etanol y 4 pastillas de cocktail inhibidor de proteasas). Se homogenizó y se lisó durante 3 ciclos a 15 mil psi de presión en un homogenizador *Avestin*. Toda la lisis se realizó a 4°C. El lisado celular se centrifugó a 10 mil rpm por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante recuperado se diluyó con buffer PBS 1x hasta un volumen final de 60 ml.

1.3. Primera biotilación con BirA

La biotilación se llevó a cabo con el lisado celular diluido en PBS. Se añadió a los 60 ml de lisado, D-biotina ([] final=36uM), ATP ([]final=1mM), MgCl₂ ([]final=5mM) y enzima Bir A ([]final=0,3uM). Se incubó en baño maría a 25°C por 30 minutos. Luego la muestra se mantuvo a 4°C para proceder a la purificación.

1.4. Purificación

Se procedió a la purificación de la ARN polimerasa de Mtb siguiendo el protocolo de purificación propuesto por Omar Herrera (93):

1) Cromatografía de afinidad con resina de níquel (*HisTrap* 5ml GE). Se equilibró con 6 volúmenes de columna de buffer de alta sal (ver anexo 1) a un flujo de 5 ml/ minuto. Se inyectó la muestra diluida con el buffer de alta sal a la columna de níquel a un flujo de 1 ml/minuto. Se lavó con 3 volúmenes de columna con buffer de alta sal. Luego se lavó con 6 volúmenes de buffer de baja sal. Se lavó con 5 volúmenes de buffer de baja sal más imidazol a una concentración final de 100mM. La elución de

la muestra se realizó con buffer de baja sal más imidazol a una [] final de 200mM.

2) Se realizó la electroforesis de las fracciones obtenidas en gel SDS-policrilamida 8% con buffer tris glicina. El gel se corrió a voltaje constante de 100 voltios por 1 hora y el revelado se realizó con tinción de azul de *comassie (resultados no mostrados)*

3) Cromatografía de intercambio iónico con columna MonoQ (GE). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de buffer TGED[0] a un flujo de 1 ml/minuto. Las fracciones que contenían las bandas correspondientes a la ARNP de Mtb se mezclaron y diluyeron con buffer TGED [0]. Se inyectó la muestra diluida a un flujo de 0.25 ml/minuto. Se lavó la columna con 5 volúmenes de buffer TGED[0]. Se lavó la columna con un gradiente de sal de 0 a 35mM de NaCl. La elución se realizó con un gradiente de 30 hasta 50 mM de NaCl. Se colectó todas las fracciones y se esperaba que la muestra eluyera a 37 mM de NaCl.

4) Las fracciones que contenían las bandas correspondientes a la ARNP de Mtb se diluyeron en buffer de almacenamiento y se guardó a -80 en alícuotas de 2ul cada una y a una concentración final de 2uM.

1.5. Ensayo de actividad de la enzima ARNP de *Mtb* purificada

La actividad de la enzima se verificó llevando acabo un ensayo de transcripción en gel de poliacrilamida. Para este ensayo se utilizó una

burbuja artificial y un ARN cebador marcado con fluoresceína (RNA7FL) (48,93).

Tabla 2. Protocolo del ensayo de actividad de la enzima ARNP

Annealing del hibrido

RNA7FL	6	μM
Hebra de ADN TDS45	6	μM
TB40	1	X
H ₂ O	Hasta 30 ul	
	Volumen final	30 ul

Incubar de 45 a 25 °C, rampa 1°C/minuto

Preparación del TEC

H ₂ O	Hasta 10 ul	
TB40 (DTT)	1	X
Hibrido	3	μM
ARNP unida a la resina	0.1	μM
	volumen final	10 ul

Incubar 10 minutos a temperatura ambiente

Hebra de ADN (NDS45)	15	Mm
----------------------	----	----

Incubar 10 minutos a temperatura ambiente

Reinicio de transcripción

ATP GTP	0.3	uM
	volumen final	12 ul
Adición de 12 ul <i>Stop</i> buffer 2x		
Calentar a 95°C por 5minutos		

Luego de denaturarlas a 95°C, las muestras se corrieron en gel denaturante (Urea 6M) de poliacrilamida al 20 % con buffer TBE 1x. (Ver resultados en la figura 7a).

1.6. Ensayo de retención de la enzima ARNP de *Mtb* biotinilada con resina de neutravidina

Luego de la primera biotinilación de la ARNP, se realizó un ensayo de retención de la enzima con la resina de neutravidina (NA). Se usó neutravidina (NA) ya que, al igual que la estreptavidina, ésta se une de manera específica a la biotina. Primero, se lavó 5 ul de la resina de NA con 10ul de buffer TB40 1x (3 lavados) y se resuspendió en un volumen de 5 ul de este mismo buffer. Luego se añadió 5ul de la ARNP pura y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se recogió el *flowthrough* y se lavó 3 veces con 10 ul de buffer TB40 1x. Se resuspendió los *beads* con 10 ul de buffer TB40 1x. Se añadió a cada una de las muestras (*Flowthrough*, lavados y resuspensión) *loading buffer* 4x, se calentó a 90°C por 5 minutos y se rescató los sobrenadantes. Se procedió del mismo modo con el control positivo (ARNP de *E.coli* biotinilada) y negativo (resina de neutravidina incubada sin enzima).

Se añadió a cada uno de las muestras (*Flowthrough*, lavados y resuspensión) *loading buffer* 4x, se calentó a 90°C por 5 minutos y se rescató los sobrenadantes. Se corrió todas las muestras en un gel de SDS-poliacrilamida al 8% con buffer tris-glicina 1x. El gel fue revelado con nitrato de plata para una mayor sensibilidad (Ver resultados figura 7b).

Los carriles + indican que la muestra se incubó con neutravidina. NA control es la neutravidina sola. Las bandas correspondientes a las

subunidades beta son señaladas con una flecha. Se observa que hay un *shifting* de estas bandas cuando migran en el gel de electroforesis luego de la incubación con neutravidina. La ARNP de *E.coli* está siendo usada como control positivo de biotilación (Enzima purificada y proporcionada por el Laboratorio del Profesor Carlos Bustamante, Berkeley, Ca., y cuyo porcentaje de biotilación se ha estimado a más de 80 %). Se observa que al incubarse con NA la banda correspondiente a la subunidad beta de *E. coli* desaparece, es decir ha sido retenida por la resina. Por el contrario, para la ARNP de Mtb no hay una disminución observable de la intensidad de las bandas que corresponden a las subunidades beta.

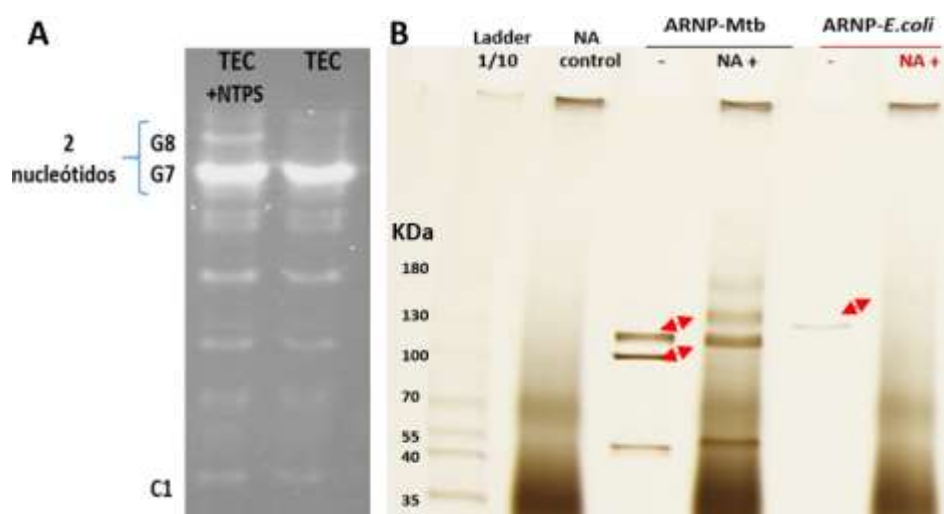


Figura 7. Resultados de la primera biotilación. 7a. Actividad de la Enzima biotilada y purificada. C1 y G7 son bandas que corresponden al transcrito hasta la citosina en la posición +1 y guanina en la posición +7 (*Stall complex*), respectivamente. La banda de ARN G8 indica el reinicio de la actividad de elongación de la ARNP. **7b.** Retención de la ARNP de Mtb luego de una primera reacción de biotilación. Se muestra un SDS-Page 8% teñido con nitrato de plata. Los carriles + indican que la muestra se incubó con neutravidina. NA control es la neutravidina sola. Las bandas correspondientes a las subunidades beta son señaladas con una flecha. La ARNP de *E.coli* está siendo usada como control positivo de biotilación.

1.7. Segunda biotilación con Bir A

Luego de ver los resultados del ensayo anterior (figura 7b), se vio conveniente enriquecer la proporción de enzima ARNP de Mtb biotilada. Se realizó una segunda biotilación utilizando la enzima BirA con un protocolo adaptado que se muestra en la tabla 3 (95). Luego de la biotilación y con el fin de eliminar la biotina y la proteína BirA presente en la reacción, se concentró la enzima utilizando tubos concentradores de tamaño de poro 30kDa. La enzima biotilada terminó en un volumen final de 50ul (Volumen listo para utilizarse en los ensayos de transcripción).

Tabla 3. Biotilación

- 5 ul buffer TGED 10X
- 0.5 ul MgCl ₂ 0.5 M
- 1 ul de ATP 100 mM
- 0.75 ul D-biotin 10 mM
- 40.75ul de agua
- 1ul ARNP-Mtb ~2 uM
- 1ul Bir A (~20uM)

Volumen final: 50ul

Incubar a 30 °C y 700 rpm por 1 hora

- Añadir 0.5 ul de Bir A (~20uM) y 0.4ul de D-biotina 10mM
--

Incubar a 30 °C y 700 rpm por 30 minutos

Concentración

- Añadir 200 ul de TB40 1x y mezclar.	
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C	5 veces
- Eliminar el eluido	
- Anadir 200 ul de TB40 1x	

- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C

Volumen final: 50ul de ARNP-Mtb biotinilada
(Solución enzimática de trabajo)

Para corroborar la mejora de la biotinilación, se realizó un nuevo ensayo de retención con *beads* magnéticos cubiertos de estreptavidina. Se lavó 4 ul de *beads* al 0.5% w/v con 10ul de buffer TB40 1x (3 lavados) y se resuspendió en un volumen de 10 ul de este mismo buffer. Luego se añadió 2 picomoles de la enzima ARNP biotinilada de *Mtb* y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el *flowthrough* y se lavó 3 veces con 10 ul de buffer TB40 1x. Se resuspendió los *beads* con 10 ul de buffer TB40 1x. Se añadió a cada uno de las muestras (*Flowthroughs*, lavados y resuspendidos) *loading buffer* 4x, se calentó a 90°C por 5 minutos y se rescató los sobrenadantes. Se procedió del mismo modo para ambos resultados de biotinilación y para el control negativo (*beads* de estreptavidina incubados sin enzima). Se corrió todas las muestras en un gel de SDS-poliacrilamida al 8% con buffer tris-glicina 1x. El gel fue revelado con nitrato de plata para una mayor sensibilidad (Ver resultados figura 12).

1.8. Ensayo de retención y actividad de la enzima ARNP de *Mtb* purificada luego de la segunda biotinilación

Para este experimento se biotiniló 5ul de ARNP-Mtb pura ([2uM]) y se concentró a un volumen final de 20ul. Con este stock de proteína biotinilada, se preparó stall complex (SC) de elongación utilizando un

ADN marcado con Cy3 y se evaluó la retención de estos incubando con beads de estreptavidina.

Primero se incubó la ARNP de Mtb con CarD:

	[inicial]	Volumen (ul)
ARNP-Mtb	0.5uM	4
CarD	20uM	1

Con este mix ARNP-CarD se preparó los stall complex:

	[inicial]	Volumen (ul)
ADN-Cy3	40nM	5
Buffer A-less	1mM	1
Buffer TB40	10x	1
Mix ARNP-CarD	0.4uM	5
		12

Se incubó a 37°C por 20 minutos. Luego se añadió 1ul de heparina (5mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente por un par de minutos. Se preparó esta reacción con la enzima pura resultante de la primera y segunda biotilación, cada una por duplicado (uno para incubar con los beads de estreptavidina y otro como control). Para cada muestra se utilizó 4 ul de beads de estreptavidina (0.05%) previamente lavados con buffer TB40 1x (3 lavados) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el *flowthrough* y se lavó los beads 3 veces con 10 ul de buffer TB40 1x. Finalmente se resuspendió en 12 ul de buffer TB40 1x y se añadió a cada uno de las muestras (*Flowthrough*, lavados y resuspensión) *loading buffer* 4x, se calentó a 90°C por 5 minutos y se rescató los sobrenadantes.

Se corrió todas las muestras en un gel nativo de poliacrilamida al 4% con buffer TBE 1x. El ADN fluorescente fue visto directamente en el equipo scanner *Typhoon*. (Ver figura 13)..

2. Obtención del molde de elongación de transcripción

La observación de la dinámica de la elongación en pinzas ópticas requiere un ADN molde capaz de generar un transcrito con una extensión de al menos 2 kilobases. Para la obtención de este ADN molde para elongación, se utilizó la cepa *E. coli DH5α* que contiene el plásmido *pUC19_AC50_rpoBC* (*Laboratorio de moléculas individuales*). Este plásmido contiene el promotor fuerte AC50 que es propio de *Mtb* y que ya ha sido utilizado exitosamente para ensayos de transcripción *in vitro*. Ligado a la secuencia promotora, este plásmido posee la secuencia de los genes *rpoB* y *rpoC* de *Mtb* que se transcriben de manera natural como un único ARN mensajero de más de 2.5 kb (24,96).

La secuencia del ADN molde y los *primers* fueron diseñados para que el molde de elongación incluya al promotor AC50, una primera región de elongación inicial de 10 pares de bases *C-less* y un tamaño total de transcrito de 2803 pares de bases. Además el primer *forward* posee digoxigenina en el extremo 5' (*upstream* del promotor, ver figura 9) para poder unirse a beads cubiertos con anticuerpos para ésta.

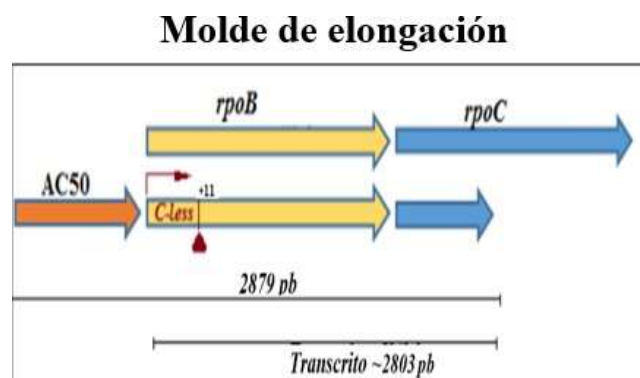


Figura 8. Esquema representativo de la secuencia de ADN molde para elongación de transcripción.

- **PCR del plásmido**

La PCR del segmento de elongación para la ARNP de *Mtb* se llevó a cabo según las condiciones descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de PCR para obtener el molde de elongación

Componentes Reacción PCR 1X		
Agua		37 µl
Buffer HF 5X		10 µl
dNTPs 10mM		1 µl
Oligo Forward 100uM		0.25 µl
Oligo Reverse 100uM		0.25 µl
Plasmido 10ng/ul (<i>pUC19_AC50_rpoBC</i>)		1 µl
ADN polimearasa Phusion		0.5 µl
Programa del termociclador		
Denaturación inicial	35 ciclos	Extensión final
	98°C : 20 segundos	72°C : 2 minutos
98°C:20 segundos	65°C : 10 segundos	
	72°C : 60 segundos	

- **Purificación del amplicón a partir de gel de electroforesis**

Un total de 400 µl de producto de PCR se corrió en un gel de poliacrilamida al 0.8%. Se utilizó el marcador 1kb plus y se tiñó con syber Safe. El peine se adaptó para tener un pozo de mayor tamaño. La banda correspondiente al amplicón se cortó con un bisturí y se purificó utilizando el kit de Thermo. Se cuantificó la cantidad de ADN y para eliminar el exceso de sal se realizó un PCR wash (kit Kiagen). Alicuotas de 10 µl de ADN molde se guardó a -20°C a una concentración de 20 ng/µl.

- **Ensayo de retención con *beads* recubiertos con anticuerpos de digoxigenina.**

Se probó el ADN molde marcado con digoxigenina utilizando los beads recubiertos con anticuerpos para digoxigenina mediante un ensayo de

retención del ADN. Los beads fueron lavados 3 veces en buffer TB40 1x y resuspendidos a una concentración final de 0.5%. Se incubó 24 ng de ADN molde (1 ul) con 1, 3 y 5 ul de los *beads* por 30 minutos a temperatura ambiente. Como control negativo se incubó 24ng del ADN molde con buffer TB40 1X. Todas las reacciones se llevaron a un volumen final de 6ul y se les añadió a cada una 1.2 ul de *loading buffer* 6x. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1% (Figura 15).

3. Elongación del transcrito en pinzas ópticas

- **Determinación de la dilución de ARNP-CarD a utilizar en los ensayos de pinzas ópticas.**

Se evaluó la formación de complejos de iniciación y la actividad de elongación de distintas diluciones del mix ARNP-CarD utilizando un ensayo de EMSA con gel de poliacrilamida al 4%. Las reacciones se prepararon según lo que se indica en la tabla 5.

Tabla 5. **Determinación de la dilución del Mix ARNP-CarD**

					IC		TEC		TEC10		TEC30		TEC50		control	
	[] inicial	[] final			H+	H-	H+	H-	H+	H-	H+	H-	H+	H-	H+	H-
Factor dilución Mix ARNP-CarD	Agua				6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.6
	TB40	10.0	x		1.4	1.4	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.0	1.4	1.4	0	
	Buffer Stall (200 μM ATP, GTP and UTP en TB40 10x)	2000.0	μM	287	μM	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.0	1
	ADN molde	200.0	nM	29	nM	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
	Mix ARNP-CarD	1000.0	nM	72	nM	0.7	0.7	0.7	0.7	0	0	0	0	0	0	0
	10	Mix ARNP-CarD	100.0	nM	7.2	nM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
30	Mix ARNP-CarD	33.3	nM	2.4	nM	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0	0	0
50	Mix ARNP-CarD	20.0	nM	1.4	nM	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0
Incubar 10 minutos a temperatura ambiente																
	Heparina (H)	500.0	μg/ml	33	μg/ml	0.7	0	0.7	0	0.7	0	0.7	0	0.7	0	0.7

Buffer TB40 1x	0	0.7	0.0	0.7	0.0	0.7	0.0	0.7	0.0	0.7	0.0	0.7	0
----------------	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

Incubar 2 minutos a temperatura ambiente

Loading Buffer	10.0	x	1 X	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1
----------------	------	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

Todas las muestras se corrieron en gel de poliacrilamida al 4% en buffer TBE 1X a 100 voltios por 1 hora. Ver los resultados en la figura 14

- Pasivación de los beads

Todos los beads a utilizarse deben pasivarse previamente. Para ello se utilizó el protocolo siguiente:

Tabla 6. Protocolo de Pasivación

Pasivación de los beads con caseína	[] partida		[] final		Volumen	
Beads	5	%	0.8	%	2	µl
20 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA					8	µl
Beta-caseína	6	mg/ml	1	mg/ml	2	µl
Volumen Final					12	µl
Vortexear por 5 minutos						
Centrifugar a 5mil rpm por 5 minutos a temperatura ambiente						
Lavar los <i>beads</i> con 20uL de 20 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA.						
Eliminar 10 ul del sobrenadante						
Beads	5	%	0.5	%	2	µl
20 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA					20	µl
					22	µl
Centrifugar a 5mil rpm por 5 minutos a temperatura ambiente						
Resuspender en 10 uL de 20 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA.						
Beads	5	%	0.8	%	2	µl
20 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA					10	µl
Volumen final					12	µl

4. Preparación del complejo detenido para el ensayo de pinzas ópticas

En este paso, la ARNP escapa del promotor, elonga (sobre un región ausente en C, *C-less*) y se detiene en la posición +10 (la posición +11=C); aquí se forman los complejos de elongación detenidos (*stall complex*).

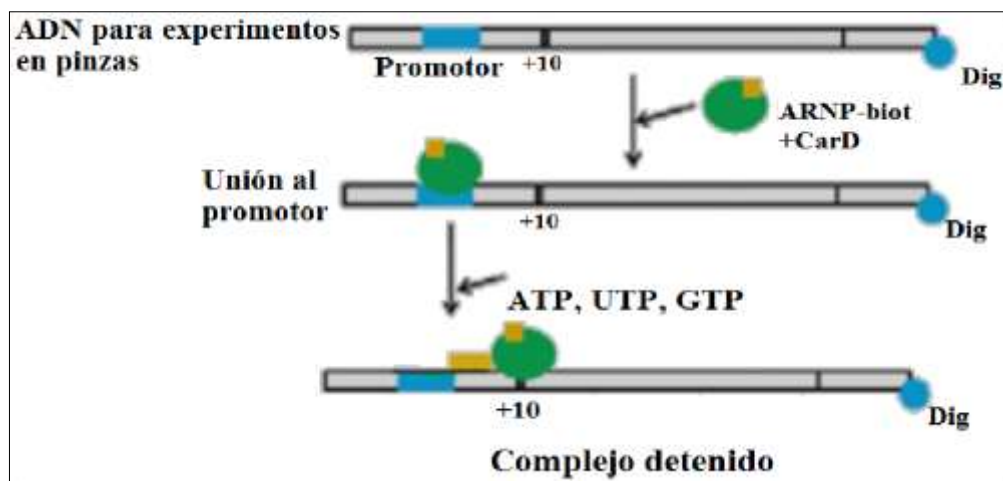


Figura 9. Esquema de la formación de complejos detenidos de elongación de transcripción. En la parte superior: la ARNP biotinilada se une al promotor AC50 del ADN marcado con digoxigenina para formar el complejo de iniciación. Luego se inicia la elongación, tras la adición del buffer C-less de NTPs (ATP, GTP y UTP). La elongación continúa hasta la posición +10 (término del segmento C-less). El ADN de los complejos que no iniciaron elongación es cortado con enzimas de restricción. Figura adaptada de “Efecto de tetrafosfato de guanósina en los complejos de elongación de transcripción bacteriana” (97).

La proteína biotinilada y resuspendida en buffer TB40 1x se usó inmediatamente para la preparación del *Stall complex*. Para ello lo primero que se realizó fue incubar la enzima ARNP-Mtb con la proteína CarD en una proporción 10: 1 (CarD:ARNP). El mix ARNP-Mtb y CarD se incubó junto al ADN molde para la formación del complejo de elongación y se le añadió buffer C-less (contiene los ribonucleótidos A, G y U) para que la enzima avance en el molde hasta la posición +10. Para facilitar la formación de la burbuja de transcripción se incubó a 37°C. Ver detalles del protocolo en la tabla 6.

Tabla 7. Protocolo de Preparación del complejo detenido

Mix ARNP-Mtb + CarD	[] inicial		[] final		Volumen	
ARNP-Mtb biotinilada en buffer TB40 1x	0.040	μM	0.039	μM	50	μl
CarD	20	μM	0.392	μM	1	μl
					51	μl
Incubar 10 minutos a temperatura ambiente						
Stall Complex 2nM	[] inicial		[] final		Volumen	
Agua ultrapura					3.36	μl
Stall Buffer (200 μM ATP, GTP y UTP en buffer TB40 10x)	200	μM	20	μM	0.5	μl
ADN molde	20	nM	2	nM	0.5	μl
Mix ARNP- CarD	39.2	nM	5	nM	0.64	μl
					5	μl
Incubar 20 minutos a 37°C						

La reacción se mantuvo a 4°C hasta su incubación con los beads para el trabajo en el microscopio de pinzas ópticas.

Tabla 8. Incubación del complejo detenido con los beads

Preparación de Beads-Stall complex	[] inicial		[] final		Volumen	
Agua					2.2	μl
Buffer TB40	10	x	1	x	0.3	μl
Beads con anticuerpos para Digoxigenina 0.2%	0.2	%	0.03	%	1.5	μl
Stall Complex	5	nM	3	nM	6	μl
					10	μl
Incubar 20 minutos a temperatura ambiente y colocar en hielo hasta su uso						
Dilución de trabajo Beads-Stall complex	[] inicial		[] final		Volumen	
Stall complex – bead	3	nM	2	nM	2	μl
Heparina	100	μg/ml	50	μg/ml	1	μl
					2	μl
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente						
Buffer TB130	1	x			1000	μl

Para evitar el daño por causa del láser (*photo damage*) sobre la enzima ARNP de *Mtb*, se utilizó un fragmento de ADN como *handle* para alejar a la enzima del foco del láser. Este fragmento de ADN tiene una secuencia aleatoria de 150 pb marcada en el extremo 5' con digoxigenina y en el extremo 3' con biotina. El *handle* se unió a los *beads* cubiertos con anticuerpo para digoxigenina por un extremo, mientras que por el otro se une a la enzima ARNP utilizando como nexo a la neutravidina (NA). Ver esquema del *handle* en la figura

Tabla 9. Preparación de los beads con el ADN *handle*

Preparación de beads con el <i>handle</i> para la ARNP- <i>Mtb</i>	[] inicial		Volumen	
	Stock de oligo-beads	0.2	%	1.5
ATP	1	mM	1	μl
<i>Handle</i> biotilado	5	nM	1	μl
Buffer TB40	2	X	4.5	μl
Agua			1	μl
Ligasa T4	0.1	X	1	μl
Incubar 1 hora a temperatura ambiente y colocar en hielo hasta su uso				
Dilución de trabajo				
Beads con <i>handle</i>	0.03%		2	μl
Heparina	100	μg/ml	1	μl
Neutravidina			1	μl
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente				
Buffer TB130	1	X	1000	μl

Esquema *handle*:



Esquema *handle* + ARNP:

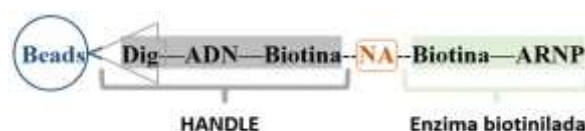


Figura 10. Esquema de unión los beads cubiertos con anticuerpos antidigoxigenina y unidos al ADN *handle* a la enzima ARNP de *Mtb* biotilada.

5. Experimento en pinzas ópticas

El microscopio de pinzas ópticas tiene una cámara, denominada cámara de microfluidos. Esta cámara posee un espacio central hasta donde llegan tres canales dispensadores por el que se suministran los componentes de la reacción: las microesferas con el *handle* de ADN, las microesferas con los complejos detenidos (ARN y ADN) y NTPs. Al colocar la cámara en el equipo las dos trampas ópticas se ubican en este espacio central y es en esta zona donde ocurren los experimentos.

El primer paso fue la inyección de los beads unidos al ADN (en complejo con la ARNP) por uno de los dispensadores. Uno de estas beads se capturó por una trampa óptica. Se repite esta operación para capturar con la otra trampa un bead cubierto con el *handle* de ADN. Las dos trampas se acercaron a fin de que la neutravidina del *handle* reaccionara con la biotina de la ARNP del complejo detenido. Al final de este proceso, el complejo de elongación detenido queda atrapado entre los dos beads (tether) y está listo para el reinicio de la transcripción (56,98) (ver figuras 9, 11).

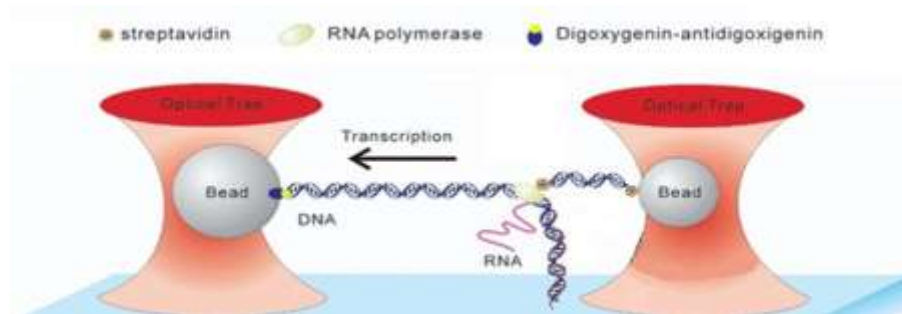


Figura 11. Geometría del ensayo con pinzas ópticas. Uno de los extremos del ADN molde está unido a una microesfera con anticuerpos para digoxigenina. Esta microesfera es atrapada en una trampa óptica, mientras que la ARNP del complejo se une a una microesfera de estreptavidina a través de un ADN “*handle*” biotinilado en un extremo y unido a neutravidina por el otro. La microesfera unida al *handle* es sostenida en otra

trampa. Durante el proceso de elongación, se puede inferir la posición de la ARNP en el ADN mediante el monitoreo del movimiento de las dos microesferas. Adaptado de “*Single -molecule study of transcriptional pausing and arrest by E. coli RNA polymerase*”(40).

Para reiniciar la transcripción, una vez obtenido el tether, se abre el shunt por 60 segundos para permitir el flujo de la solución de NTPs 1 mM (ATP, CTP, GTP y UTP).

6. Análisis de datos a fuerza variable

Los datos de elongación fueron tomados a 0.5kHz y guardados en formato .mat. Todos los datos se analizaron utilizando el programa *MatLab 13.0*. Con los trazas de elongación a fuerza variable se obtuvo información sobre la fuerza que es capaz de soportar la enzima antes de detener su movimiento (*Stall force*). Este valor de fuerza se estimó para cada uno de las 18 trazas obtenidas bajo este diseño. Para ello se consideró como fuerza de detención a la máxima alcanzada por la ARNP antes de detenerse definitivamente. Se consideró que las enzimas detenidas por un tiempo mayor igual a 5 minutos no reiniciarían su movimiento.

7. Análisis de datos a fuerza constante

Los datos de elongación fueron tomados a 1kHz y guardados en formato .mat. En base a los resultados de los experimentos a fuerza variable se escogió 2 valores de fuerza para estos experimentos: 5pN y 15pN. Todos los datos se analizaron utilizando el programa *MatLab 13.0*. La eliminación del ruido y el suavizado de las trazas de elongación se llevó a cabo utilizando un filtro Savitnky Golay de tercer orden y ancho de ventana de 150 datos (56) (Numerical

récipes in C, capítulo 14.8.). Utilizando los datos filtrados, se tomó la derivada de la posición de la enzima en función del tiempo (\dot{x}) y se calculó la velocidad en nanómetros por segundo. Utilizando un umbral de velocidad o dwell time (tiempo de permanencia de la enzima en cada posición), las pausas fueron eliminadas y se calculó la velocidad libre de pausas (37,99). La presencia de pausas se corroboró visualmente para cada traza. Con estos datos, se calculó la densidad (número de pausas/nm) y duración media (en segundos) de estas tanto a 5pN como a 15pN. Además con los datos de pausas, se calculó además la velocidad libre de pausas. Las conversiones de nanómetros a pares de bases se realizó dividiendo la distancia en nanómetros entre 0.34.

Se calculó la media y la distribución de velocidades para todas las moléculas observadas. Utilizando los datos de pausas cortas (<20segundos) se realizó un ajuste a una distribución exponencial de los tiempos de duración de las pausas.

IX. RESULTADOS

Para llevar a cabo los experimentos de elongación de la ARNP de Mtb en el microscopio de pinzas ópticas es necesario contar con la enzima pura y biotinilada de manera óptima. La calidad de la biotinilación de la enzima se evaluó mediante un ensayo de retención con beads de estreptavidina. La biotina se une de manera específica los beads de estreptavidina, por lo tanto cuando la biotinilación es adecuada se espera que tras una breve incubación la proteína se quede retenida en los beads. El *flowthrough* (FT) debe presentar toda la proteína que no se une a los beads y por tanto las bandas observadas en esta muestra, de haberlas, corresponden a las subunidades de la ARNP no biotinilada. Además, la fracción eluída de los beads contiene la proteína biotinilada y la intensidad de las bandas con respecto al total añadido para la incubación nos indica la proporción de biotinilación.

El resultado mostrado en la figura 12 indica que hay una mejor biotinilación luego de la segunda biotinilación de la proteína ARNP. Luego de una primera purificación no se detectó bandas correspondientes a la ARNP en la fracción eluída. Tras la segunda biotinilación, la retención de la ARNP por los beads de estreptavidina se hace evidente por la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades betas de la enzima (señaladas con una flecha roja). Las bandas señaladas con una flecha roja en el *flowthrough* de la segunda biotinilación indican que aún tras la segunda biotinilación hay una buena proporción de proteína no biotinilada (no retenida por los beads); sin embargo,

esta proporción de biotilación fue suficiente para llevar a cabo los experimentos con pinzas ópticas.

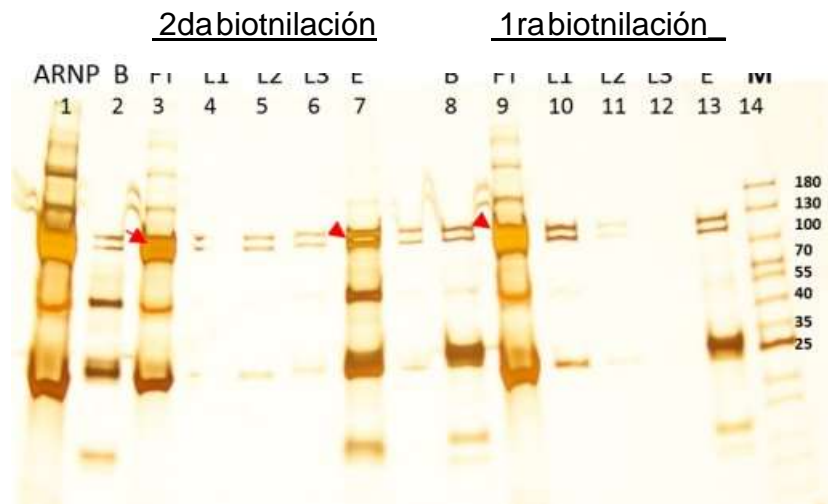


Figura 12. Comparación entre la primera y segunda biotilación. La enzima ARNP de *Mtb* fue incubada con *beads* de estreptavidina. El *flowthrough* (FT) contiene la enzima que no se ha unido a los *beads*. Los carriles rotulados como “E” contienen la proteína que sí se unió específicamente a los *beads*, es decir la proteína biotilada. Con flechas se ha señalado las bandas correspondientes a las subunidades β y β' de la ARNP. Los carriles 2 y 8 corresponden al control negativo. Nótese que además de las bandas correspondientes a la enzima, los carriles 7 y 13 presenta bandas que corresponden a las unidades de estreptavidina presentes en los *beads* (mismas bandas que los carriles 2 y 8).

Para evaluar la actividad y a la vez corroborar la biotilación de la enzima ARNP de *Mtb* tras la segunda biotilación, se preparó *stall complex* (SC) de elongación utilizando un ADN marcado con el fluoróforo Cy3 y se evaluó la retención de estos con *beads* de estreptavidina. El resultado mostrado en la figura 13 indica que la ARNP de *Mtb* mantiene su actividad (forma *stall complex*, señalados con flechas anaranjadas) tanto después de la primera, como después de la segunda biotilación. Sin embargo, la retención de estos *stall complex* por los *beads* solo se observa para la enzima después de la segunda biotilación. Como

control positivo de actividad y a su vez control negativo de biotilación se utilizó la enzima ARNP de *E. coli* comercial (*New England Biolabs*).

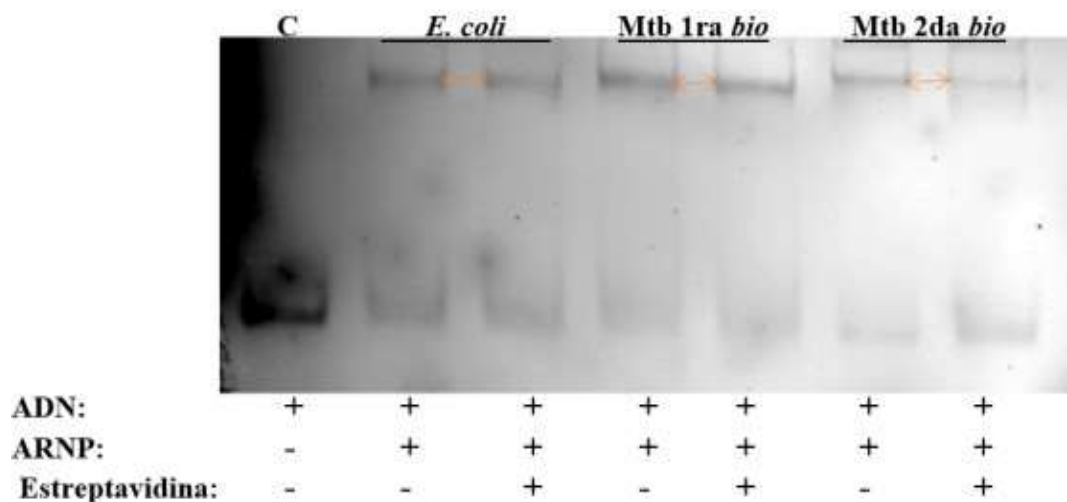


Figura 13. Medición comparativa de la actividad de la ARNP post biotilación. *EMSA* en PAGE 4 %. Se preparó *Stall complex* (SC) de elongación utilizando un ADN marcado con Cy3. La menor migración del SC (al estar unida a la ARNP) en comparación con el ADN control indica la actividad de la enzima (Indicado con flechas en los carriles 2,4 y 6). Al incubarse el SC con los beads de estreptavidina, los SC con ARNP biotilada deben unirse a los beads. Por lo tanto, la intensidad de la banda correspondiente al SC en el FT disminuye su intensidad cuando ha habido retención (carriles 1, 3 y 5). Como control positivo de actividad y a su vez control negativo de biotilación se utilizó la enzima ARNP de *E. coli*. El primer carril (C) corresponde al ADN solo, sin enzima.

La actividad de la enzima ARNP de *Mtb in vitro* requiere de la presencia de la proteína CarD ya que esta ayuda a estabilizar la burbuja de transcripción. Por esta razón todos los experimentos de transcripción presentados en este trabajo tienen como paso inicial la incubación de la ARNP con la proteína CarD (proporción 1:10) (79,93). Para los ensayos de moléculas individuales es importante establecer que cantidad de mix ARNP-CarD es la óptima a incubar con el ADN molde a fin de obtener una cantidad suficiente complejos ternarios de elongación sin que la proporción de proteína con respecto al ADN sea excesiva

(No se desea tener muchas enzimas en un mismo molde de elongación). Se probó distintas diluciones del mix y se evaluó la eficiencia de la formación de complejos de elongación utilizando electroforesis de poliacrilamida. Se añadió heparina a todas las muestras para eliminar las uniones inespecíficas del ADN a las proteínas. Los resultados mostrados en la figura 14 indican que incluso una dilución 1/50 del mix ARNP-CarD es eficiente al formar complejos ternarios y mostrar actividad detectable en el gel de electroforesis. Se tomó este valor de dilución para llevar a cabo todos los experimentos en pinzas ópticas.

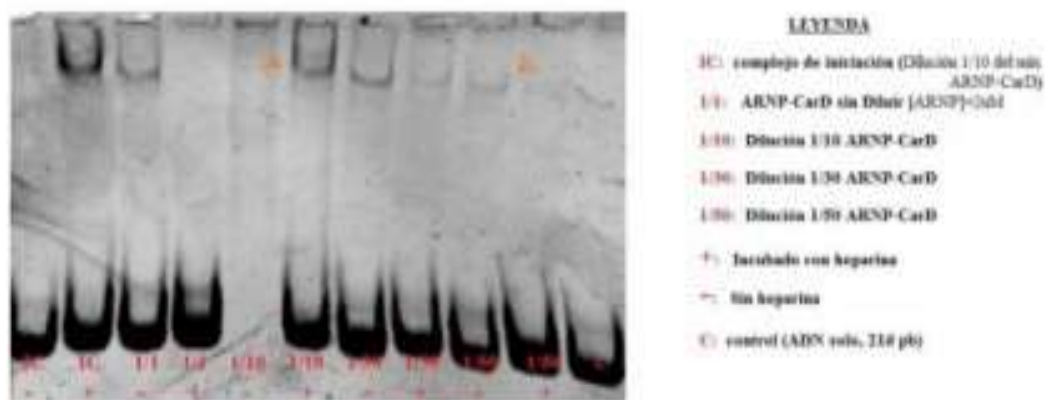


Figura 14. Determinación de la dilución de ARNP-CarD a utilizar en los ensayos de pinzas ópticas. Se evaluó la formación de complejos de iniciación y la actividad de elongación de distintas diluciones del mix ARNP-CarD utilizando un ensayo de EMSA con gel de poliacrilamida al 4%. Las flechas señalan las bandas correspondientes a los complejos de elongación. Estas bandas son indicadores de actividad y se observa que incluso las diluciones 1/50 del mix producen complejos ternarios de elongación y muestran actividad detectable en el gel de electroforesis.

Obtención del molde de elongación de transcripción

Para evaluar la actividad de la ARNP durante elongación en pinzas ópticas es imprescindible contar con una secuencia de ADN larga que sirva como molde de transcripción y que además pueda unirse a un *bead* para su captura por la trampa óptica. Por ello se obtuvo por PCR un fragmento de ADN de 2879 pb que

contiene al promotor AC50, un fragmento inicial de transcripción C-less de 10 pb, un tamaño total de la región a transcribir de 2803 pb y en su extremo 3' posee digoxigenina (ver figuras 8 y 9). Para los experimentos en pinzas ópticas, la digoxigenina del molde se unió a beads cubiertos con anticuerpos para esta molécula. Previo a los experimentos en pinzas ópticas fue necesario verificar que el ADN molde obtenido fuera capaz de unirse a los beads con anticuerpos para digoxigenina. Un ensayo de retención con los beads se llevó a cabo incubando estos con distintas cantidades de ADN molde y luego corriendo las muestras de ADN en un gel de agarosa. La retención del ADN con los beads impide la migración de este en el gel, por ello la intensidad de la banda correspondiente disminuye a medida que mejora la retención (Figura 15).

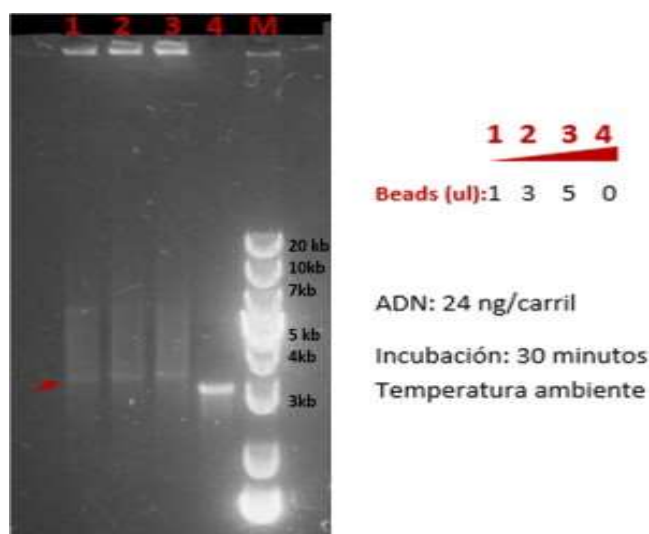


Figura 15. Ensayo de retención del ADN molde. Este ensayo evalúa que el ADN molde se una eficientemente a los beads cubiertos con anticuerpos para digoxigenina. Se observa que 5ul de *beads* retienen la mayor parte del ADN molde. El carril 4 muestra el control negativo (Igual cantidad de ADN molde que los otros carriles, pero sin incubarse con los beads). La flecha roja muestra la banda que corresponde al ADN molde. En los pocillos del gel se observa la banda correspondiente al ADN molde retenido por los *beads*.

Resultados de ensayos con la ARNP de Mtb en pinzas ópticas

El diseño experimental de este ensayo consistió en sostener un único complejo ternario de elongación (ARNP-Mtb, ADN molde y el ARN naciente) entre dos beads de poliestireno sostenido por dos trampas ópticas (Figura 11). La ARNP biotinizada fue unida a un “ADN *handle*” que a su vez estaba unido a un bead de estreptavidina; mientras que el extremo *downstream* del ADN molde se unió a beads cubiertos con anticuerpos para digoxigenina.

El complejo ternario atrapado entre los beads se encontraba detenido en la posición 10 *downstream* del promotor AC50 en el molde de ADN (ver metodología). Para reiniciar la elongación del transcrito, se añadió una solución que contenía los 4 NTPs (C, G, A y U) a una concentración saturante de 1 mM.

Resultados a fuerza variable

Se evaluó la elongación de transcripción de la ARNP de Mtb en modo pasivo. En este modo, las trampas no se desplazan, y a medida que la ARNP avanza sobre el molde de ADN la fuerza que la trampa ejerce sobre ella aumenta. Por lo tanto, en elongación y según la geometría mostrada (Figura 11), la distancia entre los beads de poliestireno se acortó en el tiempo, mientras que la fuerza aumentó hasta que alcanzar un límite contra el que la enzima ARNP ya no pudo avanzar (“*Stall force*”), ver figura 16.

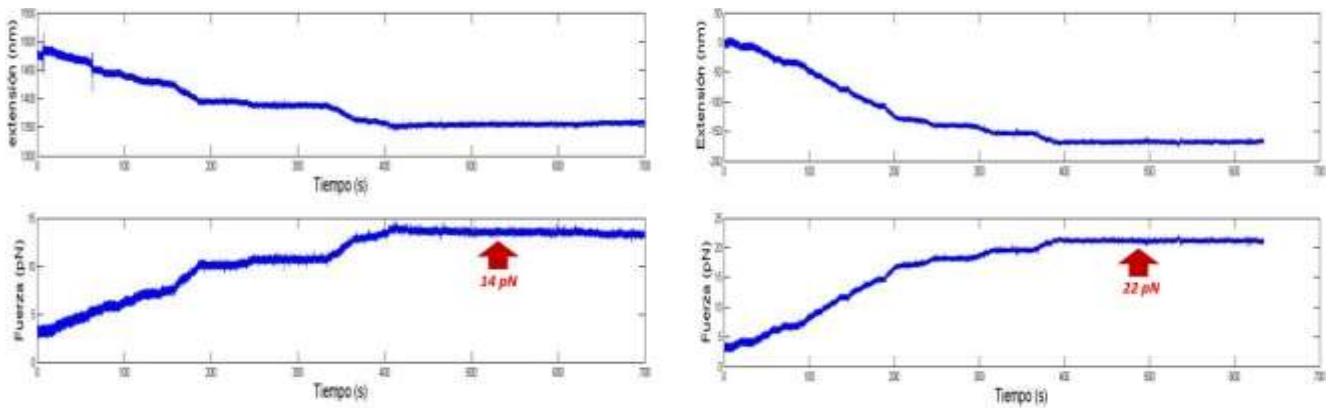


Figura 16. Ejemplos de 2 trazas de elongación de la ARNP de *Mtb* a fuerza variable. Se observa conforme el desplazamiento de la ARNP se desplaza acercando los beads (extensión se hace más negativa), la fuerza sobre la enzima aumenta. Cuando la fuerza alcanza el *Stall force* (señalado con las flechas en rojo), la ARNP se detiene y ya no reanuda su desplazamiento.

La actividad de la ARNP en modo pasivo se registró en tiempo real a 500 kHz y temperatura promedio 20°C. Se obtuvo un total de 17 trazas. Se asumió que la ARNP estaba en un estado de detención definitiva si esta dejó de transcribir y no reanudó la elongación activa después de 5 minutos o más. La fuerza máxima alcanzada por la enzima al momento de su detención definitiva (“*Stall force*”) fue registrada y se promedió obteniendo un valor de $18.63\text{pN} \pm 5.14\text{ pN}$. Se graficó la relación distancia recorrida versus fuerza máxima alcanzada y se ajustó los datos a una relación lineal donde la fuerza aumenta a medida que la ARNP se desplaza.

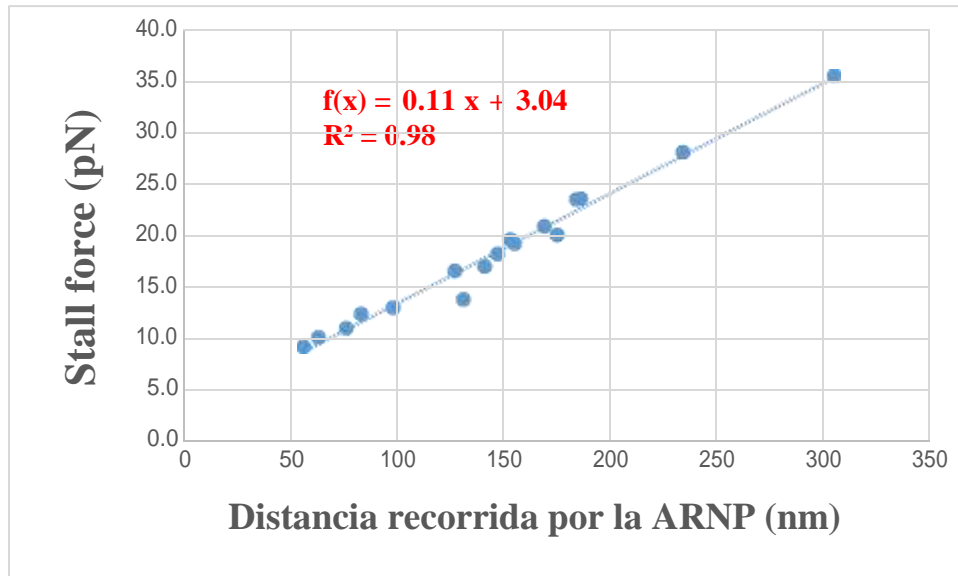


Figura 17. Relación Distancia recorrida versus *Stall force* de la ARNP. Los datos se ajustan bien a una relación lineal ($R^2=0.99$).

Experimentos a fuerza constante

Durante los experimentos a fuerza constante, una trampa (la que sostiene al ADN molde) se mantuvo fija, mientras que la otra (unida a la ARNP a través del *handle*) se desplaza para compensar el avance de la ARNP sobre el molde de ADN durante la elongación. Por lo tanto, en elongación y según la geometría mostrada (Figura 18), la fuerza se mantiene constante, mientras que la distancia entre los beads de poliestireno se acorta en el tiempo cuando se le agrega 1mM NTPs. La actividad de la ARNP de *Mtb* fue seguida mediante gráficas de posición (nm) vs tiempo (segundos) hasta que la enzima entró en estado de arresto (detención definitiva). Ver Figura 18.

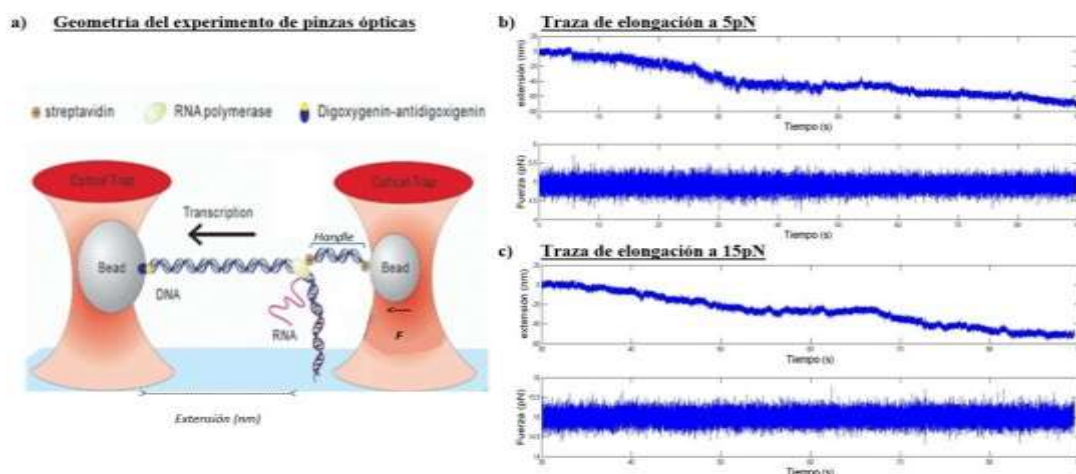


Figura 18. Experimento en pinzas ópticas a fuerza constante. a) Geometría del experimento en pinzas ópticas. b) Ejemplo de una traza de elongación de la ARNP-*Mtb* a fuerza constante de 5pN. c) Ejemplo de una traza de elongación de la ARN polimerasa de ARNP-*Mtb* a fuerza constante de 15pN.

Los datos fueron obtenidos a 1kHz (1000 datos/segundo) de frecuencia. Posteriormente, estos fueron filtrados para minimizar el efecto del movimiento browniano y ruido experimental utilizando el filtro *Savitzky-Golay* (imagen central, figura 19).

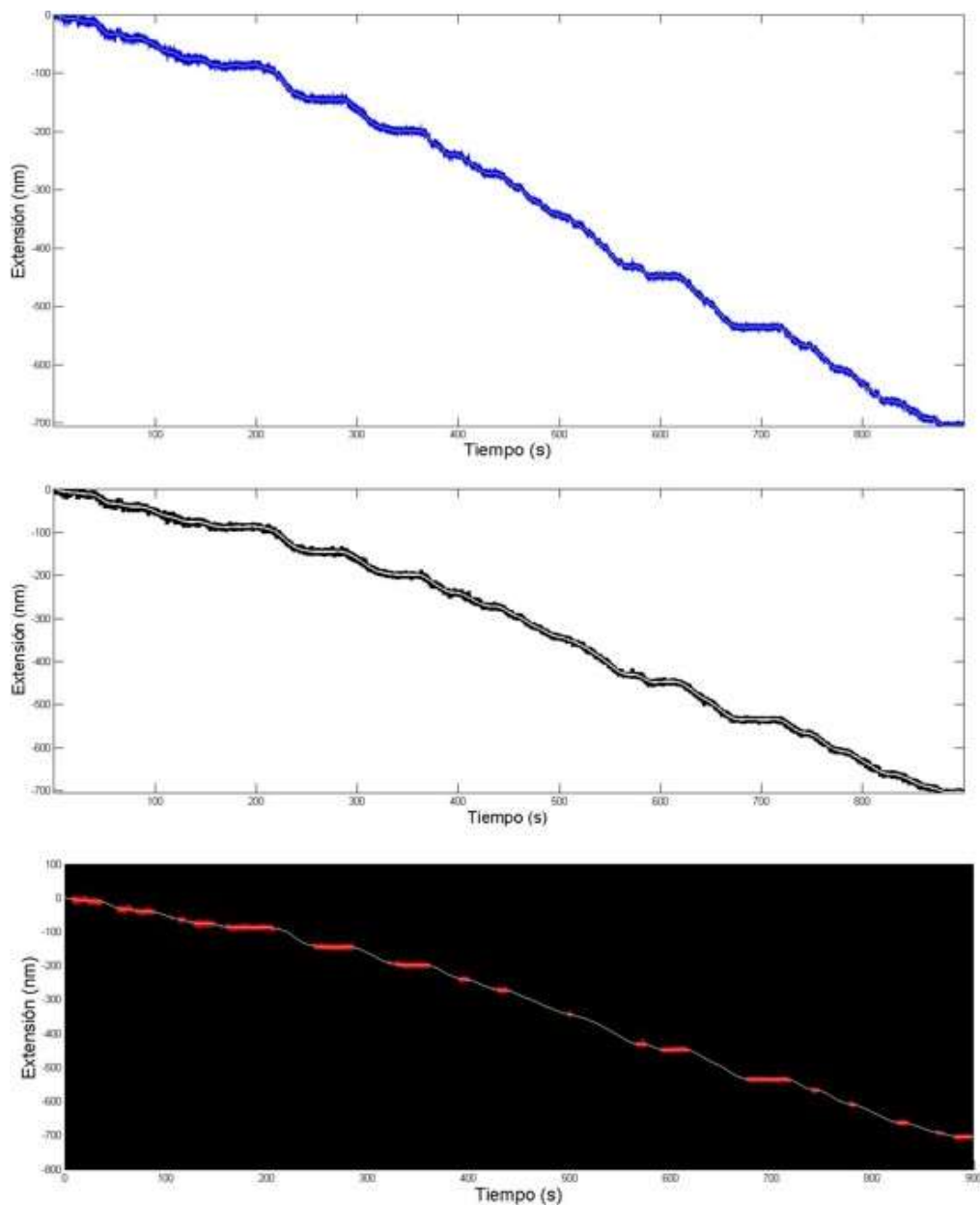


Figura 19. La imagen superior muestra una traza de elongación cruda, sin filtrar. La imagen central muestra la traza luego de ser suavizada y procesada con el filtro *Savitzky-Golay* de tercer orden (traza suavizada, parte central blanca). La imagen inferior muestra la traza filtrada con las zonas de pausa identificadas en rojo.

Con el diseño mostrado en la figura 16, también se realizó experimentos a baja fuerza (5pN) y a alta fuerza (15pN) y se colectaron los datos de 13 trazas para una fuerza constante de 5pN, y de 5 trazas para 15pN. La figura 20 muestra una traza representativa para cada valor de fuerza. Se observa que, en ambos casos, la elongación de la ARNP se encuentra interrumpida por zonas de pausas

de diversa duración; y además, la velocidad instantánea en las zonas de elongación activa (“*on pathway*”) se mantiene constante a lo largo de toda la traza. Bajo las condiciones experimentales descritas ($[NTPs]=1mM$, $20^{\circ}C$), el desplazamiento promedio de la ARNP sobre el ADN molde fue de 688.6 nm para $FC=5pN$, y de 294 nm para $FC=15pN$.

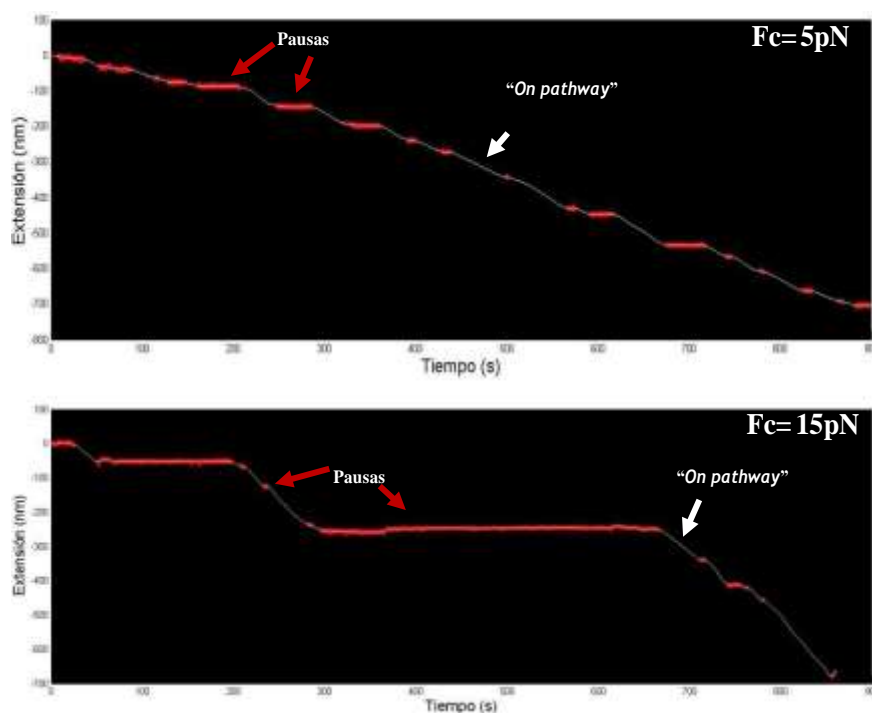


Figura 20. Ejemplo de identificación pausas en la traza a 5pN y 15pN. Las flechas rojas muestran los sitios de pausas, mientras que las flechas blancas muestran las zonas de transcripción activas.

Velocidad de la ARNP de Mtb

Se calculó la velocidad total (desplazamiento total de la ARNP entre el tiempo total) para ambos valores de fuerza constante. La velocidad total a 5pN es 5.78 ± 2.17 nt/s, y a 15pN de fuerza, la velocidad total es de 2.53 ± 0.78 pb/s. Se comparó ambas medias utilizando la prueba *T-student* considerando varianzas

distintas y un nivel de significancia de 0.01. Se obtuvo que la diferencia entre velocidades es significativa, es decir la velocidad total es menor a alta fuerza.

Se determinó el tiempo de permanencia de la ARNP de Mtb en cada posición a lo largo del molde de ADN (“*dwell time*”). Los tiempos de permanencia más largos, mayores al menos por dos desviaciones estándar del promedio del *dwell time*, se señalaron como pausas; mientras que los valores de permanencia más breves corresponden a lugares donde la enzima trasloca añadiendo NTPs (37,52,56).

Considerando solo las zonas de elongación activa (observadas como pendientes señaladas de color blanco en la figura 20) se obtuvo la velocidad libre de pausas (tasa de transcripción activa). Para una fuerza constante de 5pN, la velocidad libre de pausas promedio fue de 6.48 ± 0.4 nt/s (n=13 trazas); mientras que para una fuerza constante de 15pN, la velocidad libre de pausas es de 7.13 ± 0.392 nt/s (n= 5). Se comparó ambas medias utilizando la prueba *T-student* considerando varianzas distintas y un nivel de significancia de 0.01, y no se halló que esta diferencia sea significativa.

La velocidad libre de pausas de la ARNP de Mtb a ambas fuerzas se ajustó a una distribución normal y unimodal con valores de $R^2=0.90$ para 5pN, y $R^2=0.89$ para 15pN (figura 21). En ambos casos la distribución fue de amplia varianza.

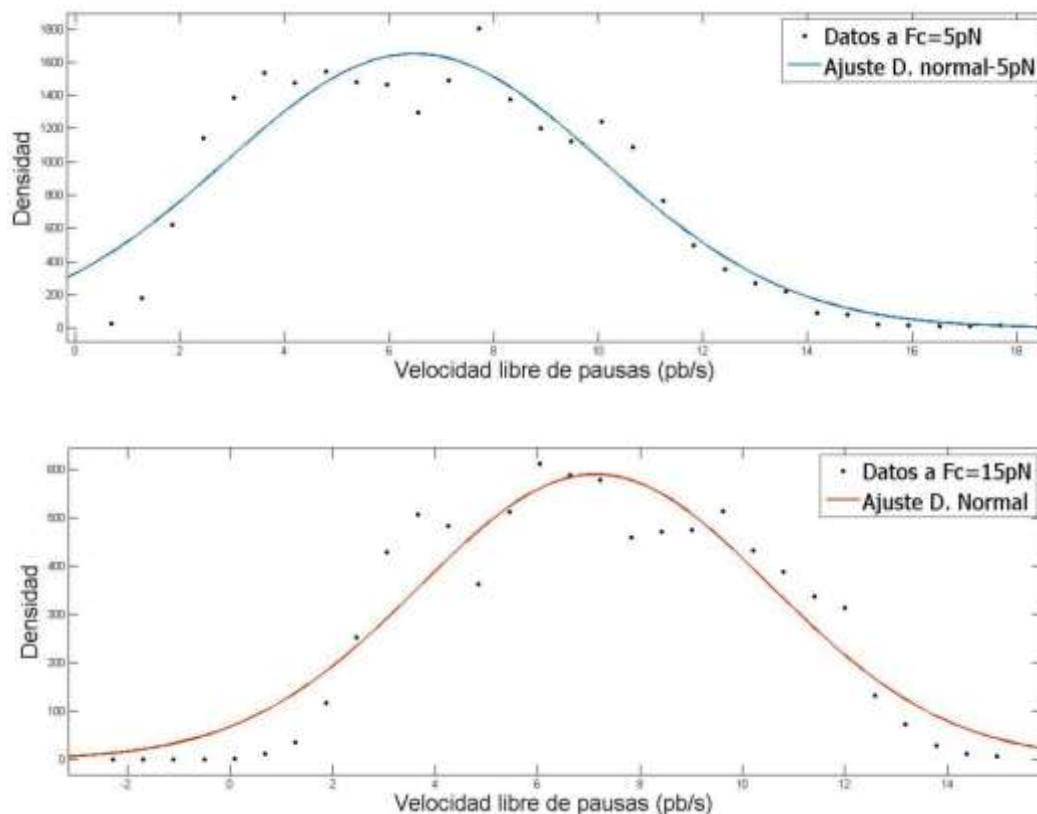


Figura 21. Distribución de velocidad libre de pausas de la ARNP de Mtb a fuerza constante de 5pN (imagen superior) y 15pN (imagen inferior) a 20 °C y [NTPs] de 1mM. Ambos conjuntos de datos se ajustaron a una distribución normal y unimodal ($R^2=0.90$ para 5pN, y $R^2=0.89$ para 15pN). La curva normal de las velocidades a 5pN se encuentra centrada en 2.21 ± 0.14 nm/s (6.483 ± 0.4 pb/s), mientras que para 15pN está centrada en 2.43 ± 0.13 nm/s (7.132 ± 0.392 pb/s). La conversión de nm/s a pb/s se realizó por la equivalencia de 0.34 nm/pb.

La figura 22 muestra la distribución de velocidad libre de pausas para dos trazas representativas de cada experimento a fuerza constante. La velocidad para las 2 trazas a 5pN de fuerza fue 3.38 ± 0.5 nt/s y 7.5 ± 1.44 nt/s, mientras que para las trazas a 15pN fue de 3.94 ± 1.08 nt/s y 7.0 ± 2.34 nt/s. Los valores de desviación estandar son bajos para todas las trazas, sin embargo, como puede notarse existe gran variabilidad entre la velocidad entre trazas a una misma fuerza (Ver figura 21 y 22).

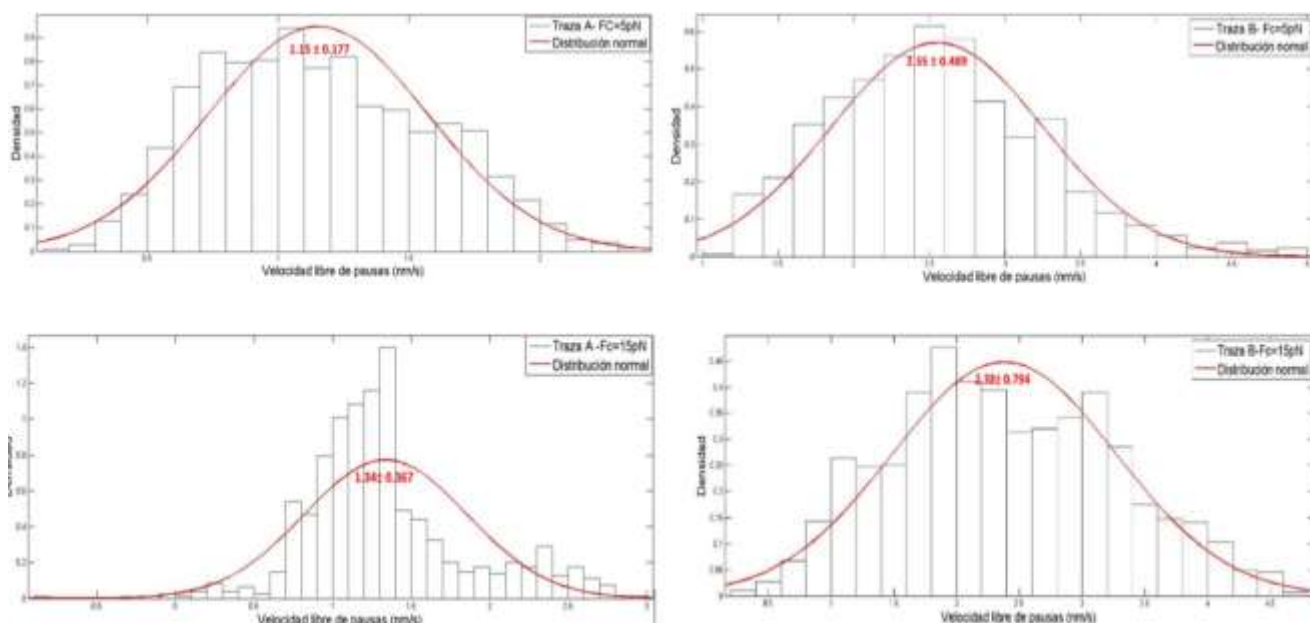


Figura 22. Distribución de velocidad libre de pausas de dos trazas representativas de los ensayos a baja fuerza (5pN, gráficas en la parte superior) y alta fuerza (15pN, gráficas en la parte inferior). Para todos los casos, se ajustó a una distribución normal y unimodal, y se indica el valor correspondiente al centro de la curva normal.

Se generó una tabla con los datos de velocidad libre de pausas para la ARNP de *E. coli* obtenidos por otros autores con pinzas ópticas y bajo similares condiciones a las utilizadas en este trabajo (condiciones saturantes de NTPs, temperatura alrededor de 21°C). Se comparó los datos sobre la ARNP de *E. coli* con los datos de la ARNP de Mtb.

Tabla 10. Velocidad libre de pausas de la ARNP-Mtb comparado con los datos para la ARNP de *E. coli*

	Velocidad libre de pausas (Media ±DE) (nt/s)	# de trazas	Fuerza (pN)	Referencia
Mtb	6.48 ±0.4	13	Fc=5	Este trabajo
	7.13 ± 0.392	5	Fc=15	
<i>E. coli</i>	12.6 ± 3.8	7	0-12	(58)
	10 ± 3	32	<9	(100)
	15 ± 5	28		
	14.5 ± 4	38	0-15	(55)
	14.27 ± 4.5	30	Fc=4	(54)
	9.7 ± 4.8	130	<18	(101)
	11.24± 4.8	7	Fc=4	(97)

*Todos los datos mostrados fueron obtenidos en condiciones similares de temperatura (19-24°C) y de concentración de NTPs ([1mM]). Fc= fuerza constante

Pausas y distribución

Las pausas durante la elongación de la transcripción tienen duraciones muy variables tal como se observa en la figura 23. De acuerdo a las diferencias en la duración y a su origen, las pausas han sido clasificadas en pausas cortas (<20s) y en pausas largas (>20 segundos) (62,63,102,103). Se graficó la distribución de la duración de todas las pausas a 5pN y 15pN. En la figura 23 se puede ver que tanto para 5 pN como para 15 pN, las pausas largas son mucho menos abundantes que las pausas cortas.

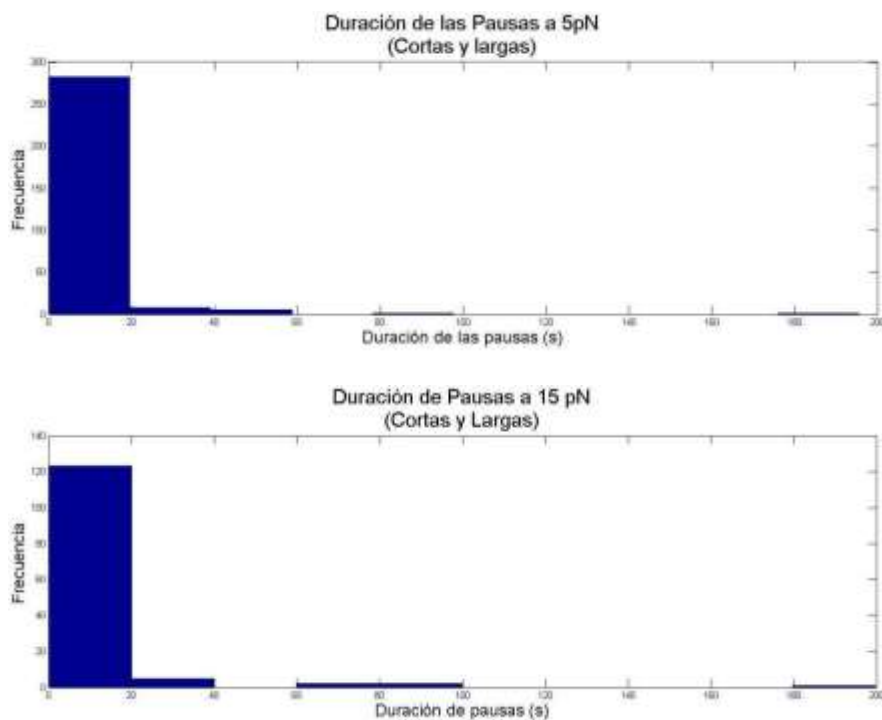


Figura 23. Distribución general de la duración de las pausas a 5pN (n=356) y 15pN (n=146). Las pausas cortas son las más abundantes en ambos casos y en ambos casos las pausas menos frecuentes corresponden a un mismo rango de duración (pausas largas de duración hasta 200 segundos).

Se graficó la distribución de pausas cortas tanto a 5 como a 15 pN y se ajustó estas a una distribución exponencial. La distribución a 5 pN tiene un valor medio de 2.286 ± 0.13637 , n=341. Para la distribución a 15 pN tiene un valor promedio de 2.326 ± 0.20974 , n=132. La menor frecuencia de pausas largas junto a

la menor proporción de ADN recorrido por la ARNP en las trazas de 15pN no permitió contar con una población suficiente de pausas largas para realizar un análisis de estas entre fuerzas.

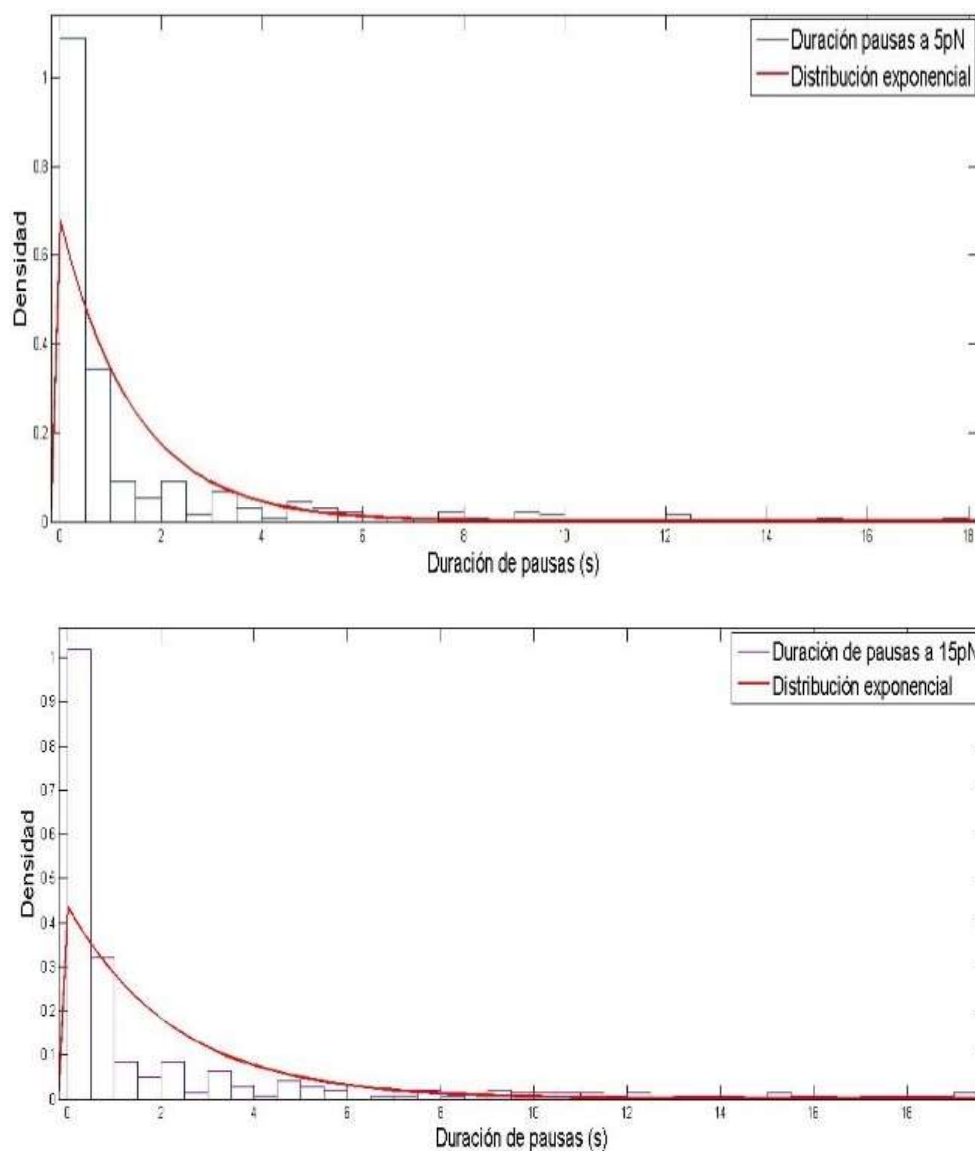


Figura 24. Distribución de las pausas cortas (<20 segundos). La distribución de las pausas cortas tanto a 5pN (imagen superior), como a 15pN (gráfico inferior) se ajustan bien a una distribución exponencial. La distribución a 5 pN tiene un valor medio de 2.286 ± 0.13637 , $n=341$. Para la distribución a 15 pN tiene un valor promedio de 2.326 ± 0.20974 , $n=132$

Se calculó los tiempos promedio de duración y la densidad de pausas cortas y largas para cada valor de fuerza (tabla 11). Comparando los datos a 5pN y 15pN, se observa que la velocidad total es mayor a baja fuerza, mientras que la velocidad libre de pausas es prácticamente igual a ambas fuerzas. Además, la duración de las pausas cortas es similar para ambas fuerzas, pero a densidad de estas es mayor a 15pN.

Tabla 11. Comparación de la duración de las pausas

		Fc=5pN	Fc=15pN
Pausas cortas	Duración (s)	2.29±2.28	2.33±2.33
	Densidad (#p/nm)	0.013±0.012	0.039±0.02
Pausas largas	Duración	35.34±14.80	60.78±48.37
	Densidad (#p/nm)	0.002±0.002	0.01±0.004

Todos los datos obtenidos sobre la dinámica de la elongación de la ARNP de *Mtb* a fuerza constante se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 12. Resumen de características de la dinámica de la ARNP de *Mtb* a baja y alta fuerza

Fuerza	# Trazas		Velocidad total (pb/s)	Velocidad libre de pausas (pb/s)	Densidad de pausas cortas (#p/pb)	Duración media pausas cortas (s)
5 pN	13	X±DE	5.78±2.17	6.48 ±0.4	0.013±0.012 1/76 p/pb	2.29±2.28
		Error	0.60	0.11	0.003	0.209
15 pN	5	X±DE	2.53±0.78	7.13 ± 0.392	0.039±0.02 1/25 p/pb	2.33±2.33
		Error	0.35	0.18	0.009	0.137

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El primer paso para el desarrollo de los estudios bioquímicos aquí realizados fue la producción de ARNP de Mtb en alta pureza y cantidad suficiente. Además, la manipulación por pinzas ópticas requirió adherir moléculas de ARNP a beads de poliestireno susceptibles de ser capturados por la trampa óptica. Esta unión ya había sido lograda en la ARNP de *E. coli* mediante la adición de biotina en el extremo C-terminal de la subunidad beta prima de la enzima. Este segmento, por su ubicación y carácter flexible no interviene en la estabilidad estructural de la enzima o en la catálisis de la reacción y puede suponerse que manipularla no tiene efectos en la actividad de la ARNP (53,55). Dada la similitud estructural entre la ARNP de *E. coli* y Mtb, se utilizó la misma estrategia para la enzima de Mtb.

El protocolo de purificación utilizado permite obtener ARNP de Mtb pura; sin embargo, el éxito de este procedimiento se ve limitado por una gran heterogeneidad entre colonias bacterianas en la cantidad de proteína expresada y su actividad específica (métodos, figura 6). Por ello fue necesario evaluar distintas colonias para escoger la de mejor expresión en un paso inmediatamente previo al cultivo y purificación. Además de esto, se observó que solo una pequeña proporción de la enzima producida había sido biotinilada por la bacteria y por la reacción *in vitro* realizada en el lisado previo a la cromatografía (ver figuras 7 y 12). Para enriquecer la proporción de enzimas ARNPs unidas a biotina, se realizó una segunda reacción de biotinilación *in vitro* después de la purificación. El ensayo de retención luego de este segundo proceso muestra que la proporción de ARNP biotinilada retenida por los beads de estreptavidina mejoró

considerablemente (figura 12b). La razón de esta mejora puede obedecer a que en el primer experimento de biotinylación, sobre el lisado celular, la concentración de la ARNP es baja y la enzima BirA compite con otras proteínas por la biotina y el ATP, haciendo menos eficiente la adición de biotina a la ARNP (104).

La enzima ARNP de Mtb mantuvo su actividad incluso después del segundo proceso de biotinylación (ver figura 13). Cabe resaltar la estabilidad de la enzima ARNP de Mtb luego de la segunda reacción de biotinylación, pues este proceso incluyó descongelar la enzima que estaba almacenada a -80°C y realizar incubaciones a 37°C por más de una hora antes de su uso. La estabilidad mostrada por la ARNP de Mtb fue crucial para poder llevar a cabo los experimentos en pinzas ópticas.

Discusión de resultados a fuerza variable

Se evaluó la elongación de transcripción de la ARNP de Mtb a fuerza variable (modo pasivo), en el cual las trampas no se desplazan. Según la geometría mostrada (Figura 11), a medida que la ARNP avanza sobre el molde de ADN, las esferas de poliestireno se acercan entre sí y por lo tanto la fuerza que la trampa ejerce sobre ellas aumenta. De esta manera, la enzima ARNP prosigue con la elongación mientras que la fuerza aumenta hasta alcanzar un límite contra el que ya no puede avanzar, llamado fuerza de arresto, o “*Stall force*”.

Con el diseño descrito anteriormente y en condiciones de temperatura de 20°C y concentración saturante de NTPs, se obtuvo un total de 17 registros de actividad. Se consideró que las enzimas que se mantuvieron detenidas por 5 minutos ya no reanudarían la transcripción. La ARNP se desplazó alrededor de

429.58 \pm 180.9 pb en promedio sobre el ADN molde antes de detenerse definitivamente y se calculó un “*Stall force*” promedio de 18.63pN \pm 5.14. Este valor parece mayor a lo reportado para *E. coli* en condiciones similares: 14 pN - 15 pN (40,58). Sin embargo, dado la alta desviación estándar se requerirá un tamaño muestral mayor para interrogar si existe una diferencia significativa.

En este estudio no se calculó valores de velocidad en las trazas de elongación a fuerza variable obtenidas en modo pasivo pues se requiere una mayor cantidad de datos para estimar previamente en qué rango de fuerzas es válido asumir que el comportamiento de la enzima será uniforme. Estableciendo los debidos puntos de corte se requiere además considerar que, aun en rangos estrechos de fuerzas, la magnitud del desplazamiento en nanómetros y la cantidad de pares de bases por nanómetro, son variables según la fuerza. Se implementará un software de análisis basado en lo desarrollado previamente para otros motores moleculares, considerando estas dos dependencias, según la rigidez de la trampa óptica (*stiffness*) y la función del modelo *WLC* del ADN (43–45), respectivamente, para los rangos de fuerza y longitudes de ADN utilizados en este sistema.

Discusión de resultados a fuerza constante

Bajo la geometría mostrada en la figura 11, se evaluó la actividad en elongación de la enzima ARNP de *Mtb* a fuerza contante en condiciones saturantes de NTPs ([1mM]), temperatura promedio de 20°C y una fuerza de carga opuesta al movimiento de la enzima (“*Opossing force*”). Se escogió dos valores de fuerza constante para el registro de actividad: un valor de baja fuerza

(5pN) y un valor de alta fuerza cercano al *stall forcé* (15pN). Se obtuvo en total 13 trazas a 5pN y 5 trazas a 15 pN.

Bajo las condiciones experimentales, donde el complejo ternario de elongación está sujeto entre dos beads de poliestireno (diámetro: 1µm), es de esperarse que la enzima no se desplace sobre el 100% del fragmento a transcribir del ADN molde debido a que cuando la enzima se aproxima a la parte final del molde su movimiento es afectado por la proximidad al *bead*. A fuerza constante de 5pN, el desplazamiento medio de la enzima fue de 2025.3 pb (SD=505.4), mientras que la media de desplazamiento a 15 pN fue de 864pb (SD=723.7).

Los resultados muestran que la ARNP de Mtb es muy procesiva a baja fuerza, 5 pN, ya que se desplaza en promedio 72.3% sobre la extensión de la secuencia de transcripción del molde (ADN molde: 2803pb, ver figura 8). La procesividad experimental así observada es probablemente diferente y menor a la que ocurre in vivo, donde es importante la influencia de la unión y recambio de proteínas accesorias que modifican la interacción con el ADN, tales como CarD y Rbp (20,79,82), y de factores que afectan la actividad y duración de las pausas, tales como las proteínas de unión al canal secundario(105,106). Por otro lado, a alta fuerza (15pN) se observa que la procesividad de la enzima es mucho menor (desplazamiento sobre el 30.8% del molde de transcripción). Sin embargo, la comparación de estos resultados no es concluyente debido a un valor de desviación estándar muy grande y a un pequeño número de registros a alta fuerza.

La velocidad total a 5pN es 5.78 ± 2.17 nt/s. Este valor es menor que el reportado para la enzima de *E. coli* bajo similares condiciones: 8.0 ± 3.0 pb/s (55) y 8.28 ± 2.99 pb/s (97). Por otro lado, a 15pN de fuerza, la velocidad total es de

2.53 \pm 0.78 pb/s. La velocidad total significativamente menor a alta fuerza coincide con lo observado en la dinámica de ARN polimerasa de otras especies, donde se ha reportado menor velocidad a fuerzas cercanas al “*stall force*”. La disminución de la velocidad total a fuerzas altas se ha atribuido a un incremento en la duración media o en la frecuencia de las pausas. (47,107).

Estudios de moléculas individuales han mostrado que la actividad de las ARNPs durante la elongación de la transcripción se encuentra interrumpida por estados de pausas de duración variable. Al igual que la actividad de otras ARNPs, la actividad de la enzima de Mtb a 5pN y 15pN también presenta estados de pausas de distintas escalas de tiempo. En la figura 19, las pausas son señaladas en rojo, mientras que las zonas de elongación activa son observadas como pendientes señaladas en color blanco. Considerando solo las zonas de elongación activa se obtuvo la velocidad libre de pausas (tasa instantánea de transcripción). La velocidad libre de pausas a 5 pN fue 6.48 ± 0.40 pb/s, mientras que a 15pN fue de 7.13 ± 0.39 pb/s, indicando que no se diferencia significativamente entre distintas fuerzas. La velocidad libre de pausas similar para ambos valores de fuerza implica que la causa de las diferencias en la velocidad total radica en la distinta frecuencia o duración de las pausas (ver resultados en la tabla 11).

La velocidad libre de pausas de la ARNP de Mtb resultó muy heterogénea entre moléculas individuales. A largo de cada traza, las regiones “*on pathway*” mantienen un valor similar de incorporación de NTPs (las pendientes son similares para las zonas “*on pathway*” de una misma traza”, ver figura 20); sin embargo, la velocidad libre de pausas entre distintas trazas puede ser muy variable bajo las mismas condiciones (figura 22). Este resultado coincide con lo reportado

para *E. coli* con estudios de moléculas individuales donde se ha observado una amplia distribución de valores (40,53,57,101). Además, la velocidad libre de pausas de la ARNP de Mtb tiene una distribución normal y unimodal para ambos valores de fuerza, similar a lo reportado para la ARNP de *E.coli* en estudios con microscopía de pinzas ópticas (54,57,101).

El origen de la heterogeneidad en la velocidad de moléculas de ARNP de Mtb aquí observada no se conoce aún; sin embargo, una heterogeneidad semejante en *E. coli* esta ha sido atribuida a 2 posibles causas. En primer lugar, el plegamiento de proteínas durante su producción mediante sobreexpresión podría generar una población no uniforme de enzimas ARNP. Las distintas conformaciones en las que podría plegarse la enzima generaría diversidad en las cinéticas de transcripción dentro de la población a pesar de que todas estas conformaciones aún sean viables de transcribir (57). Por otro lado, se ha sugerido que la diversidad en la velocidad de transcripción de la enzima ARNP puede ser resultado de que algunas de las enzimas ARNP se mantengan unidas a factores de transcripción u otra molécula de tamaño pequeño que afecten su cinética. Esta diversidad debido a la asociación con moléculas de tamaño menor al 10% de la holoenzima no son identificados con las técnicas cromatográficas utilizadas (57,97), y estando en cantidades subestequiométricas, podrían ser ignoradas por la espectrometría de masas practicada previamente sobre ARNP de Mtb purificada con el mismo protocolo al utilizado en este estudio (93). Es posible que algunos factores de transcripción presentes en la bacteria *E. coli* pueda unirse también a la ARNP recombinante de Mtb originando la heterogeneidad en la velocidad libre de pausas entre distintas moléculas.

Es resaltante que la velocidad libre de pausas reportada para la ARNP de Mtb sea menor que la reportada para *E. coli* en condiciones similares en varios experimentos (tabla 10). Mtb posee una tasa de multiplicación aproximadamente 60 veces más lenta que *E. coli* y esto podría relacionarse con el menor valor de la tasa de transcripción que hemos observado. Por otro lado, la ARNP de Mtb requiere de factores proteicos adicionales para llevar a cabo la iniciación de la transcripción y mantener complejos estables (21,22). Esto implica sustanciales diferencias en las interacciones enzima-ADN de estas dos especies que podrían originar diferencias en el comportamiento difusivo de las ARNP y en consecuencia diferentes tasas de desplazamiento.

Estados de pausa durante la elongación de la transcripción

Las pausas han sido estudiadas con detalle en la transcripción de *E. coli* debido a su gran importancia en la regulación y por su rol en la sincronización de la transcripción con la traducción (108,109). En base a su duración (vida media) y a su origen, las pausas han sido clasificadas en pausas cortas (<20s) y en pausas largas (>20 segundos). Estudios con la ARNP de *E. coli* indican que el origen de ambos tipos de pausas, cortas y largas, radica en la difusión de la enzima ARNP sobre el molde de ADN. El origen de las pausas largas, además de la difusión, involucra la hidrólisis del extremo 3' del ARN mensajero naciente (62,63).

Durante la actividad de la ARNP de *E. coli*, se ha observado que las pausas varían ampliamente no solo en su vida media si no también su frecuencia, siendo las más numerosas aquellas de menor duración (101,107). La distribución total de la duración de pausas durante la actividad de la ARNP de Mtb coincide con una

ley potencial, tal como lo reportado para la enzima de *E. coli* pues tanto a 5 como a 15 pN, las pausas más abundantes corresponden a las pausas cortas (figura 23). La duración de las pausas cortas se ajustó correctamente a una distribución exponencial con vida media de 2.29 ± 0.14 s para los datos a 5pN, y 2.33 ± 0.21 s para los datos a 15pN (Ver figura 24). Este ajuste coincide con la distribución observada previamente para la enzima *de E. coli*, donde se observó una vida media de pausas cortas de 5.5 ± 0.4 s para una fuerza constante de 4 pN, (101,107).

La duración de las pausas cortas es similar a baja y alta fuerza; sin embargo, la duración de las pausas largas es significativamente mayor a 15 pN. Además, la densidad de pausas cortas y largas es casi 3 y 5 veces mayor a alta fuerza, respectivamente (Tabla 12). La mayor densidad de pausas junto a la mayor duración de las pausas largas a 15 pN explicaría la menor velocidad total observada a alta fuerza. El hecho de que la fuerza tenga efecto sobre las pausas coincide con lo observado para la actividad de la ARNP de *E. coli*, donde se ha observado que estas son sensibles a fuerza altas (>10 pN) (101). La mayoría de las pausas involucran el *backtracking* de la enzima ARNP sobre el ADN molde (108,110). El desplazamiento de la enzima durante el *backtracking* requiere atravesar barreras de energía significativas en relación a la energía térmica del medio, por ello las pausas (su duración y/o densidad) pueden ser afectadas por la fuerza aplicada y el consiguiente trabajo realizado sobre la enzima (101,111).

En la figura 23 se puede ver que tanto para 5 pN como para 15 pN, las pausas largas son mucho menos abundantes que las pausas cortas (1 pausa cada 1000 pb para trazas a 5pN o 1 pausa cada 333.3pb para trazas a 15pN). La menor frecuencia de pausas largas (> 20 s) sería consistente con la ley potencial

observada durante la actividad de la ARNP de otras especies (39,97,101). Las pausas largas (>20 segundos) son afectadas por la fuerza tanto en duración como en frecuencia (ver tabla 11). El mayor efecto de la fuerza sobre las pausas largas puede explicarse porque implican un mayor desplazamiento difusivo también considerando el *backtracking* de la enzima durante las pausas en dirección de la fuerza. Dado que las pausas largas implican un desplazamiento mayor de la ARNP (> a 3 pb) y requieren un mayor trabajo para regresar al punto de origen, es de esperarse que sean más afectadas por el incremento de la fuerza (62,112). Pese a que la baja cantidad de datos colectados a alta fuerza no permitió obtener un número de pausas largas adecuado para obtener comparaciones estadísticamente concluyentes sobre la densidad de estas a baja y alta fuerza, las tendencias aquí observadas concuerdan con los resultados de otros trabajos con la ARNP de *E. coli*.

Por otro lado, Neuman y colaboradores reportaron que existe una población de pausas de corta duración (≤ 6 segundos) que son muy frecuentes, aunque de baja eficiencia al que se denominó pausas ubicuas. Este tipo de pausas no es afectado por la variación de la fuerza, ni en su duración ni en densidad, ya que estas probablemente no involucran el *backtracking* de la enzima. Sin embargo, al analizar nuestros datos en estas escalas de tiempo (pausas <10 segundos) no se encontró pausas que no hayan sido afectadas por la fuerza (101). Ver tabla 13.

Tabla 13

Pausas <10s		Media	N
5pN	Duración (s)	1.28 +- 0.08	266

	Densidad (#p/nm)	0.03	
15pN	Duración (s)	1.05+- 0.1	121
	Densidad (#p/nm)	0.11	

Los resultados en conjunto muestran que existe similitud en el proceso de elongación de transcripción entre la ARNP de Mtb con la actividad de la ARNP de otras especies; sin embargo, se indican diferencias importantes en las escalas de tiempo y velocidad a la que este proceso se lleva a cabo. En primer lugar, la velocidad libre de pausas es significativamente menor en comparación con los resultados de la ARNP *E. coli* (ver tabla 10). Además, la duración promedio de las pausas cortas de la ARNP de Mtb (2.29 ± 2.28 s a 5pN y 2.33 ± 2.33 s a 15pN) fue menor que lo reportado para la de *E. coli* (5.5 ± 0.4 s para una fuerza constante de 4 pN, y 3s a fuerzas >10 pN). La duración de pausas largas en Mtb (35.34 ± 14.80 s a 5 pN) también fue menor que la reportada para la ARNP de *E. coli* (43.53 ± 24.87 s a 4 pN) (97,101).

Por otro lado, la densidad de pausas cortas de la actividad de la ARNP de Mtb a 5 pN de fuerza (13.0 ± 12 pausas/kb, n=341) es mayor que el reportado para *E. coli* bajo similares condiciones (7.82 ± 5.44 pausas/kb a 4pN, n=145) (97). Esta diferencia fue estadísticamente significativa según el test t-student al 1% de significancia. La densidad de pausas largas de la actividad de la ARNP de Mtb a 5pN de fuerza (2.0 ± 2.0 pausas/kb, n=15) también es mayor que el reportado para *E. coli* bajo similares condiciones (0.16 ± 0.20 pausas/kb a 4pN, n=8) (97). El

pequeño número de pausas largas en ambos estudios no permiten que estas diferencias sean comparables estadísticamente.

Si bien se han comparado resultados de las actividades de las enzimas ARNP de *Mtb* y de *E. coli* sobre ADN moldes distintos, los resultados brindan primeros indicios de que existirían diferencias importantes en los parámetros de actividad de estas enzimas.

Por otro lado, se muestran resultados sobre el efecto de la fuerza sobre las pausas que nos brindan un primer panorama del efecto que tiene la fuerza sobre la enzima de la ARNP de *Mtb*. Sin embargo, se requerirá ampliar estos resultados con un mayor número muestral y con un mayor rango de fuerzas para poder formular conclusiones.

Analizando un mayor número de trazas y evaluándolas en distintas condiciones será posible estimar importantes constantes cinéticas y termodinámicas de esta enzima (39,56). De este modo, Dangkulwanich realizó la estimación de las principales constantes cinéticas (K_m , V_{max}) y las constantes de desplazamiento (hacia adelante, k_f , y hacia atrás, k_b) para la ARN polimerasa II simplificando el esquema cinético *Brownian ratchet* para el ciclo de adición de NTPs de la elongación de la transcripción. Utilizando esta aproximación, se evaluó por ejemplo, varias condiciones de concentración de sustrato (NTPs) y graficó la velocidad libre de pausas en función de esta. A partir de las curvas de la velocidad libre de pausas en función de la concentración de NTPs y aproximando la actividad de esta enzima a una cinética de *Michaelis-Menten*, fue posible estimar el valor de la V_{max} y el K_m de la ARNP II(39).

Por otro lado, Mejía evaluó la actividad de la enzima ARNP de *E. coli* a distintas temperaturas y con este diseño pudo inferir los mecanismos y parámetros que determinan los estados “*Off pathway*”. (56). Proseguir con los experimentos aquí presentados y analizarlos de manera similar a la utilizada por Dangkuwalnich y Mejía permitirán caracterizar detalladamente la actividad de la enzima ARNP de Mtb durante la elongación de la transcripción.

XI. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo de investigación constituyen el primer estudio realizado sobre la dinámica de moléculas individuales de ARNP de Mtb. Aquí reportamos los primeros valores aproximados de velocidad total y velocidad libre de pausas, frecuencia y vida media de pausas, y la influencia ejercida por una fuerza opuesta. Las comparaciones iniciales de estos parámetros con los de la ARNP de *E. coli*, en particular la menor velocidad libre de pausas, resaltan la importancia de continuar estudiando la enzima de Mtb.

XII. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Es necesario realizar más experimentos con mayor número de trazas para comparar apropiadamente la actividad de la ARNP de *Mtb* con su homólogo de *E. coli*.

Se recomienda proseguir con los experimentos aquí presentados y analizarlos de manera similar a la utilizada por Dangkuwalnich y Mejía para caracterizar cinética y termodinámicamente la actividad de la enzima ARNP de *Mtb* durante la elongación de la transcripción.

El sistema experimental aquí explicado permitirá además el análisis de enzimas polimórficas de *Mtb*, con el objetivo de estudiar el origen de las diferencias demostradas por estudios bioquímicos, microbiológicos y epidemiológicos en las bacterias resistentes a Rif y en aquellas poseedoras de mutaciones putativamente compensatorias.

XIII. REFERENCIAS

1. Kireeva ML, Kashlev M, Burton ZF. RNA polymerase structure, function, regulation, dynamics, fidelity, and roles in GENE EXPRESSION. *Chem Rev.* 2013;113(11):8325–8330.
2. Baloni P, Chandra N. Architectural plan of transcriptional regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* marzo de 2015;23(3):123–125.
3. Murakami KS. Structural biology of bacterial RNA polymerase. *Biomolecules.* 2015;5(2):848–864.
4. Chopra I. Bacterial RNA polymerase: a promising target for the discovery of new antimicrobial agents. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. agosto de 2007;8(8):600-7.
5. Ma C, Yang X, Lewis PJ. Bacterial Transcription as a Target for Antibacterial Drug Development. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(1):139–160.
6. Kuznedelov K, Semenova E, Knappe TA, Mukhamedjarov D, Srivastava A, Chatterjee S, et al. The antibacterial threaded-lasso peptide capistruiin inhibits bacterial RNA polymerase. *J Mol Biol.* 7 de octubre de 2011;412(5):842-8.
7. Bellomio A, Vincent PA, de Arcuri BF, Farías RN, Morero RD. Microcin J25 Has Dual and Independent Mechanisms of Action in *Escherichia coli*: RNA Polymerase Inhibition and Increased Superoxide Production. *J Bacteriol.* junio de 2007;189(11):4180-6.
8. Floss HG, Yu T-W. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chem Rev.* 1 de febrero de 2005;105(2):621-32.
9. Artsimovitch I, Seddon J, Sears P. Fidaxomicin Is an Inhibitor of the Initiation of Bacterial RNA Synthesis. *Clin Infect Dis.* 1 de agosto de 2012;55(suppl_2):S127-31.
10. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* junio de 1998;393(6685):537–544.
11. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* enero de 2007;5(1):39-47.
12. World Health Organization 2016. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2016. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
13. Avkan Oguz V, Eroglu C, Guneri S, Yapar N, Oztop A, Sanic A, et al. RpoB gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the Aegean region of Turkey. *J Chemother Florence Italy.* octubre de 2004;16(5):442–445.

14. Song T, Park Y, Shamputa IC, Seo S, Lee SY, Jeon H-S, et al. Fitness costs of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* are amplified under conditions of nutrient starvation and compensated by mutation in the β' subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol.* marzo de 2014;91(6):1106–1119.
15. Schulz zur Wiesch P, Engelstädter J, Bonhoeffer S. Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2010;54(5):2085-95.
16. Fonseca JD, Knight GM, McHugh TD. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 19 de octubre de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25809763>
17. Ray-Soni A, Bellecourt MJ, Landick R. Mechanisms of Bacterial Transcription Termination: All Good Things Must End. *Annu Rev Biochem.* 2 de junio de 2016;85:319-47.
18. Landick R, Krek A, Glickman MS, Socci ND, Stallings CL. Genome-wide mapping of the distribution of CarD, RNAP σ A, and RNAP β on the *Mycobacterium smegmatis* chromosome using chromatin immunoprecipitation sequencing. *Genomics Data.* 11 de junio de 2014;2:110-3.
19. Hubin EA, Fay A, Xu C, Bean JM, Saecker RM, Glickman MS, et al. Structure and function of the mycobacterial transcription initiation complex with the essential regulator RbpA. *eLife* [Internet]. [citado 9 de noviembre de 2017];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5302886/>
20. Hu Y, Morichaud Z, Chen S, Leonetti J-P, Brodolin K. *Mycobacterium tuberculosis* RbpA protein is a new type of transcriptional activator that stabilizes the σ A -containing RNA polymerase holoenzyme. *Nucleic Acids Res.* 1 de agosto de 2012;40(14):6547-57.
21. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santangelo M de la P, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* enero de 2013;4(1):3–66.
22. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol Mol Biol Rev.* enero de 2008;72(1):126–156.
23. Raman S, Hazra R, Dascher CC, Husson RN. Transcription Regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* Alternative Sigma Factor SigD and Its Role in Virulence. *J Bacteriol.* enero de 2004;186(19):6605–6616.
24. Davis E, Chen J, Leon K, Darst SA, Campbell EA. Mycobacterial RNA polymerase forms unstable open promoter complexes that are stabilized by CarD. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(1):433-45.
25. Richard H. Ebright WL. Structural basis of *Mycobacterium tuberculosis* transcription and transcription inhibition. 2017;

26. Chopra I. Bacterial RNA polymerase: a promising target for the discovery of new antimicrobial agents. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. agosto de 2007;8(8):600–607.
27. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*. marzo de 2001;104(6):901–912.
28. Baloni P, Chandra N. Architectural plan of transcriptional regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. marzo de 2015;23(3):123-5.
29. Davis E, Chen J, Leon K, Darst SA, Campbell EA. Mycobacterial RNA polymerase forms unstable open promoter complexes that are stabilized by CarD. *Nucleic Acids Res*. enero de 2015;43(1):433-45.
30. Davenport RJ, Wuite GJ, Landick R, Bustamante C. Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by *E. coli* RNA polymerase. *Science*. 31 de marzo de 2000;287(5462):2497-500.
31. Adelman K, Porta AL, Santangelo TJ, Lis JT, Roberts JW, Wang MD. Single molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior. *Proc Natl Acad Sci*. 15 de octubre de 2002;99(21):13538-43.
32. Shaevitz JW, Abbondanzieri EA, Landick R, Block SM. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*. 11 de diciembre de 2003;426(6967):684-7.
33. Mehta AD, Rief M, Spudich JA, Smith DA, Simmons RM. Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science*. 12 de marzo de 1999;283(5408):1689-95.
34. Herbert KM, Greenleaf WJ, Block SM. Single-molecule studies of RNA polymerase: motoring along. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:149-76.
35. Borukhov S, Lee J, Laptenko O. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol Microbiol*. marzo de 2005;55(5):1315-24.
36. Roberts JW, Shankar S, Filter JJ. RNA polymerase elongation factors. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:211-33.
37. Dangkulwanich M, Ishibashi T, Bintu L, Bustamante C. Molecular mechanisms of transcription through single-molecule experiments. *Chem Rev*. 2014;114(6):3203–3223.
38. Larson MH, Landick R, Block SM. Single-Molecule Studies of RNA Polymerase: One Singular Sensation, Every Little Step It Takes. *Mol Cell*. febrero de 2011;41(3):249–262.
39. Dangkulwanich M, Ishibashi T, Liu S, Kireeva ML, Lubkowska L, Kashlev M, et al. Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism. *eLife*. 2013;2:e00971.

40. Davenport RJ. Single-Molecule Study of Transcriptional Pausing and Arrest by *E. coli* RNA Polymerase. *Science*. 2000;287(5462):2497–2500.
41. Galbur EA, Grill SW, Bustamante C. Single Molecule Transcription Elongation. *Methods San Diego Calif.* agosto de 2009;48(4):323–332.
42. Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum. *Methods Enzymol*. 2003;361:134–62.
43. Bouchiat C, Wang MD, Allemand J-F, Strick T, Block SM, Croquette V. Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements. *Biophys J*. 1999;76(1):409–413.
44. Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: The elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. 1996;271(9):1–5.
45. Rivetti C, Walker C, Bustamante C. Polymer chain statistics and conformational analysis of DNA molecules with bends or sections of different flexibility. *J Mol Biol*. 3 de julio de 1998;280(1):41–59.
46. Neuman KC, Block SM. Optical trapping. *Rev Sci Instrum*. septiembre de 2004;75(9):2787–2809.
47. Herbert KM, Greenleaf WJ, Block SM, Program B. Single-molecule Studies of RNA Polymerase: Motoring Along. *Annu Rev Biochem*. 2010;149–176.
48. Kireeva ML, Komissarova N, Waugh DS, Kashlev M. The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *J Biol Chem*. marzo de 2000;275(9):6530–6536.
49. Sidorenkov I, Komissarova N, Kashlev M. Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol Cell*. julio de 1998;2(1):55–64.
50. Wang HY, Elston T, Mogilner A, Oster G. Force generation in RNA polymerase. *Biophys J*. marzo de 1998;74(3):1186–1202.
51. Zamft B, Bintu L, Ishibashi T, Bustamante C. Nascent RNA structure modulates the transcriptional dynamics of RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci*. mayo de 2012;109(23):8948–53.
52. Abbondanzieri EA, Greenleaf WJ, Shaevitz JW, Landick R, Block SM. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*. 2005;438(7067):460–465.
53. Forde NR, Izhaky D, Woodcock GR, Wuite GJL, Bustamante C. Using mechanical force to probe the mechanism of pausing and arrest during continuous elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci*. marzo de 2002;99(18):11682–11687.
54. Adelman K, Porta AL, Santangelo TJ, Lis JT, Roberts JW, Wang MD. Single molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior. *Proc Natl Acad Sci*. octubre de 2002;99(21):13538–13543.

55. Davenport RJ. Single-Molecule Study of Transcriptional Pausing and Arrest by E. coli RNA Polymerase. *Science*. 2000;287(5462):2497-500.
56. Mejia YX, Mao H, Forde NR, Bustamante C. Thermal probing of E. coli RNA polymerase off-pathway mechanisms. *J Mol Biol*. octubre de 2008;382(3):628-637.
57. Tolić-Nørrelykke SF, Engh AM, Landick R, Gelles J. Diversity in the Rates of Transcript Elongation by Single RNA Polymerase Molecules. *J Biol Chem*. enero de 2004;279(5):3292-3299.
58. Yin H, Wang MD, Svoboda K, Landick R, Block SM, Gelles J. Transcription against an applied force. *Science*. diciembre de 1995;270(5242):1653-1657.
59. Bai L, Santangelo TJ, Wang MD. Single-molecule analysis of RNA polymerase transcription. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2006;35:343-360.
60. Zhou J, Ha KS, La Porta A, Landick R, Block SM. Applied Force Provides Insight into Transcriptional Pausing and Its Modulation by Transcription Factor NusA. *Mol Cell*. noviembre de 2011;44(4):635-646.
61. Herbert KM, Zhou J, Mooney RA, Porta AL, Landick R, Block SM. E. coli NusG inhibits backtracking and accelerates pause-free transcription by promoting forward translocation of RNA polymerase. *J Mol Biol*. mayo de 2010;399(1):17-30.
62. Shaevitz JW, Abbondanzieri EA, Landick R, Block SM. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*. 2003;426(6967):684-687.
63. Maoiléidigh DO, Tadigotla VR, Nudler E, Ruckenstein AE. A unified model of transcription elongation: what have we learned from single-molecule experiments? *Biophys J*. marzo de 2011;100(5):1157-1166.
64. Ebright RH. RNA Polymerase: Structural Similarities Between Bacterial RNA Polymerase and Eukaryotic RNA Polymerase II. *J Mol Biol*. 2000;304(5):687-98.
65. Ebright RH. RNA Polymerase: Structural Similarities Between Bacterial RNA Polymerase and Eukaryotic RNA Polymerase II. *J Mol Biol*. 15 de diciembre de 2000;304(5):687-98.
66. Murakami KS. X-ray crystal structure of Escherichia coli RNA polymerase σ 70 holoenzyme. *J Biol Chem*. marzo de 2013;288(13):9126-34.
67. Vassylyev DG, Sekine S, Laptenko O, Lee J, Vassylyeva MN, Borukhov S, et al. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*. junio de 2002;417(6890):712-719.
68. Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K, Darst SA. Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*. septiembre de 1999;98(6):811-824.
69. Cellai S, Mangiarotti L, Vannini N, Naryshkin N, Kortkhonjia E, Ebright RH, et al. Upstream promoter sequences and alphaCTD mediate stable DNA wrapping within

the RNA polymerase-promoter open complex. *EMBO Rep.* marzo de 2007;8(3):271–278.

70. Ebright RH. RNA Polymerase: Structural Similarities Between Bacterial RNA Polymerase and Eukaryotic RNA Polymerase II. *J Mol Biol.* 2000;304(5):687–698.
71. Gourse RL, Ross W, Gaal T. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol.* agosto de 2000;37(4):687–695.
72. Larson MH, Zhou J, Kaplan CD, Palangat M, Kornberg RD, Landick R, et al. Trigger loop dynamics mediate the balance between the transcriptional fidelity and speed of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(17):6555–6560.
73. Yuzenkova Y, Zenkin N. Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* junio de 2010;107(24):10878–10883.
74. Zhang J, Palangat M, Landick R. Role of the RNA polymerase trigger loop in catalysis and pausing. *Nat Struct Mol Biol.* enero de 2010;17(1):99–104.
75. Sosunov V, Sosunova E, Mustaev A, Bass I, Nikiforov V, Goldfarb A. Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *EMBO J.* mayo de 2003;22(9):2234–2244.
76. Borukhov S, Nudler E. RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol.* marzo de 2008;16(3):126–134.
77. Murakami KS. X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase σ 70 holoenzyme. *J Biol Chem.* marzo de 2013;288(13):9126–9134.
78. Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:499–518.
79. Srivastava DB, Leon K, Osmundson J, Garner AL, Weiss LA, Westblade LF, et al. Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(31):12619–12624.
80. Bae B, Chen J, Davis E, Leon K, Darst SA, Campbell EA. CarD uses a minor groove wedge mechanism to stabilize the RNA polymerase open promoter complex. *eLife.* 2015;4(September 2015):1–19.
81. Gopal B, Haire LF, Cox RA, Jo Colston M, Major S, Brannigan JA, et al. The crystal structure of NusB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Struct Biol.* junio de 2000;7(6):475–8.
82. Bortoluzzi A, Muskett FW, Waters LC, Addis PW, Rieck B, Munder T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* RNA Polymerase-binding Protein A (RbpA) and Its Interactions with Sigma Factors. *J Biol Chem.* 17 de mayo de 2013;288(20):14438–50.

83. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, van Helden PD, Victor TC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol*. julio de 2006;8(2):97–111.
84. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. noviembre de 2009;13(11):1320–1330.
85. Barry CE. Lessons from seven decades of antituberculosis drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(10):1216–1225.
86. Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet*. 2011;44(1):106–110.
87. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannon BJM. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. junio de 2006;312(5782):1944–1946.
88. Riska PF, Jacobs WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis*. febrero de 2000;4(2 Suppl 1):S4–10.
89. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 1993;37(10):2054–2058.
90. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Lond Engl*. marzo de 1993;341(8846):647–650.
91. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Allele-Specific rpoB PCR Assays for Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. *Antimicrob Agents Chemother*. julio de 2003;47(7):2231–5.
92. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, Wang H. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol*. mayo de 2003;41(5):2209–12.
93. Herrera-asmat O, Lubkowska L, Kashlev M, Bustamante CJ, Guerra DG, Kireeva ML. Protein Expression and Purification Production and characterization of a highly pure RNA polymerase holoenzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif*. 2017;
94. Kireeva ML, Opron K, Seibold S a, Domecq C, Cukier RI, Coulombe B, et al. Molecular dynamics and mutational analysis of the catalytic and translocation cycle of RNA polymerase. *BMC Biophys*. 2012;5(1):11.
95. Fairhead M, Howarth M. Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2015;1266:171–84.

96. Gaudion A, Dawson L, Davis E, Smollett K. Characterisation of the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigG: its operon and regulon. *Tuberc Edinb Scotl.* septiembre de 2013;93(5):482-91.
97. Sosa Principe RP. “ EFECTO DE TETRAFOSFATO DE GUANOSINA ENLOS COMPLEJOS DE ELONGACIÓN DE TRANSCRIPCIÓN BACTERIANA ”. 2014.
98. Wuite GJL. *Single Molecule Studies of RNA and DNA Polymerases using Laser Tweezers.* [Enschede]: Universiteit Twente; 2000.
99. Mejia YX, Mao H, Forde NR, Bustamante C. Thermal probing of *E. coli* RNA polymerase off-pathway mechanisms. *J Mol Biol.* octubre de 2008;382(3):628-37.
100. Yin H, Landick R, Gelles J. Tethered particle motion method for studying transcript elongation by a single RNA polymerase molecule. *Biophys J.* diciembre de 1994;67(6):2468-78.
101. Neuman KC, Abbondanzieri EA, Landick R, Gelles J, Block SM. Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell.* 14 de noviembre de 2003;115(4):437-47.
102. Galburt EA, Grill SW, Wiedmann A, Lubkowska L, Choy J, Nogales E, et al. Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner. *Nature.* 12 de abril de 2007;446(7137):820-3.
103. Depken M, Galburt EA, Grill SW. The Origin of Short Transcriptional Pauses. *Biophys J.* 18 de marzo de 2009;96(6):2189-93.
104. Adhya S, Garges S. *RNA Polymerase and Associated Factors.* Academic Press; 2003. 833 p.
105. China A, Mishra S, Nagaraja V. A Transcript Cleavage Factor of *Mycobacterium tuberculosis* Important for Its Survival. *PLoS ONE* [Internet]. 8 de julio de 2011 [citado 23 de noviembre de 2017];6(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3132773/>
106. China A, Mishra S, Tare P, Nagaraja V. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase by binding of a Gre factor homolog to the secondary channel. *J Bacteriol.* 2012;194(5):1009–1017.
107. Herbert KM, La Porta A, Wong BJ, Mooney RA, Neuman KC, Landick R, et al. Sequence-Resolved Detection of Pausing by Single RNA Polymerase Molecules. *Cell.* 2006;125(6):1083–1094.
108. Landick R. RNA Polymerase Slides Home: Pause and Termination Site Recognition. *Cell.* 21 de marzo de 1997;88(6):741-4.
109. Belogurov GA, Artsimovitch I. Regulation of Transcript Elongation. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69(1):49–69.

110. Komissarova N, Kashlev M. RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15329–15338.
111. Tinoco I, Bustamante C. The effect of force on thermodynamics and kinetics of single molecule reactions. *Biophys Chem.* 10 de diciembre de 2002;101-102:513-33.
112. Nudler E, Mustaev A, Lukhtanov E, Goldfarb A. The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell.* 1997;89(1):33–41.
113. Cybertesis UNMSM: Ingeniería del complejo de elongación ternario de la ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* [Internet]. [citado 3 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6244>

XIV. ANEXOS

Anexo 1: Composición de los buffers para la Purificación ARNP-Mtb (Tesis de pregrado-Omar Herrera (113))

- **Buffer de Lisis 3X** (450mM Tris-acetate pH 7.9 25°C, 150mM K-Acetate, 15mM MgCl₂, 15mM EDTA, 0.03mM ZnSO₄): 13.63g Trizma (121.14g/mol), 3.68g Acetato de Potasio (98.14g/mol), 7.5µl 0.5M MgCl₂, 7.5µl 0.5M EDTA pH 8.0, 1.5µl 5mM ZnSO₄, agregar HCl hasta pH 7.9 y completar con H₂O hasta 250mL. Esterilizar por filtrado
- **Buffer de lisis 1X**: 10ml buffer de Lisis 3x, 0.4ml 143mM βME, 0.3ml cocktail inhibidor de proteasas 100x, 30µl 100mM PMSF, 90µl 100ug/µl Lisozima, completar con H₂O hasta 30mL.
- **Buffer TM 10X** (200mM Tris-HCl pH 7.9, 100mM MgCl₂): 50ml 1M Tris-HCl pH 7.9, 50ml 0.5M MgCl₂, completar con H₂O hasta 250ml. Esterilizar por filtrado.
- **Buffer de Lavado A[200]** (20mM Tris-HCl pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1.4mM βME, 200mM KCl, 0.1mM PMSF): 50ml TM 10X, 12.5ml 4M KCl, 5ml 143mM βME, 0.5ml 100mM PMSF, completar con H₂O hasta 500ml. Esterilizar por filtrado.
- **Buffer de Elución** (20mM Tris-HCl pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1.4mM βME, 200mM KCl, 0.1mM PMSF, 500mM Imidazol): 25ml TM 10X, 12.5ml 4M KCl, 2.5ml 143mM βME, 0.25ml 100mM PMSF, 62.5ml 2M Imidazol-HCl pH 7.9, completar con H₂O hasta 250ml. Esterilizar por filtrado.
- **Buffer de alta concentración de sal A[1666]** (20mM Tris-HCl pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1.4mM βME, 1666mM KCl, 0.1mM PMSF, 2mM βME): 50ml TMB 10X, 208.2ml 4M KCl, 5ml 143mM βME, 0.5ml 100mM PMSF, completar con H₂O hasta 500ml. Esterilizar por filtrado.
- **Buffer TGED 10x** (400mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA pH 8.0): 100ml 1M

Tris-HCl pH 7.9, 0.5M EDTA pH 8.0, ajustar pH to 8.0 @ 25° C y completar con H₂O hasta 250ml. Esterilizar por filtrado.

- **Buffer TGED [0] 1x** (40mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5mM EDTA pH 8.0, 5% Glicerol, 0.1mM PMSF, 1.4mM βME): 50ml TGED 10x, 25mL 98% Glicerol, 5ml 143mM βME, 0.5ml 100mM PMSF, completar con H₂O hasta 500ml. Esterilizar por filtrado.
- **Buffer TGED [1000] 1x** (40mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5mM EDTA pH 8.0, 5% Glicerol, 0.1mM PMSF, 1M NaCl, 1.4mM βME): 25ml TGED 10x, 12.5ml 98% Glicerol, 62.5ml 4M NaCl, 2.5ml 143mM βME, 250μl 100mM PMSF, completar con H₂O a 250ml. Esterilizar por filtrado.
- **Buffer de almacenamiento 2X** (40mM Tris-HCl pH 8.0, 360mM KCl, 20μMZnSO₄, Protease inhibitors 2x, 2mM DTT): 10ml 1M Tris-HCl pH 7.9, 22.5ml 4M KCl, 1μl 5mM ZnSO₄, ajustar el pH a 8.0 con NaOH y completar con H₂O hasta 250ml. Esterilizar por filtrado. Antes de usar, agregar el inhibidor de proteasas y el DTT.

Anexo 2: Condiciones de filtrado de datos en el programa Matlab

13.0

Ver Scripts comentados en material adjunto (CD)