



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Transcripción Procariótica – Estudios biofísicos
de las ARN polimerasas de *Escherichia coli* y
*Mycobacterium tuberculosis***

TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

AUTOR:

Daniel Guerra Giraldez

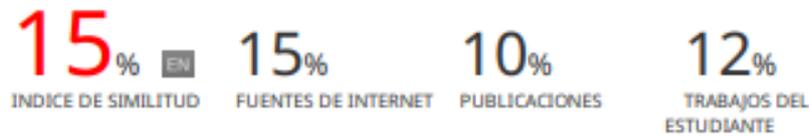
Asesor: Wilfredo Antonio Gonzales Lozada

LIMA - PERÚ

2020

Transcripción Procariótica – Estudios biofísicos de las ARN polimerasas de Escherichia coli y Mycobacterium tuberculosis

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	dspace.cuni.cz Fuente de Internet	2%
2	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	1%
3	www.axiaoffice.com.au Fuente de Internet	1%
4	sro.sussex.ac.uk Fuente de Internet	1%
5	trepo.tuni.fi Fuente de Internet	1%
6	www.nobelprize.org Fuente de Internet	1%
7	teses.usp.br Fuente de Internet	1%
8	www.biorxiv.org Fuente de Internet	1%

Contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
Perfil de Egreso de la Carrera profesional de Biología.....	3
Capítulo 1	6
Abreviaturas.....	7
Resumen	8
Abstract.....	9
I. Introducción	10
II. Transcripción en <i>Escherichia coli</i>	12
III. Transcripción en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
IV. Conclusiones.....	28
V. Referencias Bibliográficas.....	30
Capítulo 2	36
ANEXO 1	46
ANEXO 2	47
ANEXO 3	48
ANEXO 4	49
ANEXO 5	51

Resumen

El presente trabajo de suficiencia profesional expone demostraciones del cumplimiento del perfil de egreso de la carrera de biología de la UPCH por parte de Daniel Guerra Giraldez.

Los aportes científicos cubren la estructura y paisaje energético del inicio de la transcripción, los efectos del ppGpp en la iniciación y la elongación, y la caracterización de la dinámica de la enzima ARN polimerasa de *M. tuberculosis* (MtbRNAP). Combinando el uso de pinzas ópticas, nucleótidos marcados, microscopía de fuerza atómica (AFM), y fluorescencia, se ha demostrado el rol preponderante del enrollamiento como determinante de la estabilidad del complejo de iniciación de la transcripción (RPo) en *E. coli*, donde resulta antagonista a la acción de ppGpp y catalizador de la tanto la apertura del ADN como del escape de promotor. Se discute las perspectivas de estudio sobre la interacción entre el superenrollamiento topológico del ADN y el enrollamiento en complejos de transcripción. Mediante la manipulación de enzimas ARN polimerasas individuales durante la elongación de la transcripción, se realiza la caracterización inicial de la actividad de MtbRNAP y del efecto del ppGpp sobre la enzima de *E. coli*. Además, para favorecer nuevos estudios en MtbRNAP, se fabricaron dos sistemas de expresión, uno basado en plásmidos con usaje de codones optimizado y otro basado en la integración de genes de *M. tuberculosis* en el cromosoma de *E. coli*. Este último produce menos estrés a la bacteria portadora y permitirá el uso de genes reporteros fluorescentes GFP y RFP para cuantificar las actividades de MtbRNAP.

El cumplimiento de los aspectos del perfil del biólogo referidos al trabajo interdisciplinario, en equipo, en el marco de la ética y comprometido con el bienestar y el progreso de la sociedad, se respaldan con documentos anexos que sustentan el desempeño profesional del postulante.

Palabras claves: ARN polimerasa, RNAP, transcripción, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis.

Abstract

The present document seeks to demonstrate the fulfillment of the biologist graduation profile of the UPCH by Daniel Guerra Giraldez.

The scientific contributions described here cover the structure and energetic landscape of transcription initiation, the effects of ppGpp on transcription initiation and elongation processes, and the characterization of the *M. tuberculosis* RNA polymerase enzyme (MtbRNAP) dynamics. Combining the use of optical tweezers, labeled nucleotides, atomic force microscopy (AFM), and fluorescence, we identify DNA wrapping as a contributor to the stability of the transcription initiation complex (RPO) in *E. coli*, where it is antagonistic to the action of ppGpp and a catalyst for the opening of DNA. A possible interaction between the topological supercoiling of DNA and its wrapping around transcription complexes is discussed. The manipulation of single RNA polymerase enzymes during transcription elongation allowed the initial characterization of MtbRNAP activity and measuring the effect of ppGpp on the *E. coli* enzyme. Additionally, to favour new studies in MtbRNAP, two expression systems were manufactured, one based on plasmids with optimized codon usage and the other based on the integration of *M. tuberculosis* genes into the *E. coli* chromosome. The latter produces less stress to the carrier bacteria and will allow the use of fluorescent reporter genes GFP and RFP to rapidly quantify the activity of MtbRNAP in the presence of inhibitors.

The attached documents support the professional performance of the applicant in compliance with the aspects of the biologist's profile referring to interdisciplinarity, teamwork, ethics, and commitment to the well-being and progress of society.

Keywords: RNA polymerase, RNAP, transcription, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*.

Perfil de Egreso de la Carrera profesional de Biología

El egresado de la carrera de Biología de la UPCH posee una sólida formación teórica y metodológica en las ciencias biológicas que le permite comprender el origen y las bases del funcionamiento de los seres vivos en sus diversos niveles de organización. Integra los conocimientos de diferentes disciplinas, es proactivo, realiza trabajo interdisciplinario y en equipo, y tiene capacidad de auto-aprendizaje. Se caracteriza por un pensamiento científico que se desenvuelve en el marco de la ética y mediante el cual identifica problemas y genera estrategias para su estudio y solución comprometido con el bienestar y el progreso de la sociedad. Busca y colecta información, analiza e interpreta datos, y genera conocimiento en las áreas biomédica, biotecnológica, genética y genómica, ecológica y en ciencias del medio ambiente, que comunica de forma efectiva.

Para facilitar la revisión y consideración de los documentos presentados en dos capítulos y cinco anexos, se organiza este perfil profesional en las siguientes partes.

Perfil de Egreso, Parte 1

“...posee una sólida formación teórica y metodológica en las ciencias biológicas que le permite comprender el origen y las bases del funcionamiento de los seres vivos [...] genera conocimiento en las áreas biomédica, biotecnológica, genética y genómica, ecológica y en ciencias del medio ambiente, que comunica de forma efectiva.”

Perfil de Egreso de la Carrera profesional de Biología

En diez años como director del Laboratorio de Moléculas Individuales he contribuido con el conocimiento fundamental de la transcripción en procariotas con un enfoque propio de la biofísica molecular. Desde esta aproximación, he propuesto la integración de información de estructura, cinética y cambios de energía asociados a reacciones bioquímicas y a cambios mecánicos. La convergencia de diferentes disciplinas permite interpretar cómo las características físicas de las interacciones entre moléculas y sus movimientos logran que la célula albergue y transfiera información para subsistir. Esta producción se comunica al público en forma de tesis y artículos.

Este aspecto se demuestra con el trabajo de revisión presentado como **Capítulo 1**.

Perfil de Egreso, Parte 2

“Integra los conocimientos de diferentes disciplinas, es proactivo, realiza trabajo interdisciplinario y en equipo, y tiene capacidad de auto-aprendizaje.”

En particular, la necesidad de datos estructurales del complejo de iniciación de la transcripción me condujo a contactar al grupo de biología estructural LNNano, dirigido por Rodrigo Portugal, en el CNPEM, Campinas, Brasil. Para tener un contacto más cercano con la criomicroscopía electrónica y el análisis de imágenes, asistí a una estadía de entrenamiento el año 2017 conducida por dicho grupo de investigación. Desde entonces promuevo que la UPCH forme una capacidad propia en estas técnicas. Esta propuesta de desarrollo institucional fue publicada en el Acta Herediana y se presenta en el **Capítulo 2**.

Para promover el trabajo en equipo en busca del progreso de la ciencia en el Perú, he liderado la formación de la Sociedad Peruana de Bioquímica y Biología Molecular. Esta asociación es

Perfil de Egreso de la Carrera profesional de Biología

reconocida como grupo adherente de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Dos referencias públicas a esta asociación se presentan en el **Anexo 1**.

Perfil de Egreso, Parte 3

“Se caracteriza por un pensamiento científico que se desenvuelve en el marco de la ética...”

He sido accesitario en el comité de ética del INS-Niño San Borja. Esto consta en la comunicación presentada en el **Anexo 2**.

Como todo investigador subvencionado por el CONCYTEC/FONDECYT, he aprobado el curso de conducta responsable en investigación. Este certificado se presenta en el **Anexo 3**.

Perfil de Egreso, Parte 4

“...comprometido con el bienestar y el progreso de la sociedad.”

Motivado por contribuir a mejorar la educación en el Perú, he participado como asesor del SINEACE y consultor del MINEDU para la elaboración de estándares, currículo y material de apoyo para la educación en Ciencia y Tecnología. Estas actividades se detallan en el **Anexo 4**.

Los proyectos que registro manifiestan la motivación de contribuir al bienestar y progreso de la sociedad a través de diferentes actividades. Las investigaciones sobre la transcripción en *Mycobacterium tuberculosis* se dirigen a contribuir en la lucha contra la resistencia antibiótica. La investigación en biosensores está dirigida a mejorar la educación secundaria en el Perú. La lista de estos proyectos se encuentra en el **Anexo 5**.

Capítulo 1

Revisión de Estudios biofísicos de las ARN polimerasas de *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*

En diez años bajo mi dirección, el Laboratorio de Moléculas Individuales ha contribuido con el conocimiento fundamental de la transcripción en procariontas con un enfoque propio de la biofísica molecular. Con esta aproximación, utilizamos una combinación de datos de estructura, cinética y cambios de energía asociados a reacciones bioquímicas y a cambios mecánicos, para interpretar cómo las características físicas de las interacciones entre moléculas y sus movimientos logran albergar y transferir la información biológica que permite a la célula subsistir. Esta información no está constituida únicamente por los genes, sino por las condiciones lógicas que regulan la actividad de cada uno.

Este documento expone en forma aproximadamente cronológica algunos hallazgos e interpretaciones que hemos reportado en artículos y tesis. Al enfocarnos en el progreso de la comprensión de los sistemas estudiados solo se presentará una fracción de los resultados obtenidos, se obviará el planteamiento de múltiples hipótesis alternativas que surgieron en el camino y no se describirá detalladamente las metodologías utilizadas. Se concluye cada una de las dos partes con hipótesis adicionales y una propuesta para la pertinencia en *M. tuberculosis* de los hallazgos realizados en *E. coli*.



1

¹ Figura adaptada de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MRNA.svg>

Abreviaturas

CryoEM	Crío-microscopía electrónica
EcoRNAP	ARN polimerasa de <i>E. coli</i>
EcoRNAP· σ 70	Holoenzima ARN polimerasa de <i>E. coli</i> con factor sigma 70
EcoRNAP· σ A	Holoenzima quimérica ARN polimerasa de <i>E. coli</i> con factor sigma A propio de <i>M. tuberculosis</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
MtbRNAP	ARN polimerasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ppGpp	Guanosina tetrafosfato
RFP	Proteína roja fluorescente
RNAP	ARN polimerasa
RPo	Complejo de iniciación de la transcripción
σ 70	Factor sigma 70, mayoritario en <i>E. coli</i>
σ A	Factor sigma A, mayoritario en <i>M. tuberculosis</i>
TEM	Microscopía electrónica de transmisión

Resumen

Se expone a continuación los aportes científicos en transcripción bacteriana realizados en el Laboratorio de Moléculas Individuales, específicamente sobre: la estructura y paisaje energético del inicio de la transcripción, los efectos del ppGpp en la iniciación y la elongación, y la caracterización de la dinámica de MtbRNAP.

Combinando el uso de pinzas ópticas, nucleótidos marcados, AFM, y fluorescencia, se ha demostrado el rol preponderante del enrollamiento como determinante de la estabilidad del RPo en *E. coli*, donde resulta antagonista a la acción de ppGpp y catalizador de la tanto la apertura del ADN como del escape de promotor. Se discute las perspectivas de estudio sobre la interacción entre el superenrollamiento topológico del ADN y el enrollamiento en complejos de transcripción.

Mediante la manipulación de enzimas RNAP individuales durante la elongación de la transcripción, se realiza la caracterización inicial de la actividad de MtbRNAP y del efecto del ppGpp sobre EcoRNAP. Además, para favorecer nuevos estudios en MtbRNAP, se produjeron dos sistemas de expresión, uno basado en plásmidos con usaje de codones optimizado y otro basado en la integración de genes de *M. tuberculosis* en el cromosoma de *E. coli*. Este último produce menos estrés a la bacteria portadora y permitirá el uso de genes reporteros fluorescentes GFP y RFP para cuantificar las actividades de MtbRNAP y EcoRNAP en simultáneo y de manera específica sin necesidad de purificar las proteínas.

Abstract

We present here the scientific contributions on bacterial transcription made in the Laboratory of Single Molecules, specifically on: the structure and energy landscape of transcription initiation, the effects of ppGpp on initiation and elongation, and the characterization of the dynamics of MtbRNAP.

Combining the use of optical tweezers, radio-labeled nucleotides, AFM, and fluorescence, we have demonstrated the role of DNA wrapping as determinant of the RPo stability in *E. coli*. DNA wrapping antagonizes the inhibitory action of ppGpp and facilitates both the opening of DNA and the promoter escape. A possibility to study the interaction between topological DNA supercoiling and RPo DNA wrapping is discussed.

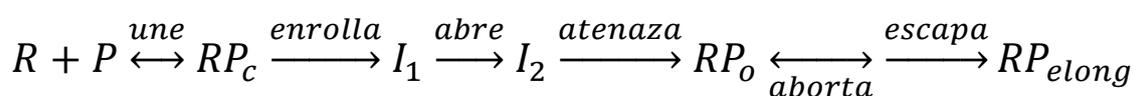
By manipulating single RNAP enzymes during transcription elongation, the initial characterization of MtbRNAP activity and the effect of ppGpp on EcoRNAP were performed. In addition, to contribute to new studies in MtbRNAP, two expression systems were produced: one based on plasmids with *E. coli*-optimized codon usage and the other based on the integration of *M. tuberculosis* genes into the chromosome of *E. coli*. The latter produces less stress on the carrier bacteria and will allow the use of GFP and RFP fluorescent reporter genes to quantify the activities of MtbRNAP and EcoRNAP simultaneously and specifically without the need to purify the proteins.

I. Introducción

La transcripción es el puente entre la información que define a un organismo y la información que su supervivencia requiere en cada momento según la situación que atraviesa. Como tal, es un proceso esencial, continuo, finamente regulado y capaz de establecerse en estados o ‘modos’ de funcionamiento metaestables, que cambian como respuesta inteligente a las situaciones que vive la célula.

Entre las bacterias, *E. coli* es el sistema más estudiado, en donde aproximadamente 1500 (en crecimiento lento) a 11 000 (en crecimiento rápido) moléculas de ARN polimerasa (RNAP) (Bremer & Dennis, 1996) tienen la misión de transcribir -según las necesidades del momento- la información de ~4500 genes, ubicados en ~1.5 milímetros de ADN (Keseler et al., 2009) que se encuentra compactado de manera dinámica al interior de un volumen total de 1.5 a 4.4 femto litros (Volkmer & Heinemann, 2011). Dadas estas condiciones, la probabilidad de encuentro entre una RNAP y un segmento cualquiera de ADN no es baja. Sin embargo, para que llegue a darse el inicio de la transcripción de una secuencia, es necesario que, tras su encuentro fortuito en el espacio, RNAP y un segmento específico de ADN se orienten uno a otro y se transformen en una serie de pasos.

El modelo actual del inicio de la transcripción (Kontur, Capp, Gries, Saecker, & Record, 2010; Kontur, Saecker, Capp, & Record, 2008; Saecker, Record, & Dehaseth, 2011; Ruff, Record, & Artsimovitch, 2015; Marchetti, Malinowska, Heller, & Wuite, 2017) consta de los siguientes pasos:



Donde R representa a la holoenzima RNAP, P al promotor, RP_c al complejo cerrado, I_1 e I_2 a intermediarios cinéticos (Hawley & McClure, 1980), RP_o al complejo abierto y RP_{elong} al complejo de elongación ya alejado de las interacciones iniciales que tuvo con el promotor. Las transiciones entre estos estados consisten en: la **unión** reversible inicial de la enzima y el promotor, dada por difusión aleatoria; un primer paso de cambios de conformación que incluye el **enrollamiento** del ADN upstream del promotor sobre la superficie de la RNAP; la desnaturalización del ADN que abre la burbuja de transcripción, en donde 9-11 nucleótidos de ADN de hebra simple se **abren** al interior de la enzima y serán molde para la polimerización del ARN transcrito; se **atenaza** el ADN downstream al promotor en una suerte de abrazadera de la proteína ('clamp') que asegura una unión más estable (Kontur et al., 2008); se incorporan los primeros nucleótidos en un número crítico suficiente para obligar a la RNAP a translocarse en dirección downstream y **escapar** de sus contactos iniciales con el promotor. Por debajo del número crítico de nucleótidos (típicamente 6-11), el transcrito inicial de ARN puede ser expulsado del complejo, con lo que se regresa a la configuración RP_o . La producción de estos transcritos pequeños sin translocación de la enzima se llama **iniciación abortiva** y es típica de los promotores que forman complejos RP_o más estables. Se piensa que la polimerización de los nucleótidos iniciales sin translocación del complejo provoca una compresión del ADN al interior de la enzima ('scrunching'), lo que acumularía la energía necesaria, como si fuera un resorte, para disparar la ruptura de interacciones entre la RNAP y el promotor (Kapanidis et al., 2006; Henderson et al., 2017).

La barrera física más notoria para la iniciación es la desnaturalización que forma la burbuja de transcripción, proceso que ocurre impulsado por cambios configuracionales y energías de interacción, sin la participación de helicasas o la hidrólisis de enlaces fosfato. Una vez formada la burbuja de transcripción, esta puede propagarse sin costo energético neto pues, como viaja una onda, la apertura de una base (adelante) se 'paga' con la energía de cierre de otra base

(detrás). Entonces, es necesario el concurso de secuencias e interacciones específicas para iniciar un proceso que puede luego propagarse sin importar la secuencia del gen que prosigue.

Motivado por la existencia de polimorfismos en RNAP asociados a la resistencia antibiótica, decidí investigar al detalle el funcionamiento de esta enzima. Usando un microscopio de fuerza atómica (AFM) propuse observar complejos individuales de iniciación, para indagar si las mutaciones o las interacciones con reguladores podían alterarlos de alguna manera que pudiéramos detectar. Por otro lado, usando pinzas ópticas, también podríamos cuantificar alteraciones en el proceso de elongación de manera muy detallada. Con estas ideas y con la propuesta adicional de transferir lo hallado a la enzima de *Mycobacterium tuberculosis*, se obtuvo el financiamiento del Fogarty Institute de los NIH el año 2010². Lo que sigue es una historia de hallazgos que, aunque con una ruta muy diferente a la propuesta inicialmente, contribuyen en suma a la comprensión de la transcripción con un nuevo esquema del paisaje energético de la iniciación. Discutiré además cómo estos sistemas experimentales podrán utilizarse para abordar nuevos retos de investigación.

II. Transcripción en *Escherichia coli*.

Iniciación de la transcripción

Diversos laboratorios observaron que al tratar un complejo de iniciación de transcripción con DNAsas, la porción de ADN protegida era más extensa que la dimensión de la RNAP. Con la proteína midiendo unos 10 nm de largo, no se explica directamente la protección de una extensión de 30 nm de ADN (~100 bp) o más. Por ello, se propuso que el ADN estaba enrollado, envolviendo la superficie de la RNAP, lo que explicaría por qué no se encuentra disponible para la digestión por DNAsas. – una revisión en (Coulombe & Burton, 1999).

² Fogarty International Research Collaboration Basic Biomedical (FIRCA-BB) Research Award (R03)

Capítulo 1

En 1998, Rivetti *et al.* publican una observación más directa de esta configuración enrollada, al medir mediante AFM la longitud del ADN en interacción con RNAP. A diferencia del ADN libre o del ADN en interacción inespecífica con RNAP, los complejos de iniciación formados en el promotor λ_{pR} mostraron una compactación del ADN en casi 30 nm (Rivetti, Guthold, & Bustamante, 1999). Entre los años 2008 y 2010, Piere Rodríguez reproduce en el Laboratorio de Moléculas Individuales estas observaciones y, además, descubre que al pre-incubar la enzima RNAP con guanosina tetrafosfato (ppGpp), la compactación se reduce sustancialmente (Rodríguez, 2011). El ppGpp es un metabolito presente en todas las Eubacterias conocidas que sirve como señal de inanición. En el año 2009 se conocía su acción como regulador de la transcripción, principalmente como un desestabilizador de los complejos de iniciación. Sin embargo, no se conocía su sitio de unión, ni se tenía claro el principio físico de su función. Estos fueron descritos con mayor detalle a partir de la publicación de la estructura 3D de la RNAP de *E. coli* el año 2013 (Zuo, Wang, & Steitz, 2013).

Jorge Bardales probó la influencia de concentraciones no-saturantes de ppGpp y obtuvo una estimación de subpoblaciones de complejos sin ppGpp (con enrollamiento) y con ppGpp (sin enrollamiento) presentes en simultáneo de manera dependiente de la concentración. Esta dependencia de la concentración confirmó la relación causal de la unión del ppGpp a la ARN polimerasa y el cambio conformacional del RPo a una forma con menor enrollamiento. Sus resultados también indicaron una pérdida del enrollamiento cuando la enzima pasa al estado de elongación en la posición +70 (Bardales-Mendieta, 2012).

Una extensa serie de experimentos indicó que el RPo estable formado en el promotor λ_{pR} perdía parcialmente su estabilidad y enrollamiento con ppGpp, pero recuperaba ambos al unirse a la proteína reguladora DksA., mientras que no recibe influencia por nucleótidos. Por otro lado, el RPo formado en un promotor inestable, el *rrnB* P1, presenta poco enrollamiento y no

Capítulo 1

lo pierde más con ppGpp, mientras que el DksA compite con los nucleótidos y evita la estabilización provocada por estos (Doniselli et al., 2015).

Gracias a la cuantificación de los estados llegamos a un cálculo de constante de equilibrio y cambio de energía libre para la formación del RPo en cada condición. La influencia del ppGpp y DksA sobre la estabilidad de los RPo en los promotores y rrnB P1 se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 2. Los efectos de ppGpp en iniciación son consistentes con un debilitamiento de la interacción ADN-proteína y se resumen de manera cualitativa en la Figura 1.

Promotor	Modulador	Moléculas de ADN totales	Complejos específicos	Complejos inespecíficos	% de ADN ocupado	Kd (nM)	ΔG (kJ/mol)
rrnB P1	-	4896	352	2615	6.7 %	31.9	-42.7
rrnB P1	200 μ M ppGpp	5470	333	2055	6.1 %	40.4	-42.1
rrnB P1	650 nM DksA	7541	345	2133	4.6 %	59.0	-41.2
rrnB P1	200 μ M ppGpp + 650 nM DksA	9626	337	2692	3.5 %	76.9	-40.5

Tabla 1. **Efectos del ppGpp y DksA sobre el promotor rrnB P1.** Todos los datos corresponden a complejos estabilizados por la adición de los nucleótidos iniciales ATP y CTP. Comparando los cambios de energía libre puede obtenerse el efecto de cada modulador sobre la estabilidad del RPo: $\Delta\Delta G$ ppGpp = +0.6 kJ/mol, $\Delta\Delta G$ DksA = +1.5 kJ/mol; $\Delta\Delta G$ ppGpp+DksA, +2.2 kJ/mol. Dado que 0.6 kJ/mol + 1.5 kJ/mol \approx 2.2 kJ/mol, puede concluirse que los efectos de desestabilización por ppGpp y DksA sobre la formación del complejo RPo en rrnB P1 son independientes y aditivos. Tomado de (Doniselli et al., 2015)

Promotor	Modulador	iNTPs	Moléculas de ADN totales	Complejos específicos	Complejos inespecíficos	% de ADN ocupado	Kd (nM)	ΔG (kJ/mol)
pR	--	--	1401	336	1429	0.239	3.1	-48.5
pR	--	ATP + UTP	1443	339	1471	0.235	2.9	-48.7
pR	200 mM ppGpp	--	7156	347	1547	0.049	58.3	-41.2

pR	200 mM ppGpp	ATP + UTP	2972	342	2020	0.115	14.7	-44.6
pR	200 mM ppGpp 650 nM DksA	--	3373	356	1399	0.106	20.0	-43.9

Tabla 2. **Efectos del ppGpp y DksA sobre el promotor λp_R .** Nótese que en todos los casos la estabilidad del RPo en este promotor es superior que en *rrnB P1*. Al ser un RPo tan estable, la adición de los nucleótidos iniciales ATP y UTP no tiene efecto significativo. Sin embargo, ante la adición de 200 μ M ppGpp, el complejo se torna menos estable (tiene además menos enrollamiento) y es sensible a la estabilización por iNTPs. Interesantemente, la adición de DksA, que compite por el sitio de unión con los nucleótidos iniciales, estabiliza ligeramente al RPo previamente desestabilizado. Este efecto es consistente con otro reporte (Łyzen, Kochanowska, Wegrzyn, & Szalewska-Palasz, 2009) y con el hecho de ser abolido por un exceso de NTPs (no mostrado). Tomado de (Doniselli et al., 2015)

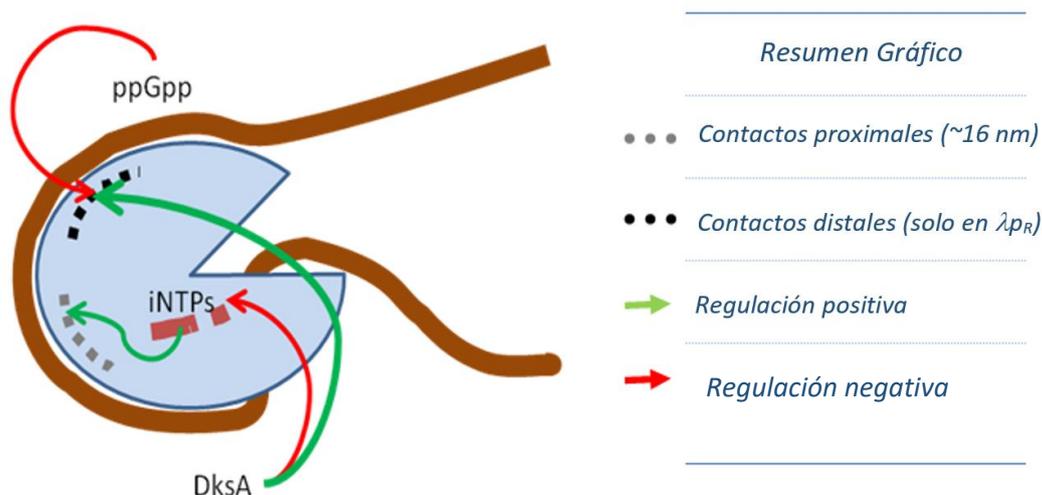


Figura 1. Algunas acciones de los nucleótidos iniciales (iNTPs), DksA y ppGpp sobre el complejo de iniciación con enrollamiento. El promotor menos estable, *rrnB P1*, con solo contactos proximales, requiere ser estabilizado por iNTPs, efecto que es inhibido por DksA. El promotor más estable, λp_R , con contactos distales, se convierte en un complejo menos estable en presencia de ppGpp y se torna susceptible a la influencia de los iNTPs. Nota: Este esquema no explica la recuperación de contactos distales en λp_R ante la adición de DksA, ni la desestabilización de *rrnB P1* por ppGpp.

Dado que el ppGpp es un regulador de amplio espectro de la transcripción, esta serie de resultados fue la primera evidencia de la relevancia del enrollamiento para regular la formación de posiblemente la mayoría de los complejos de iniciación. Ampliando el set de observaciones,

Capítulo 1

Lucas Tafur estudió la configuración de los promotores rrnB P1 y P2, que se ubican naturalmente en tándem, uno seguido del otro. Encontró que ambos podían ser poblados simultáneamente, pero que cuando esto ocurría, se provocaba un enrollamiento menor. Así, se propuso el enrollamiento como parte de un mecanismo de interferencia entre los dos promotores (Tafur Petrozzi, 2014). Sin embargo, no se llegó a confirmar que ambos RPo eran transcripcionalmente activos simultáneamente.

Para estudiar con mayor profundidad la influencia del enrollamiento sobre la iniciación de la transcripción, se pasó a manipular directamente el ADN envuelto, utilizando pinzas ópticas. Así, gracias al trabajo de Robert Sosa hallamos que, al jalar los dos extremos del ADN de un RPo, el ADN se desenrolla en una transición totalmente cooperativa, y que esta se revierte espontáneamente al reducir la tensión. Gracias a que este ejercicio de tensión - ¡sorprendentemente! - no induce la disociación del RPo, se pudo cuantificar con precisión la energía involucrada en el enrollamiento para dos promotores de alta estabilidad susceptibles de ser estudiados con esta técnica: λp_R y BLA. La influencia de mutaciones, concentración de iones, glutamato y ppGpp fue medida para el enrollamiento en λp_R . Los cambios a una mayor o menor estabilidad del enrollamiento coincidieron en todos los casos con medidas semejantes reportadas para la estabilidad total del RPo (Sosa-Principe, 2017). Más aun, la estabilidad del enrollamiento, 12.9 kcal/mol, resultó sorprendentemente cercana en magnitud a la estabilidad total del RPo 16.2 kcal/mol medida por otras técnicas.

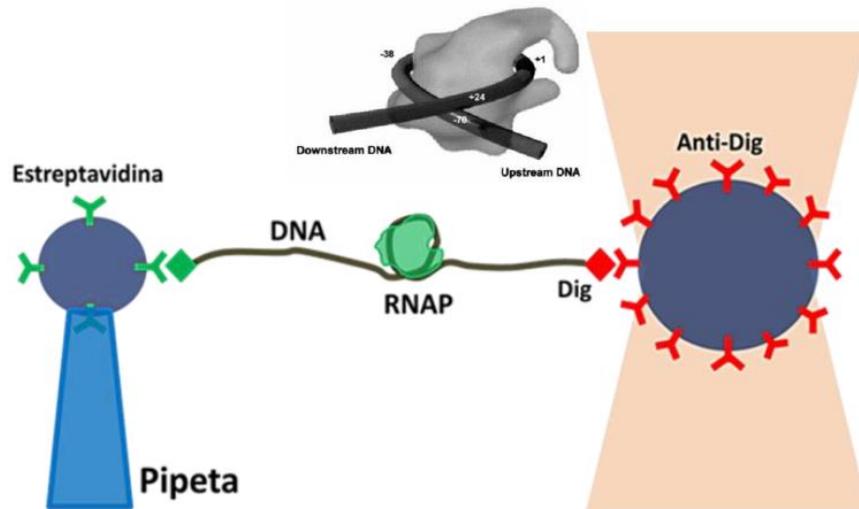


Figura 2: **Geometría para el estudio de enrollamiento en pinzas ópticas.** Se observa que el complejo enrollado es capturado a partir de los extremos del DNA por las modificaciones en el extremo 5' y 3' con digoxigenina (rojo) y biotina (verde), respectivamente. Cada extremo es capturado por una bolita que tiene estreptavidina o anti-digoxigenina inmovilizada. La bolita con anticuerpos anti-digoxigenina es manipulada por la trampa óptica, lo que causa el estiramiento (hasta 15 pN) o relajación (hasta 4 pN) del complejo DNA-proteína. Tomado de (Sosa-Principe, 2017).

Por otro lado, gracias a la colaboración establecida con Rodrigo Portugal, líder científico del laboratorio LNNano del CNPEM, nuestro equipo detectó el ADN enrollado mediante análisis de partículas individuales (Single-Particle-Analysis, SPA) a partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Alfredo Florez construyó un modelo 3D de la superficie del complejo RPo en LambdaPR utilizando esta técnica, llegando a una resolución de 2 nm (Florez-Ariza, 2018). Combinando este modelo con los datos provenientes de estructuras cristalográficas, se determinó que el ADN involucrado en el enrollamiento corresponde enteramente a secuencias upstream del promotor, hasta la posición -79. Además, las medidas encajaron perfectamente con la longitud del ADN enrollado y desenrollado en la transición reversible realizada por manipulación con pinzas ópticas. La construcción de un modelo con mayor resolución utilizando CryoEM podrá confirmar la posición de los contactos del ADN con las subunidades alfa de la ARN polimerasa, así como la existencia de una tensión en el ADN por torsión o la desnaturalización parcial de algunas pares de bases involucradas. Con

ello se espera además tener una base estructural para estimar la contribución de los contactos y la torsión a la estabilidad del RPo y posiblemente la dependencia de su aporte energético según la secuencia.

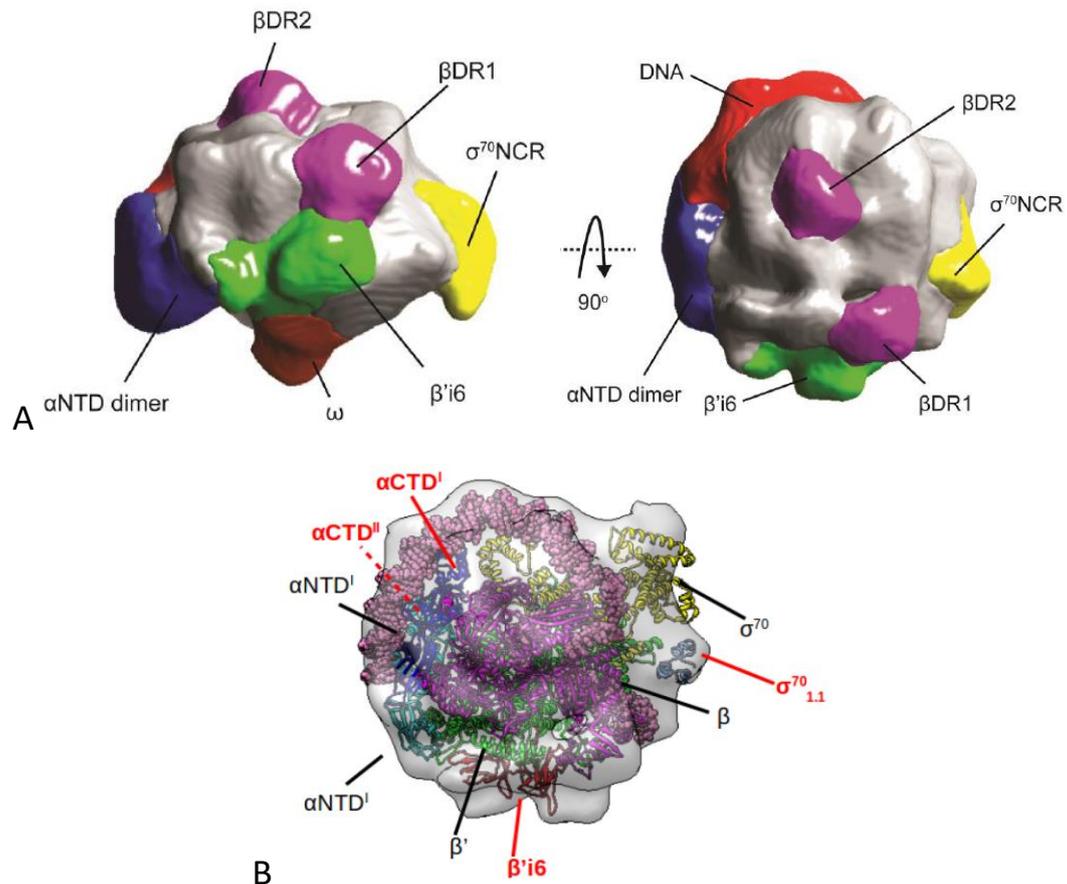


Figura 3. **Modelo 3D del complejo de iniciación.** **A**, se señala los módulos directamente reconocibles de la enzima en la superficie del modelo. **B**, superposición con las coordenadas 3D correspondientes a la estructura cristalográfica y con un ADN upstream construido *de novo* siguiendo la estructura del modelo. Tomado de (Florez-Ariza, 2018).

Para interrogar cómo el enrollamiento influencia la reacción de asociación de la RNAP y el promotor ($R + P \rightarrow RP_C \rightarrow I_1$), la apertura del ADN ($I_1 \rightarrow I_2$) y el escape del promotor ($RP_O \rightarrow RP_{Elong}$), Robert Sosa y César Díaz, en el laboratorio de Carlos Bustamante en UC-Berkeley, llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando un dúplex de ADN marcado con fluorescencia en la posición +2 del promotor λp_R (fragmento limitado en las posiciones desde

-100 hasta +18). Mediante el uso de diferentes condiciones de salinidad y mutaciones, se encontró que la estabilidad del enrollamiento no influye en la cinética de asociación $R + P$, pero sí acelera la apertura $I_1 \rightarrow I_2$, y el escape $RP_O \rightarrow RP_{Elong}$. Además, la adición de ppGpp no influyó sobre la asociación, pero sí redujo la velocidad de apertura del ADN a la mitad, efecto que fue mucho mayor (a casi un décimo) en ausencia de enrollamiento (con un constructo limitado en las posiciones desde -40 a +18 de λ_{PR}).

La interpretación resumida de todas estas observaciones es que el enrollamiento estabiliza al RP_O , cataliza la apertura de la burbuja de transcripción en oposición al efecto del ppGpp, y favorece que el ‘scrunching’ sea efectivo en su función de provocar el escape del promotor.

Elongación de la transcripción

Robert Sosa colectó resultados de elongación de la transcripción por *E. coli* en el Laboratorio de Moléculas Individuales, en ausencia y presencia de ppGpp. Demostró que la velocidad libre de pausas se incrementa en presencia de ppGpp, de 11.24 ± 4.8 a 19.85 ± 5.45 nt/s. Una reducción de la ‘fricción’, por debilitamiento de las interacciones ADN-proteína durante la elongación es consistente con una mayor velocidad de traslación durante la elongación del transcrito y también durante la difusión sin sesgo que ocurre en las pausas. Se pudo estimar el parámetro difusivo del complejo de elongación aumenta a casi el triple en presencia de ppGpp (de 23.95 ± 3.23 a 67.26 ± 5.13 s⁻¹), lo que podría interpretarse, según el modelo difusivo de la translocación de RNAP (Dangkulwanich et al., 2013), como un incremento de la vibración del complejo entre los estados pre y pos-translocación (Sosa-Principe, 2014). Sin embargo, faltaron datos para precisar la magnitud (o ausencia) de cambios en la distribución de pausas.

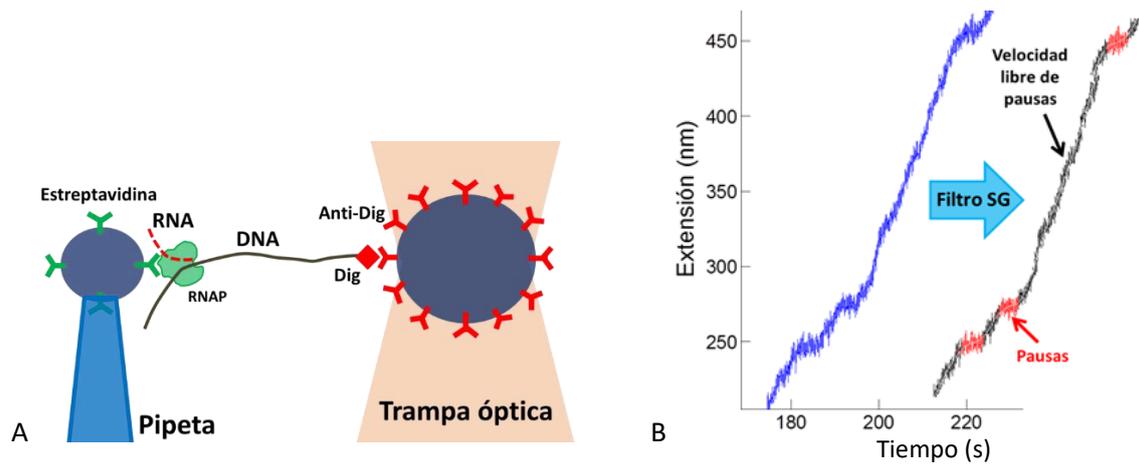


Figura 4. **Seguimiento de la elongación de la transcripción con pinzas ópticas.** **A. Geometría del experimento.** La pipeta captura una microesfera de poliestireno con estreptavidina (verde), y esta se une a la biotina de la enzima RNAP-biotinilada (verde). La RNAP se encuentra unida como un complejo ternario de elongación, detenido debido a la ausencia de uno de los cuatro nucleótidos. El ADN modificado con digoxigenina (rombo rojo) se encuentra unido a otra microesfera capturada por la trampa óptica. Cuando se agregan una mezcla de los cuatro NTP, la RNAP jala al ADN, acortando la distancia entre las dos esferas. Mediante un sistema de retroalimentación, la trampa se desplaza, ‘persiguiendo’ el movimiento causado por la actividad de la RNAP. De esta manera se puede obtener el desplazamiento por unidad de tiempo (velocidad de transcripción) de la RNAP en la elongación. **B. Ejemplo de una porción de trayectoria de transcripción de una RNAP individual.** La traza de color azul representa los datos crudos. Cuando se aplica el filtro Savitzky-Golay (SG) y un umbral de tiempo de permanencia se seleccionan las pausas (rojo) y la elongación activa o ‘libre de pausas’ (negro). Tomado de (Sosa-Principe, 2014).

Aunque el resultado de una transcripción ‘acelerada’ es sorprendente debido que en general el ppGpp reduce la actividad de transcripción *in vitro*, es consistente con la reducción de interacciones entre el ADN y la proteína RNAP.

Hipótesis adicional

El modelo 3D construido a partir de imágenes TEM permite reconocer que el ADN enrollado se encuentra en sentido de superenrollamiento negativo. Esto lleva a proponer una interacción nueva entre el grado de superenrollamiento del ADN y el inicio de la transcripción. El superenrollamiento negativo del ADN cromosómico o plasmídico aportaría (i) estabilidad del rizo de ADN formado por el enrollamiento sobre la ARN polimerasa, además de las maneras conocidas: de tres maneras:; (ii) curvatura entre las posiciones -10 y -35 para el contacto con

el factor sigma (Aoyama & Takanami, 1988), (iii) inestabilidad de las interacciones Watson-Crick para facilitar la apertura del ADN (Dorman & Dorman, 2016).

Aun no se realizan estudios que puedan aislar y medir cómo este nuevo aporte del superenrollamiento a la estabilidad del RPo influencia la transcripción. Esto podría realizarse con un sistema plasmídico en el que se incluyan dos promotores en sentido opuesto. Un promotor *A* sería controlado por el experimentador para ser inhibido por completo, o transcrito en una medida regulada por un inductor. Este promotor inducido serviría para provocar una cantidad creciente de superenrollamiento negativo sobre un segundo promotor *B*, estimulándolo. La influencia de *A* sobre *B* debería depender de: el grado en que la actividad de *B* depende de la estabilidad de su enrollamiento en la superficie de RNAP; del grado en que la actividad de *B* depende de la curvatura entre sus hexanucleótidos -10 y -35; y del grado en que la actividad de *B* depende de la estabilidad del dúplex de su secuencia -12 a +1 (burbuja inicial de transcripción). Si al modificar únicamente las secuencias upstream de *B*, se altera la curva de influencia de *A* sobre *B*, se podría confirmar la hipótesis de que el enrollamiento del ADN en el RPo sirve de principio físico para la influencia del superenrollamiento sobre la actividad de un promotor.

Este experimento podría realizarse con el gen RFP bajo el control de un promotor T7A1, reprimido por la proteína CymR, que permite la inducción creciente dependiente de la dosis de cumato añadida al medio de cultivo (Choi et al., 2010). Utilizando diferentes dosis de cumato y verificando la aparición de expresión creciente de RFP, podrá medirse la actividad del gen GFP controlado por distintos mutantes del promotor λp_R con mayor o menor estabilidad de enrollamiento. Probablemente, la versión del promotor con enrollamiento menos estable (MutB) presente una fuerte dependencia por grados altos de superenrollamiento (i.e. requiere alta actividad de expresión de RFP); mientras que la versión con enrollamiento más estable

(MutA) probablemente mostrará mayor influencia ejercida por grados bajos de superenrollamiento, con los grados altos ya imposibilitados de estimularlo más allá.

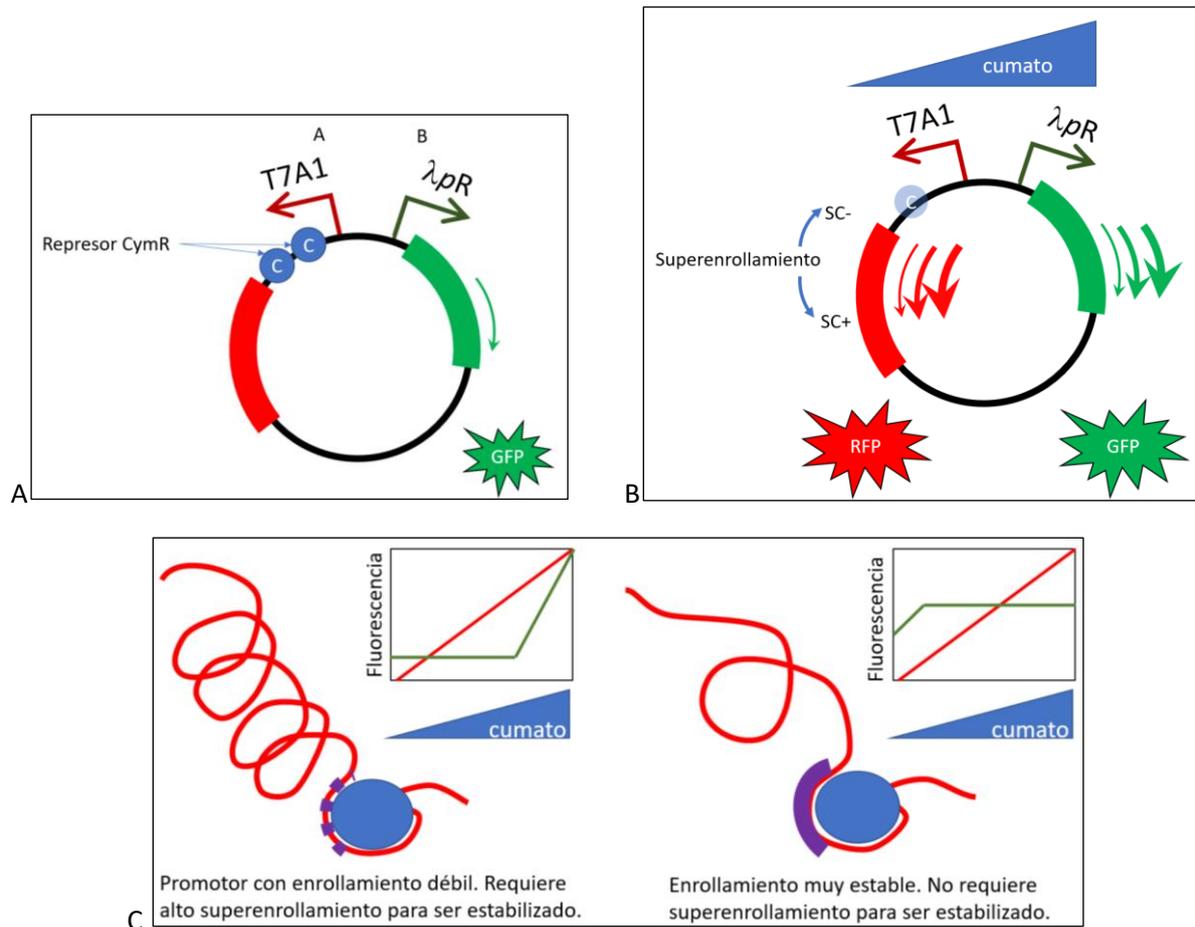


Figura 5. Experimento para medir la influencia del superenrollamiento mediada por enrollamiento en RPO. **A**, en ausencia del inductor, solo se observa la expresión basal de GFP por el promotor λpR . **B**, en presencia del inductor, la transcripción del gen RFP genera superenrollamiento negativo que influencia al promotor λpR . **C**, interacción entre superenrollamiento del plásmido y enrollamiento del Rpo. Se predice que un complejo RPO de enrollamiento inestable será estimulado fuertemente solo por grados altos de superenrollamiento negativo; mientras, un complejo con enrollamiento estable no requiere el aporte del superenrollamiento y solo será influenciado en pequeña medida hasta alcanzar un máximo tempranamente.

III. Transcripción en *Mycobacterium tuberculosis*

La enzima ARN polimerasa de *M. tuberculosis* es el blanco molecular del exitoso antibiótico de primera línea, Rifampicina. Por ello, y por la alta prevalencia de polimorfismos en esta enzima asociados a resistencia antibiótica, resulta de alto interés estudiarla. La confección de un sistema recombinante de producción de MtbRNAP tomó muchos años de estrategias alternativas ensayadas por Omar Herrera (O. Herrera-Asmat, 2012; O. C. Herrera-Asmat, 2016).

La co-expresión de los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoZ* y *rpoD* para el ensamblado de la holoenzima $\alpha_2\beta\beta'\sigma A$, fue publicada poco después del trabajo de maestría de Omar Herrera (Banerjee, Rudra, Prajapati, Sengupta, & Mukhopadhyay, 2014). Adoptamos esta estrategia de producción utilizando versiones optimizadas de estos genes para su expresión tomando en cuenta el usaje de codones de *E. coli*. El rendimiento obtenido es de aproximadamente 1-2 mg de proteína purificada por litro de cultivo. Esta producción y el ensayo de la enzima en solución, así como inmovilizada en microesferas cubiertas de estreptavidina (beads) (O. Herrera-Asmat et al., 2017).

Utilizando este sistema recombinante, y mejorando el protocolo de biotilación, Keren Espinoza midió la actividad de elongación de moléculas individuales de MtbRNAP. Se determinó que, aunque la dependencia de fuerza y la distribución de pausas son aproximadamente similares, la elongación de MtbRNAP es sustancialmente más lenta que la de EcoRNAP, con una velocidad promedio de 6.5 0.4 nt/s (Espinoza-Huertas, 2018) frente a una velocidad superior a 10 nt/s reportada por diversos estudios en EcoRNAP (Adelman et al., 2002; Davenport, Wuite, Landick, & Bustamante, 2000; Mejia, Mao, Forde, & Bustamante, 2008; Neuman, Abbondanzieri, Landick, Gelles, & Block, 2003; Robert Sosa, 2014; Shaevitz, Abbondanzieri, Landick, & Block, 2003; Yin et al., 1995).

Capítulo 1

En busca de un sistema de expresión más estable, y con el objetivo adicional de lograr un sistema de ensayo de alto rendimiento para el hallazgo de nuevos inhibidores, se integró los cuatro genes de la enzima MtbRNAP en el cromosoma de una bacteria *E. coli*. Se pudo medir la actividad de MtbRNAP al interior de esta bacteria utilizando un plásmido reportero portando un promotor reconocido por esta enzima y el gen de GFP. La bacteria integrada con los genes de *M. tuberculosis* arrojó una fluorescencia leve al no ser inducida con IPTG, semejante en valor a la fluorescencia basal de una bacteria *E. coli* transformada únicamente con el plásmido reportero. Luego, ante la adición de 0.2 mM IPTG, únicamente la bacteria integrada mostró un incremento de la señal de fluorescencia, aproximadamente 10x superior a la basal.

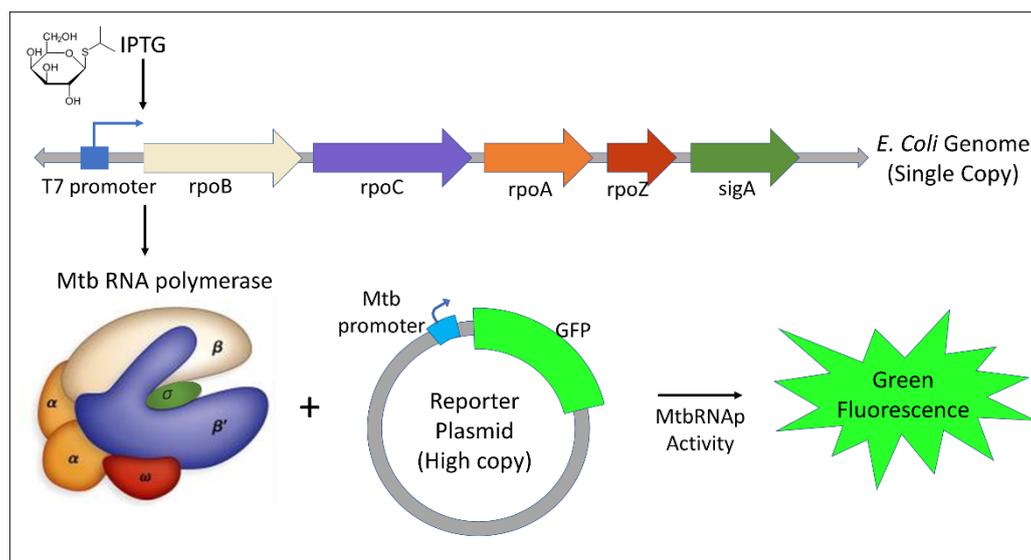


Figura 6. **Funcionamiento de una bacteria reportera de la actividad MtbRNAP.** Los genes para la expresión de MtbRNAP se hallan bajo el control de un promotor reconocido únicamente por la polimerasa T7. En la bacteria BL21(DE3) rec⁻ (BLR) la producción de polimerasa T7 es inducida por la adición de IPTG. La enzima MtbRNAP expresada por T7 y correctamente ensamblada en *E. coli* puede reconocer un promotor específico, presente en un plásmido de alta copia. La fluorescencia GFP es indicador de la cantidad de actividad MtbRNAP presente en la célula.

Por otro lado, la expresión de la subunidad σ_A de *M. tuberculosis* en *E. coli* también permitió por sí sola la transcripción a partir del promotor sinP3, normalmente no reconocido por la enzima EcoRNAP o la holoenzima nativa EcoRNAP· σ^{70} . Aunque la producción de GFP por la

Capítulo 1

bacteria que expresa únicamente σA fue inferior (aproximadamente 4x la fluorescencia basal) a la que expresa de manera completa MtbRNAP· σA , este resultado indica que σA puede ensamblarse con EcoRNAP formando una holoenzima quimérica EcoRNAP· σA , que reconoce productivamente al promotor que hemos utilizado. Este resultado refuta lo reportado anteriormente para ensayos de EcoRNAP sobre sinP3 (Banerjee, Rudra, Saha, & Mukhopadhyay, 2015). Sin embargo, nuestro resultado es consistente con lo observado por otros investigadores que expresaron diversos factores sigma en *E. coli* y comprueban la formación de holoenzimas quiméricas (Chauhan et al., 2016). Para fines de medir la actividad de MtbRNAP· σA al interior de *E. coli*, como un sistema de ensayo de alto rendimiento de inhibidores, será importante considerar que una fracción importante (~40%) de la actividad observada corresponde a la enzima quimérica.

En busca de una manera de normalizar y cuantificar de manera confiable la actividad de MtbRNAP, se incorporó el gen de una proteína fluorescente roja, RFP, bajo el control del promotor Lac, que es reconocido por EcoRNAP. De esta manera buscamos que la razón de las fluorescencias GFP/RFP sirviera para cuantificar la cantidad de actividad MtbRNAP por célula de *E. coli*. Sorprendentemente, la actividad del promotor Lac, distanciado del promotor sinP3 por 300 pares de bases, resultó en un descenso de la actividad MtbRNAP· σA . Con el reportero simple (sinP3-GFP), la fluorescencia basal obtenida por la bacteria reportera expresando MtbRNAP· σA , alcanzó ~10x la fluorescencia obtenida por la bacteria *E. coli* sin proteínas de *M. tuberculosis*; en cambio, la misma bacteria en presencia del plásmido reportero doble (conteniendo Lac-RFP y sinP3-GFP) produjo tan solo ~3.75x de fluorescencia GFP con respecto a la basal. Curiosamente, la fluorescencia obtenida por la expresión de tan solo Mtb σA , presumiblemente producto de la enzima quimérica EcoRNA Mtb σA , se mantuvo semejante, incluso con un leve aumento de ~4x a ~5x. Esto indicaría que la actividad de transcripción del

promotor Lac afecta reduciendo el reconocimiento del promotor sinP3 por la holoenzima MtbRNAP· σ A, mas no afecta mayormente dicho reconocimiento por parte de la holoenzima quimérica EcoRNA· σ A.

Hipótesis adicional

Recientemente se ha publicado las coordenadas 3D de la enzima MtbRNAP· σ A con ADN en la configuración RPo (Boyaci, Chen, Jansen, Darst, & Campbell, 2019). Sorprendentemente para nosotros, no se observa enrollamiento del ADN upstream del promotor en la superficie de la enzima. A pesar de que el dúplex utilizado para la toma de estos datos de CryoEM incluye desde la posición +30 hasta -60, los contactos ADN-proteína no alcanzan más allá de las posiciones +12 y -35.

Si efectivamente MtbRNAP· σ A no genera enrollamiento, y la holoenzima quimérica EcoRNAP· σ A presumiblemente sí, esto podría relacionarse a las diferentes sensibilidades que estas enzimas tendrían a la actividad de un promotor vecino. En *E. coli* se ha demostrado que la actividad de un promotor es influenciada por la transcripción a partir de un promotor vecino debido a una la influencia que el superenrollamiento ejerce sobre la iniciación (Yeung et al., 2017). Además de cambiar la curvatura del ADN y la energía necesaria para abrir la doble hebra (Aoyama & Takanami, 1988; Dorman & Dorman, 2016), el superenrollamiento ejercería influencia sobre la energía de enrollamiento en la superficie de la RNAP que, como hemos demostrado, es un factor mayoritario en la estabilización del complejo de iniciación.

Para continuar los estudios, incluyendo la relación entre superenrollamiento topológico y el enrollamiento en el RPo, así como para el ensayo de nuevos inhibidores utilizando nuestra bacteria reportera, requerimos obtener una transcripción de GFP realizada exclusivamente por la holoenzima MtbRNAP· σ A y eliminar la actividad de enzima quimérica. Para esto,

proponemos: reducir la disponibilidad de σA utilizando un promotor T7 mutado con 1/10 de actividad del natural; utilizar un promotor de *M. tuberculosis* con muy baja actividad para la expresión de GFP, de modo que esta sea altamente dependiente de la interacción de MtbRNAP con proteínas exclusivamente estimuladoras de esta enzima. Las proteínas CarD y RbpA son factores de transcripción propios del género *Mycobacterium* que se han visto no favorecen la transcripción por EcoRNAP ni por holoenzimas quiméricas EcoRNAP· σA (Bortoluzzi et al., 2013; Davis, Chen, Leon, Darst, & Campbell, 2015; Hu, Morichaud, Perumal, Roquet-Baneres, & Brodolin, 2014; Rammohan et al., 2016). Esperamos que la combinación de reducir la disponibilidad de σA , y reducir la actividad del promotor GFP hasta hacerla dependiente de la interacción con CarD y RbpA será suficiente para generar un sistema exclusivo de medición rápida de la actividad MtbRNAP· σA *in vivo*.

IV. Conclusiones

Los estudios biofísicos realizados en el Laboratorio de Moléculas Individuales han aportado conocimientos fundamentales en transcripción bacteriana, específicamente sobre: la estructura y paisaje energético del inicio de la transcripción, los efectos del ppGpp en la iniciación y la elongación, y la caracterización de la dinámica de MtbRNAP.

Es paradójico que el enrollamiento de secuencias upstream al promotor haya sido reconocido desde hace muchos años y persista relativamente poco estudiado. Probablemente esto se deba a que es experimentalmente difícil disociar la reacción de unión ADN-Proteína y la reacción del cambio configuracional del ADN que ocurre de manera concomitante. Esta dificultad fue superada en nuestro laboratorio mediante la manipulación directa del ADN involucrado, utilizando pinzas ópticas. Aunque nuestros primeros experimentos con esta estrategia fueron exitosos el año 2013, su grado de novedad y profundas implicancias han dificultado su publicación hasta esta fecha, 2019. Solo la combinación de experimentos, incluyendo el uso de pinzas ópticas, nucleótidos marcados, AFM, y fluorescencia, ha permitido la redacción de un ambicioso artículo sobre el rol del enrollamiento como determinante de la estabilidad del RPo, antagonista de la acción de ppGpp y catalizador de la apertura del ADN y del escape de promotor.

Por otro lado, aunque nuestra estrategia de expresión de MtbRNAP a partir de plásmidos (O. Herrera-Asmat et al., 2017), es semejante a otra reportada en fechas cercanas (Banerjee et al., 2014), nuestro aporte de utilizar codones optimizados y la claridad del protocolo publicado significó que investigadores de diversas localidades solicitaran nuestro sistema (incluyendo a Katsuhiko Murakami de la Pennsylvania State University, y a Peter Lewis de la University of Newcastle, Australia). Sin embargo, esta producción requiere mejoras. Hemos observado que el crecimiento de *E. coli* se reduce sustancialmente ante la inducción de la expresión de las

subunidades de MtbRNAP, y probablemente es por ello que encontramos una alta heterogeneidad entre un ejercicio y otro de expresión, ya que las bacterias se adaptan a reducir la expresión de los genes foráneos para sobrevivir. En este sentido, la bacteria con los genes de MtbRNAP integrados en el genoma puede ser una mejor alternativa, ya que no reduce su crecimiento y, usando el mismo gen reportero, llega a producir cerca de 10 veces más fluorescencia que la bacteria portadora de plásmidos.

Identificamos dos perspectivas inmediatas a desarrollar con los sistemas aquí expuestos. Estudiar la relación entre el superenrollamiento topológico del cromosoma o plásmido y el enrollamiento del RPo implica un nuevo e importante aspecto de la regulación de la expresión genética a partir de la estructura del cromosoma bacteriano. Por otro lado, el desarrollo de un sistema de transcripción de *M. tuberculosis* enteramente en *E. coli* puede acelerar significativamente los estudios de nuevos inhibidores, secuencias reguladoras, factores de transcripción y cómo ellos interactúan con esta importante diana molecular.

V. Referencias Bibliográficas

Tesis asesoradas:

1. Rodríguez, P. (2011). Probable rol del involucramiento del ADN alrededor de la ARN polimerasa en el complejo de iniciación de la transcripción (Licenciatura). *Universidad Peruana Cayetano Heredia*.
2. Bardales-Mendieta, J. (2012). Visualización con Microscopía de Fuerza Atómica de los efectos de la alarmona ppGpp en Complejos de Transcripción formados con el promotor λ PR (Licenciatura). *Universidad Peruana Cayetano Heredia*.
3. Tafur Petrozzi, L. (2014). Caracterización inicial de los complejos de iniciación en P1 y P2 del operón *rrnB* por medio de microscopía de fuerza atómica (Maestría en Bioquímica y Biología Molecular). *Universidad Peruana Cayetano Heredia*.
4. Robert Sosa. (2014). EFECTO DE TETRAFOSFATO DE GUANOSINA EN LOS COMPLEJOS DE ELONGACIÓN DE TRANSCRIPCIÓN BACTERIANA (Licenciatura). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
5. Sosa-Principe, R. P. (2017). Dinámica del complejo enrollado de la iniciación de la transcripción bacteriana (Maestría en Bioquímica y Biología Molecular). *Universidad Peruana Cayetano Heredia*.
6. Herrera-Asmat, O. (2012). Purificación de la ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* de alta pureza (Maestría en Bioquímica y Biología Molecular). *Universidad Peruana Cayetano Heredia*.
7. Herrera-Asmat, O. C. (2016). Ingeniería del complejo de elongación ternario de la ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Licenciatura). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
8. Espinoza-Huertas, K. A. (2018). Dinámica de la elongación de la transcripción de la ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* a nivel de moléculas individuales (Maestría en Bioquímica y Biología Molecular). *Universidad Peruana Cayetano Heredia*.

Artículos propios:

1. Doniselli, N., Rodríguez-Aliaga, P., Amidani, D., Bardales, J. A., Bustamante, C., **Guerra, D. G.**, & Rivetti, C. (2015). New insights into the regulatory mechanisms of ppGpp and DksA on Escherichia coli RNA polymerase-promoter complex. *Nucleic Acids Research*, 43(10), 5249–5262.
2. Herrera-Asmat, O., Lubkowska, L., Kashlev, M., Bustamante, C. J., **Guerra, D. G.**, & Kireeva, M. L. (2017). Production and characterization of a highly pure RNA polymerase holoenzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 134, 1–10.

3. Sosa-Principe, R. P., Florez-Ariza, A., Diaz-Celis, C., Onoa, B., Cassago, A., de Oliveira, P., **Guerra, D. G.**, Bustamante, C. J. (2019). Interactions of Upstream and Downstream Promoter Regions with RNA Polymerase are Energetically Coupled and a Target of Regulation in Transcription Initiation. (**Submitted**). <https://doi.org/10.1101/2020.05.13.070375>

Referencias en orden alfabético:

- Adelman, K., Porta, A. L., Santangelo, T. J., Lis, J. T., Roberts, J. W., & Wang, M. D. (2002). Single molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13538–13543. <https://doi.org/10.1073/pnas.212358999>
- Aoyama, T., & Takanami, M. (1988). Supercoiling response of E. coli promoters with different spacer lengths. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 949(3), 311–317. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0167-4781(88)90157-1)
- Banerjee, R., Rudra, P., Prajapati, R. K., Sengupta, S., & Mukhopadhyay, J. (2014). Optimization of recombinant Mycobacterium tuberculosis RNA polymerase expression and purification. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 94(4), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.008>
- Banerjee, R., Rudra, P., Saha, A., & Mukhopadhyay, J. (2015). Recombinant Reporter Assay Using Transcriptional Machinery of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 646–653. <https://doi.org/10.1128/JB.02445-14>
- Bardales-Mendieta, J. (2012). *Visualización con Microscopía de Fuerza Atómica de los efectos de la alarmona ppGpp en Complejos de Transcripción formados con el promotor λPR* (Licenciatura). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
- Bortoluzzi, A., Muskett, F. W., Waters, L. C., Addis, P. W., Rieck, B., Munder, T., ... O'Hare, H. M. (2013). Mycobacterium tuberculosis RNA polymerase-binding protein A (RbpA) and its interactions with sigma factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(20), 14438–14450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459883>
- Boyaci, H., Chen, J., Jansen, R., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2019). Structures of an RNA polymerase promoter melting intermediate elucidate DNA unwinding. *Nature*, 565(7739), 382–385. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0840-5>
- Bremer, H., & Dennis, P. P. (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In *1-55581-164-7. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (2nd ed., Vols. 1–2, p. 3000). Retrieved from http://93.174.95.29/_ads/4856197CDF36DD18E046780E08504183
- Chauhan, R., Ravi, J., Datta, P., Chen, T., Schnappinger, D., Bassler, K. E., ... Gennaro, M. L. (2016). Reconstruction and topological characterization of the sigma factor regulatory network of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11062>

- Choi, Y. J., Morel, L., François, T. L., Bourque, D., Bourget, L., Groleau, D., ... Míguez, C. B. (2010). Novel, Versatile, and Tightly Regulated Expression System for Escherichia coli Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5058–5066. <https://doi.org/10.1128/AEM.00413-10>
- Coulombe, B., & Burton, Z. F. (1999). DNA bending and wrapping around RNA polymerase: A “revolutionary” model describing transcriptional mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(2), 457–478.
- Dangkulwanich, M., Ishibashi, T., Liu, S., Kireeva, M. L., Lubkowska, L., Kashlev, M., & Bustamante, C. J. (2013). Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism. *ELife*, 2, e00971. <https://doi.org/10.7554/eLife.00971>
- Davenport, R. J., Wuite, G. J., Landick, R., & Bustamante, C. (2000). Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by E. coli RNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5462), 2497–2500. <https://doi.org/10.1126/science.287.5462.2497>
- Davis, E., Chen, J., Leon, K., Darst, S. A., & Campbell, E. A. (2015). Mycobacterial RNA polymerase forms unstable open promoter complexes that are stabilized by CarD. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 433–445. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1231>
- Doniselli, N., Rodriguez-Aliaga, P., Amidani, D., Bardales, J. A., Bustamante, C., Guerra, D. G., & Rivetti, C. (2015). New insights into the regulatory mechanisms of ppGpp and DksA on Escherichia coli RNA polymerase-promoter complex. *Nucleic Acids Research*, 43(10), 5249–5262. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv391>
- Dorman, C. J., & Dorman, M. J. (2016). DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophysical Reviews*, 8(Suppl 1), 89–100. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0238-2>
- Espinoza-Huertas, K. A. (2018). Dinámica de la elongación de la transcripción de la ARN polimerasa de Mycobacterium tuberculosis a nivel de moléculas individuales. *Universidad Peruana Cayetano Heredia*. Retrieved from <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/3604>
- Florez-Ariza, A. (2018). *Structural analysis of DNA wrapping in bacterial transcription initiation complex by transmission electron microscopy and single particle analysis* (Master of Science). University of Sao Paulo, Sao Carlos.
- Hawley, D. K., & McClure, W. R. (1980). In vitro comparison of initiation properties of bacteriophage lambda wild-type PR and x3 mutant promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6381–6385.
- Henderson, K. L., Felth, L. C., Molzahn, C. M., Shkel, I., Wang, S., Chhabra, M., ... Record, M. T. (2017). Mechanism of transcription initiation and promoter escape by E. coli RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(15), E3032–E3040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618675114>
- Herrera-Asmat, O. (2012). *Purificación de la ARN polimerasa de Mycobacterium tuberculosis de alta pureza*. (Maestría en Bioquímica y Biología Molecular). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Herrera-Asmat, O. C. (2016). Ingeniería del complejo de elongación ternario de la ARN polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis*. *Repositorio de Tesis - UNMSM*. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6244>

Herrera-Asmat, O., Lubkowska, L., Kashlev, M., Bustamante, C. J., Guerra, D. G., & Kireeva, M. L. (2017). Production and characterization of a highly pure RNA polymerase holoenzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, *134*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.03.013>

Hu, Y., Morichaud, Z., Perumal, A. S., Roquet-Baneres, F., & Brodolin, K. (2014). *Mycobacterium* RbpA cooperates with the stress-response σ B subunit of RNA polymerase in promoter DNA unwinding. *Nucleic Acids Research*, *42*(16), 10399–10408. <https://doi.org/10.1093/nar/gku742>

Kapanidis, A. N., Margeat, E., Ho, S. O., Kortkhonjia, E., Weiss, S., & Ebright, R. H. (2006). INITIAL TRANSCRIPTION BY RNA POLYMERASE PROCEEDS THROUGH A DNA-SCRUNCHING MECHANISM. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5802), 1144–1147. <https://doi.org/10.1126/science.1131399>

Keseler, I. M., Bonavides-Martínez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R. P., Johnson, D. A., ... Karp, P. D. (2009). EcoCyc: A comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Research*, *37*(Database issue), D464–470. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn751>

Kontur, W. S., Capp, M. W., Gries, T. J., Saecker, R. M., & Record, M. T. (2010). Probing DNA Binding, DNA Opening and Assembly of a Downstream Clamp/Jaw in *E. coli* RNA Polymerase – λ PR Promoter Complexes Using Salt and the Physiological Anion Glutamate. *Biochemistry*, *49*(20), 4361–4373. <https://doi.org/10.1021/bi100092a>

Kontur, W. S., Saecker, R. M., Capp, M. W., & Record, M. T. (2008). Late Steps in the Formation of *E. coli* RNA Polymerase- λ PR Promoter Open Complexes: Characterization of Conformational Changes by Rapid [Perturbant] Upshift Experiments. *Journal of Molecular Biology*, *376*(4), 1034–1047. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.064>

Łyzen, R., Kochanowska, M., Wegrzyn, G., & Szalewska-Palasz, A. (2009). Transcription from bacteriophage lambda pR promoter is regulated independently and antagonistically by DksA and ppGpp. *Nucleic Acids Research*, *37*(20), 6655–6664. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp676>

Marchetti, M., Malinowska, A., Heller, I., & Wuite, G. J. L. (2017). How to switch the motor on: RNA polymerase initiation steps at the single-molecule level. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *26*(7), 1303–1313. <https://doi.org/10.1002/pro.3183>

Mejia, Y. X., Mao, H., Forde, N. R., & Bustamante, C. (2008). Thermal probing of *E. coli* RNA polymerase off-pathway mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, *382*(3), 628–637. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.079>

Neuman, K. C., Abbondanzieri, E. A., Landick, R., Gelles, J., & Block, S. M. (2003). Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell*, *115*(4), 437–447.

- Rammohan, J., Ruiz Manzano, A., Garner, A. L., Prusa, J., Stallings, C. L., & Galburt, E. A. (2016). Cooperative stabilization of Mycobacterium tuberculosis rrnAP3 promoter open complexes by RbpA and CarD. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw577>
- Rivetti, C., Guthold, M., & Bustamante, C. (1999). Wrapping of DNA around the E.coli RNA polymerase open promoter complex. *The EMBO Journal*, 18(16), 4464–4475. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.16.4464>
- Robert Sosa. (2014). *EFEECTO DE TETRAFOSFATO DE GUANOSINA EN LOS COMPLEJOS DE ELONGACIÓN DE TRANSCRIPCIÓN BACTERIANA* (Tesis para optar el Título de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/3662>
- Rodríguez, P. (2011). *Probable rol del envolvimiento del ADN alrededor de la ARN polimerasa en el complejo de iniciación de la transcripción* (Licenciatura, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/275895276_Probable_role_of_DNA_wrapping_around_bacterial_RNA_polymerase_in_the_Transcription_Initiation_Complex
- Ruff, E. F., Record, M. T., & Artsimovitch, I. (2015). Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*, 5(2), 1035–1062. <https://doi.org/10.3390/biom5021035>
- Saecker, R. M., Record, M. T., & Dehaseth, P. L. (2011). Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase - promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), 754–771. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.018>
- Shaewitz, J. W., Abbondanzieri, E. A., Landick, R., & Block, S. M. (2003). Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*, 426(6967), 684–687. <https://doi.org/10.1038/nature02191>
- Sosa-Principe, R. P. (2014). Efecto de tetrafosfato de guanosina en los complejos de elongación de transcripción bacteriana. *Repositorio de Tesis - UNMSM*. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3662>
- Sosa-Principe, R. P. (2017). Dinámica del complejo enrollado de la iniciación de la transcripción bacteriana. *Universidad Peruana Cayetano Heredia*. Retrieved from <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/549>
- Tafur Petrozzi, L. (2014). Caracterización inicial de los complejos de iniciación en P1 y P2 del operón rrnB por medio de microscopía de fuerza atómica. *Universidad Peruana Cayetano Heredia*. Retrieved from <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/1060>
- Volkmer, B., & Heinemann, M. (2011). Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of Escherichia coli to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023126>
- Yeung, E., Dy, A. J., Martin, K. B., Ng, A. H., Vecchio, D. D., Beck, J. L., ... Murray, R. M. (2017). Biophysical Constraints Arising from Compositional Context in Synthetic Gene Networks. *Cell Systems*, 5(1), 11-24.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.06.001>

Capítulo 1

Yin, H., Wang, M. D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S. M., & Gelles, J. (1995). Transcription against an applied force. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5242), 1653–1657. <https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1653>

Zuo, Y., Wang, Y., & Steitz, T. A. (2013). The Mechanism of *E. coli* RNA Polymerase Regulation by ppGpp Is Suggested by the Structure of Their Complex. *Molecular Cell*, 50(3), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.020>

Capítulo 2

Artículo publicado en Acta Herediana promoviendo la formación de una unidad de biología estructural.

«Crío-microscopía electrónica. Resolviendo la estructura molecular de la vida al detalle atómico». Acta Herediana, Vol. 61 (2018): Octubre 2017 - Marzo 2018. DOI: 10.20453/ah.v61i0.3300. Disponible en: <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/AH/article/view/3300>.

PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2017: CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, RESOLVIENDO CON DETALLE ATÓMICO LA ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DE LA VIDA

ALFREDO FLOREZ ARIZA, LNNano, CNPEM, Instituto de Física de São Carlos de La Universidad de São Paulo.

DANIEL GUERRA GIRALDEZ, Laboratorio de Moléculas Individuales, Facultad de Ciencias y Filosofía ACT, UPCH.

Richard Henderson, Jacques Dubochet y Joachim Frank fueron laureados con el Premio Nobel en química 2017 por el desarrollo de un método efectivo de generar imágenes tridimensionales de biomoléculas.

ABSTRACT

Recently, the Cryo-Electron Microscopy technology (CryoEM) has reached atomic resolution for molecular complexes of proteins in aqueous solution. Three key contributions in this development are: setting conditions of minimal energy not to destroy the biomolecules; the vitrification of samples at ultra-low temperatures so that the biomolecules are protected from evaporation; the development of algorithms to build three-dimensional models from CryoEM images. We propose the creation in the UPCH of the first structural biology center in Peru, thanks to the collaborations already established with two world reference centers of CryoEM expertise.

RESUMEN

Recientemente, la Crío-Microscopía Electrónica (CryoEM) ha alcanzado la resolución atómica para complejos moleculares de proteínas en solución acuosa. Tres contribuciones clave en este desarrollo son: establecer condiciones de energía mínima para no destruir las biomoléculas; la vitrificación de muestras a temperaturas ultrabajas para que las biomoléculas estén protegidas de la evaporación; el desarrollo de algoritmos para construir modelos tridimensionales a partir de imágenes CryoEM. Proponemos la creación en la UPCH del primer centro de biología estructural en Perú, gracias a las colaboraciones ya establecidas con dos centros mundiales de referencia en CryoEM.

La relación entre la estructura y la función es necesaria y evidente en todos los niveles de las ciencias de la vida. Así como la evolución ha engendrado aletas, patas, alas y manos como variaciones divergentes de un mismo patrón, las bio-máquinas que hacen funcionar a la célula están constituidas cada una por moléculas con la estructura adecuada para su propósito. Las enzimas presentan la forma que recibe al sustrato y lo acomoda orientado a grupos electropositivos y electronegativos que aseguran que se lleve a cabo una reacción química. Las proteínas del citoesqueleto se forman como grandes vigas que pueden ensamblar redes con la rigidez o flexibilidad necesarias para soportar la estructura y movimiento de la célula. Los motores moleculares acoplan reacciones químicas y el uso de energía térmica para trasladarse en una dirección específica para, por ejemplo, transportar vesículas de material entre organelos. La biología estructural plantea elucidar estos y muchos otros procesos observando la posición de cada átomo que forma la estructura funcional de estas macromoléculas de la vida. Este es el nivel en el que actúa la selección natural, al definirse si tras una mutación puntual una enzima conserva su actividad, es modificada, o si cambia la afinidad entre un ligando y un receptor. También a este nivel actúan todas las drogas y moléculas reguladoras, estableciendo uniones según la estructura dada por los átomos de la superficie de un receptor o blanco terapéutico en general. Por lo tanto, puede decirse que la biología estructural es un nivel de comprensión fundamental de la vida y resulta esencial para el desarrollo de tecnologías, como por ejemplo la farmacéutica y la ingeniería de proteínas.

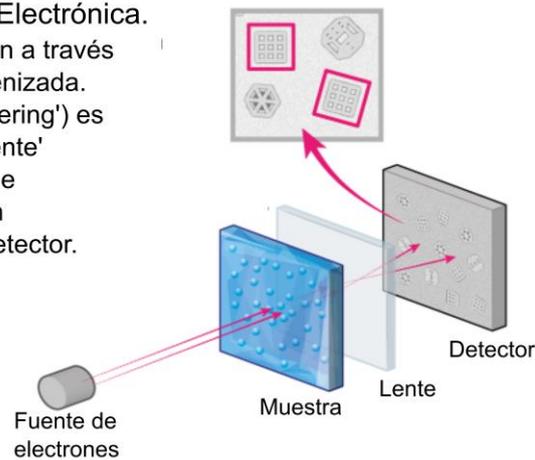
Desde la década de 1950, la difracción de rayos X ha sido la técnica predominante para llevar a cabo esta tarea, pues proveyendo un cristal formado por repeticiones periódicas y bien organizadas de la molécula en estudio, es posible elucidar su estructura 3D con resolución atómica. Sin embargo, para muchas de estas moléculas existe una gran dificultad de formar cristales, aun utilizando muestras altamente concentradas (20 mg/mL). Por otro lado, la resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), se basa en la detección de los átomos individuales de la molécula mediante la excitación de sus núcleos por un fuerte campo magnético con el que interactúan según su desplazamiento químico; sin embargo, cuando las moléculas (por ejemplo, proteínas) son más grandes que 35-50 kDa, las señales de desplazamiento químico de los núcleos se superponen entre sí, tornando imposible el problema de diferenciarlos.

Estas limitaciones motivaron la búsqueda de técnicas alternativas para esclarecer la estructura de las macromoléculas biológicas. El premio Nobel 2017 de Química fue otorgado a Richard Herenson, Jacques Dubochet y Joachim Frank por haber logrado aportes definitivos en el uso de la microscopía electrónica en biología estructural. En una historia llena de ingenio y visionario espíritu científico se fueron superando barreras conceptuales y técnicas hasta llegar hoy día a ofrecer la misma calidad que la cristalografía de rayos X, con la ventaja de no requerir la cristalización de la muestra y con la capacidad, en algunos casos, de dar información directa sobre diferentes estados conformacionales asociados a la función biológica de un complejo molecular.

FIGURA 1

Crío-Microscopía Electrónica.

Los electrones pasan a través de la muestra criogenizada. La dispersión ('scattering') es redirigida por una 'lente' electromagnética que produce una imagen magnificada en el detector.



¿Qué es la crío-microscopía de transmisión electrónica?

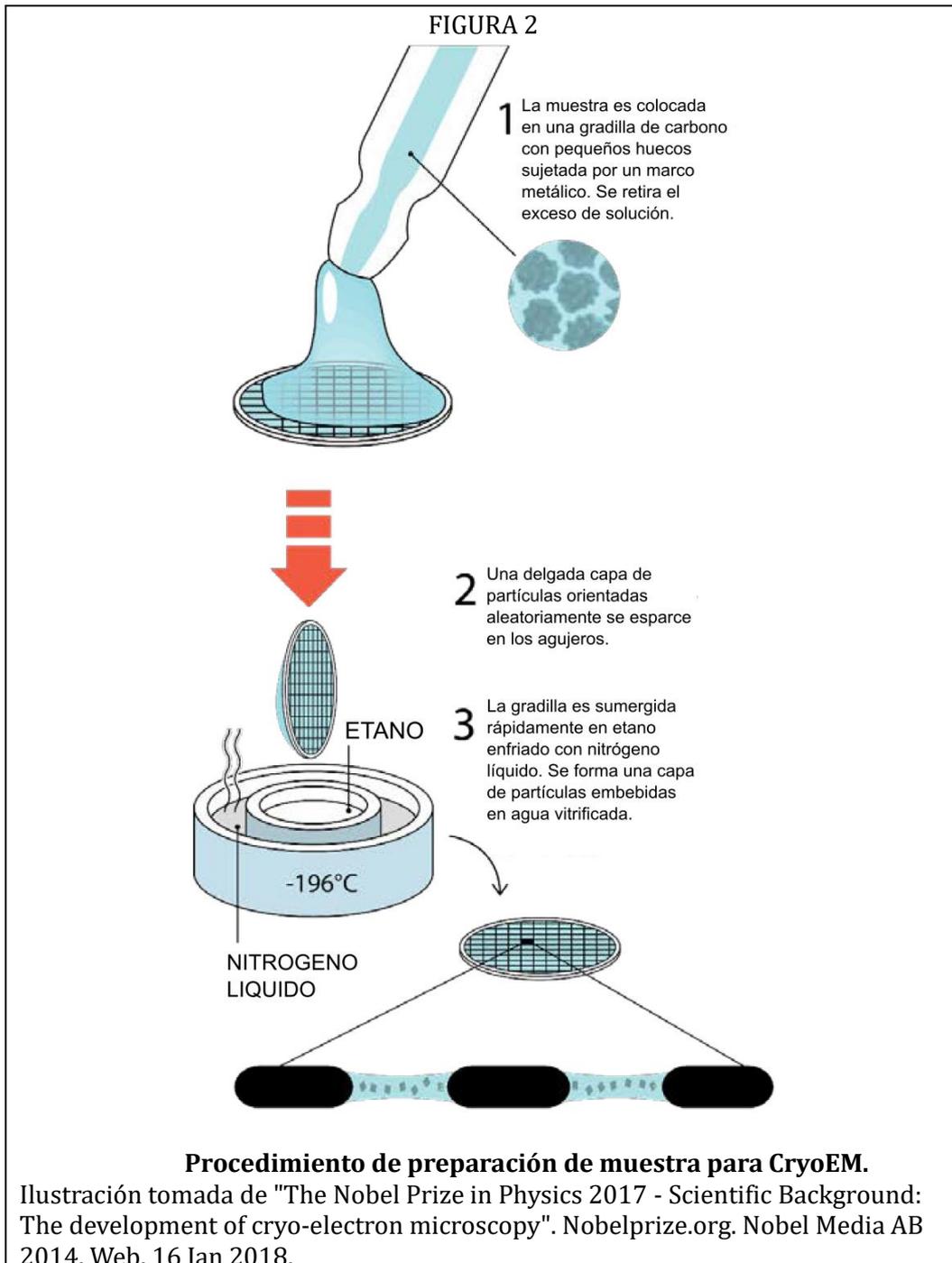
El microscopio de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) produce una señal a partir de un haz de electrones que es dispersado por su interacción con la muestra en estudio y recogido por un detector que produce imágenes bidimensionales. El voltaje de aceleración típico (100 – 300 kV[1]) confiere a los electrones una velocidad relativística (i.e. significativamente cercana a la velocidad de la luz) para la que se calcula una longitud de onda de 3 pm ($1 \text{ pm} = 10^{-12} \text{ m}$). Esta pequeñísima longitud de onda permite un límite teórico de resolución diminuto, mucho más allá de los 200 nm de la microscopía de luz visible, o de los 20 nm alcanzados con las últimas técnicas de localización por fluorescencia[2]. Dado que los átomos tienen tamaños varias veces más grandes que este límite (el átomo de hidrógeno mide aproximadamente 10^{-10} m), ya por principio TEM debería resultar una técnica óptima para observar estructuras moleculares con resolución atómica. Imagen tomada de[3]

Richard Henderson fue pionero en buscar la aplicabilidad de TEM para elucidar la estructura de moléculas biológicas. Determinó que uno de los problemas principales que debían superarse era la cantidad de energía transmitida por el haz de electrones, que es tan alta que puede destruir la muestra en estudio. Utilizando pulsos de baja energía, sus exploraciones rindieron fruto en 1975 con su trabajo sobre la bacteriorodopsina. Esta proteína está naturalmente embebida en la membrana celular de halobacterias, en donde genera energía a partir de la captación de luz. Resultaba imposible conservar bacteriorodopsina en estado nativo, pura y concentrada para su cristalización y análisis por difracción de rayos X. Por esto, utilizaron un cristal bidimensional, que contenía a la proteína en su estado nativo, y lo colocaron en el microscopio electrónico de transmisión. La información generada por el patrón de difracción del haz de electrones, luego de posicionar el cristal en diferentes orientaciones angulares, permitió obtener un modelo 3D de la bacteriorodopsina. La resolución alcanzada fue de 7 \AA , suficiente para mostrar cómo las siete hélices que conforman la proteína se extienden de manera perpendicular al plano de la membrana en la que está inmersa[4].

Este temprano antecedente, aunque alentador, no resolvía la situación para la mayoría de moléculas biológicas. Dado que el haz de electrones es sumamente sensible, todo el proceso de microscopía de transmisión debe llevarse a cabo en alto vacío. Como el agua se evapora en estas condiciones y la estructura nativa de las biomoléculas depende justamente de interacciones con el solvente acuoso, el valor informativo de la muestra se perdería totalmente en una típica toma de imágenes por TEM.

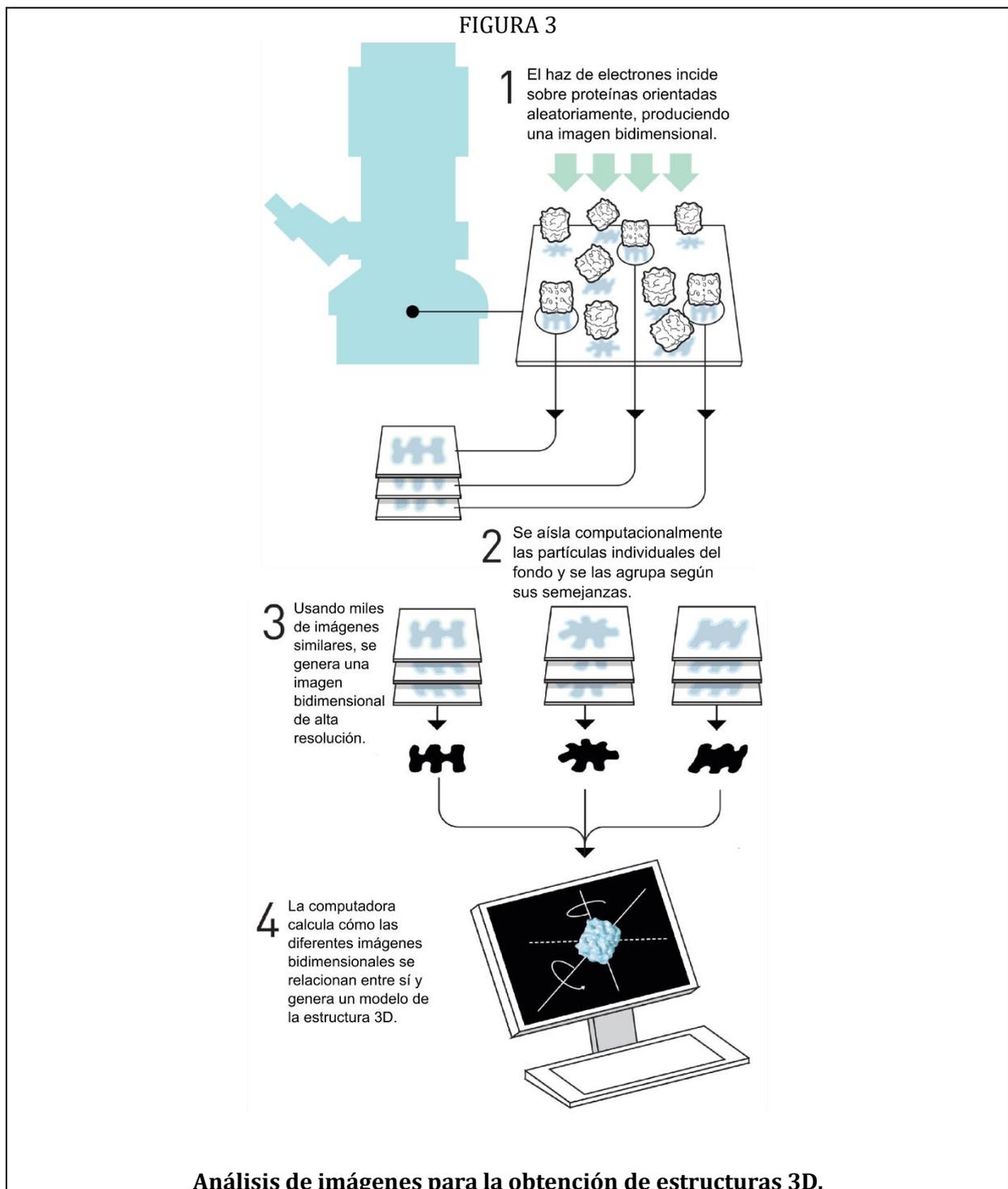
Se propuso entonces que a temperaturas muy bajas se podría proteger la estructura nativa, que quedaría atrapada en agua vitrificada. Ante un congelamiento muy rápido, las moléculas de agua

de la solución en la que se encuentra la macromolécula en estudio no tienen el tiempo suficiente para reorganizarse y formar estructuras cristalinas regulares -hielo hexagonal o cúbico-, y por el contrario, pasan a formar un estado de agua vítrica o hielo amorfo^{2,3}. Este estado sólido-amorfo del agua, semejante al que presenta en estado líquido, impediría la rápida evaporación, conservando a la biomolécula en su estado nativo y a la vez proporciona una parcial protección frente a la radiación electrónica. Ya en 1960, el científico venezolano Fernandez-Morán había demostrado la aplicación del helio líquido en la preparación de muestras biológicas para la microscopía electrónica[5]. Años más tarde, Jacques Dubochet y su equipo logró conservar virus mediante la inmersión en etano líquido a -196°C , y fue posible visualizar por primera vez cómo las partículas individuales quedaban capturadas en su estado nativo dentro de agua vitrificada, en múltiples y diferentes orientaciones espaciales[6].



http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/advanced.html

Las imágenes bidimensionales así obtenidas de una biopartícula en múltiples orientaciones ya contenían en conjunto toda la información necesaria para construir un detallado modelo de la estructura 3D. Sin embargo, este complejo proceso matemático necesitaba aun del aumento de la capacidad de cómputo y el desarrollo de ingeniosos algoritmos en los que la contribución de Joachim Frank ha sido destacada.



Análisis de imágenes para la obtención de estructuras 3D.

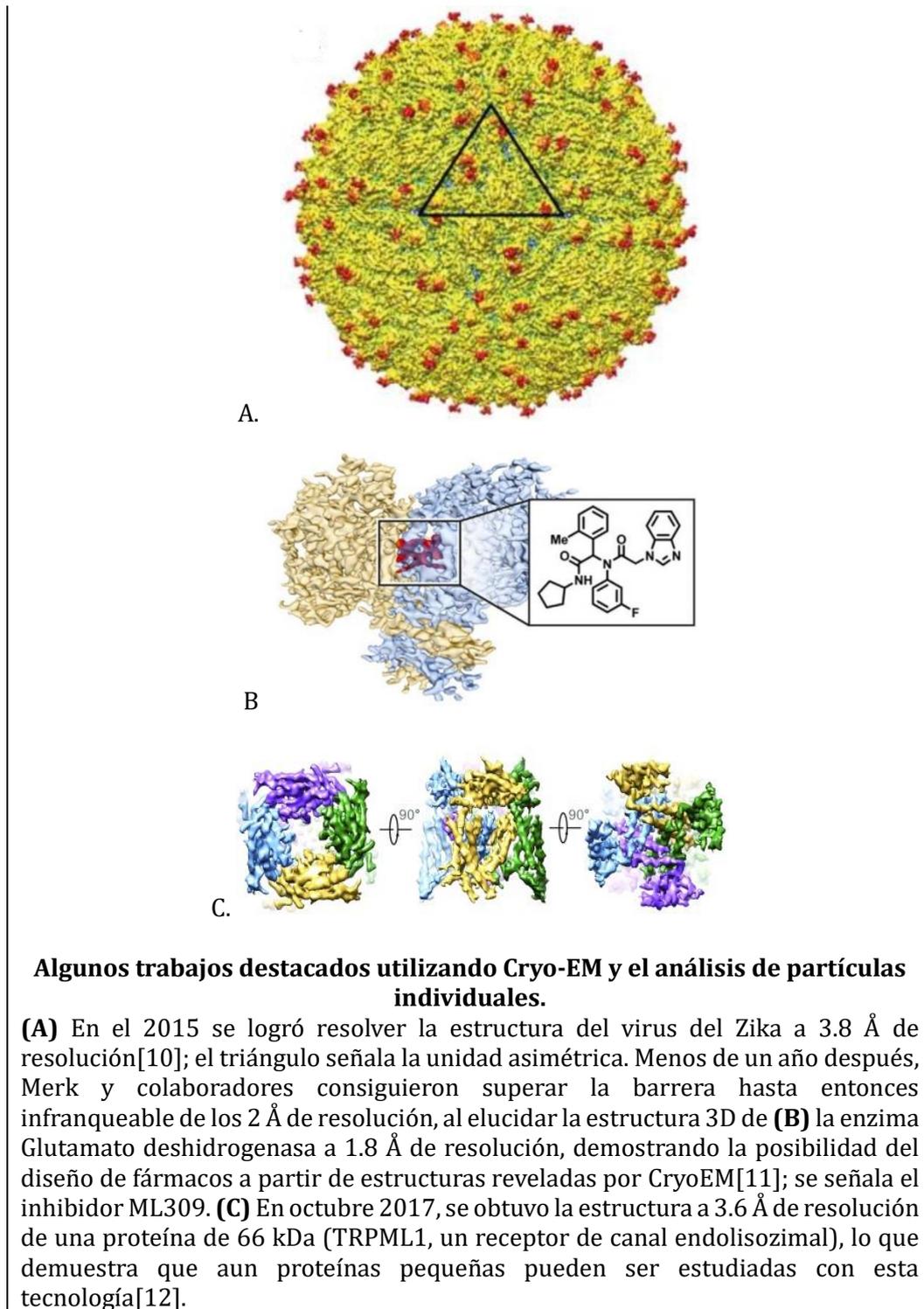
Ilustración tomada de "The Nobel Prize in Physics 2017 - Popular Information: They captured life in atomic detail". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 16 Jan 2018.
<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/popular.html>

Actualmente, este proceso se inicia con la identificación de las biopartículas como imágenes individuales de la proteína o complejo molecular que será analizado a partir de la imagen de todo el campo de visión del microscopio. Estas partículas, en un número típico de decenas o cientos de miles, son extraídas y clasificadas según las similitudes que muestran entre sí. Mediante algoritmos de correlación, se agrupa las imágenes en un grupo de clases (algunos miles), cada una conformada por numerosas partículas individuales. La información de las imágenes individuales es sumada dentro de su clase, para finalmente dar lugar a lo que se conoce como "clase promedio" o "classum". Un *classum* es la imagen bidimensional que muestra una orientación espacial específica de la partícula en estudio, y que, debido a que está generada por la suma de información de varias partículas, tiene una mayor relación señal/ruido que sus componentes individuales. Asumiendo que cada *classum* representa una proyección de la partícula tridimensional, se emplean diversos algoritmos para calcular las orientaciones angulares o "ángulos de Euler" que estas proyecciones tendrían en el espacio, y así construir un modelo 3D del objeto completo. A partir de este punto se inician iteraciones de refinamiento, en las que el primer modelo 3D se usa para generar computacionalmente nuevas proyecciones bidimensionales, las cuales son útiles para volver a analizar las micrografías originales, lo que permite obtener nuevos y mejores *classum*. Con varios ciclos de análisis se mejora progresivamente el modelo 3D[7]. En ocasiones, el proceso permite identificar diferentes estados conformacionales y elucidar así la dinámica de acción de un complejo molecular, incluso a partir de un solo set de micrografías[8].

Desde su origen hasta la actualidad: El enorme potencial de la Crío-Microscopía Electrónica

Los primeros logros en CryoEM recibieron el apodo de ciencia de "blobology", por producir imágenes de baja resolución (15-20 Å) con la forma de globos con protuberancias suaves, a diferencia de la alta resolución conseguida por cristalografía de rayos X (1.7-3.1 Å) que permite identificar átomos individuales. Sin embargo, las continuas mejoras instrumentales e informáticas condujeron a una situación clave el año 2013. Es entonces que se inicia la llamada "revolución de la resolución", impulsada por a la nueva generación de detectores directos de electrones que presentan una velocidad y sensibilidad muy superior a los dispositivos CCD utilizados anteriormente que requerían convertir previamente los electrones en fotones. Con una mejor relación señal/ruido y la capacidad de producir películas en lugar de tomas aisladas, en los últimos años la tecnología CryoEM ha alcanzado la resolución de la tradicional cristalografía de rayos X^{1.6} y ha superado su eficiencia, ya que no requiere cristalizar las muestras[9].

FIGURA 4

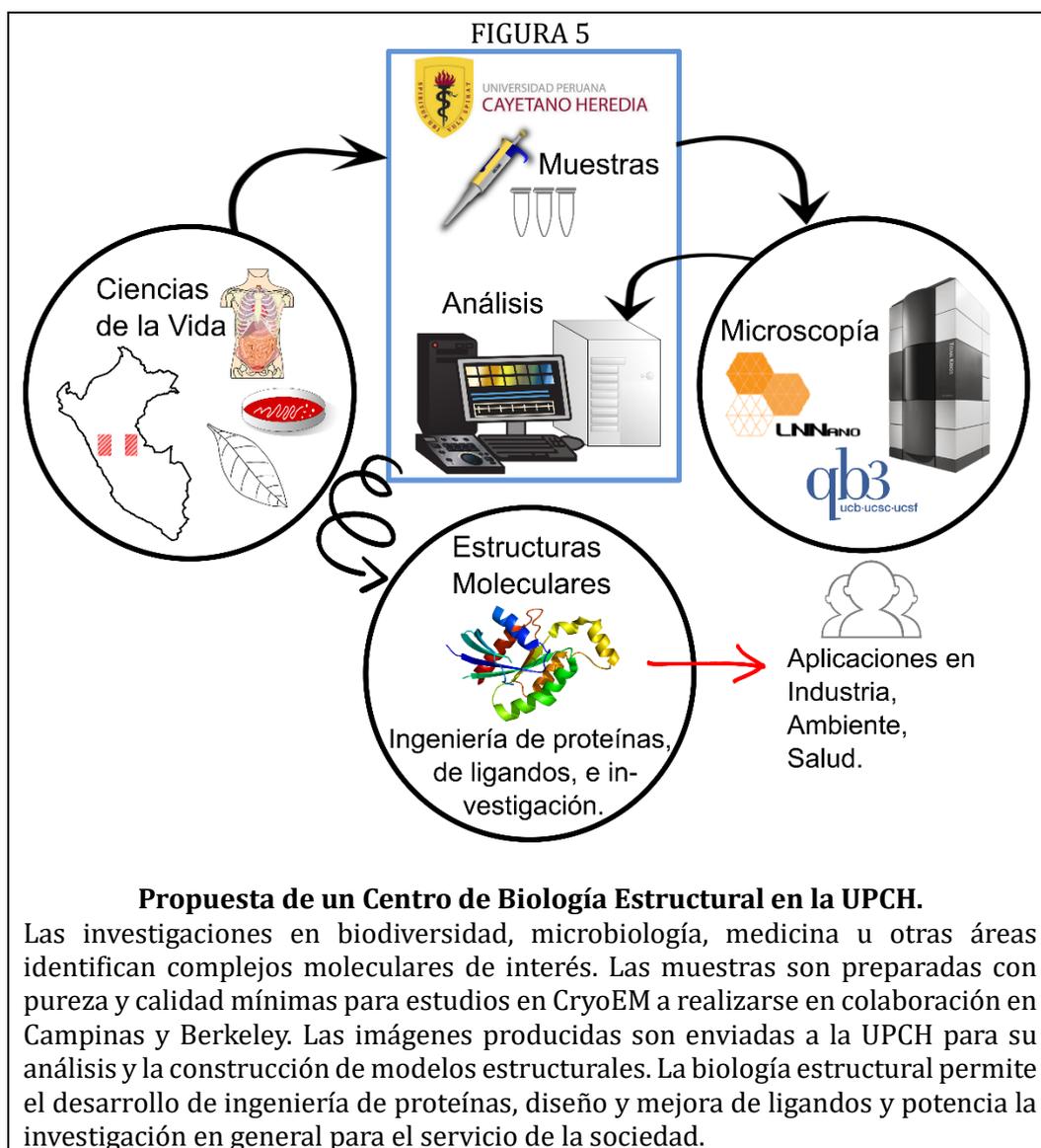


CryoEM en la UPCH: Propuesta del primer 'hub' de Biología Estructural en el Perú

Los costos de equipamiento, operación y mantenimiento necesarios para el uso de CryoEM son muy altos, de manera que solo una institución que coopera con muchos usuarios es capaz de aprovechar la inversión mediante una plataforma de uso común para diversas líneas de investigación. Esta es la estrategia del Laboratorio Nacional de Nanotecnología, LNNano, del Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materials de Brasil, que ha formado un equipo de alto nivel bajo la dirección de Rodrigo Portugal y la asesoría de Marin van Heel, quien ha recibido los premios Ernst Ruska 1985 y Wiley 2017 por sus contribuciones determinantes en la algoritmia de análisis[13]. El laboratorio de Moléculas Individuales de la Facultad de Ciencias de la UPCH

coopera cercanamente con LNNano para la caracterización del complejo de transcripción de la bacteria *Escherichia coli* y su mecanismo de regulación en situaciones de estrés relacionadas a la virulencia y resistencia al ataque inmune y antibiótico. De la misma manera, nuestro equipo investiga la dinámica de transcripción de *Mycobacterium tuberculosis* y su interacción con nuevos antibióticos mientras realizamos los estudios estructurales mediante CryoEM en colaboración con Carlos Bustamante y Eva Nogales de la Universidad de California en Berkeley. Estas investigaciones no solo están realizando avances importantes en su campo, sino que además prometen abrir el puente para el desarrollo de la biología estructural en el Perú mediante la inversión inteligente en cooperación.

Cualquier investigación bioquímica que conduzca al aislamiento de complejos moleculares puros, podría producir muestras en condiciones adecuadas para la toma de imágenes por TEM en pocos días. Pasada esta etapa, que puede implicar un viaje muy breve de pocos días, o el simple envío de muestras estabilizadas en gradillas de carbono, un equipo de investigadores peruanos podría superar el siguiente paso limitante: el análisis de imágenes. Un clúster de computadoras relativamente modesto, con una capacidad de almacenamiento de datos mediana, involucra una inversión del orden de 10 – 20 mil USD (en lugar de los varios millones de costo del equipo TEM adecuado) y podría suplir a diversos investigadores del país, creando una dinámica de alto rendimiento al servicio de la ciencia peruana.



Además de considerar su importancia científica, debemos reconocer que en el Perú los esfuerzos en biotecnología se encuentran severamente limitados por la incapacidad de realizar la caracterización estructural de complejos moleculares de interés. Actualmente, las ciencias genómicas han potenciado el hallazgo de nuevas moléculas de importancia industrial, ambiental y biomédica, sin embargo, tras su descubrimiento es necesario pasar por etapas de caracterización bioquímica y estructural que puedan conducir a su aplicabilidad. La ingeniería de proteínas y el diseño racional de ligandos o drogas son disciplinas que se basan en la biología estructural para desarrollar productos patentables de alto impacto y valor. Gracias a las colaboraciones establecidas en los últimos años, se nos presenta hoy la oportunidad de protagonizar el nacimiento de la biología estructural en el Perú. El tiempo apremia.

Referencias bibliográficas

- [1] R. F. Egerton, «Choice of operating voltage for a transmission electron microscope», *Ultramicroscopy*, vol. 145, pp. 85-93, oct. 2014.
- [2] D. G. Guerra, «Premio Nobel en Química 2014: Superando el límite infranqueable de la microscopía a la nanoscopía», *Acta Hered.*, vol. 55, n.º 0, p. 72, sep. 2015.
- [3] D. Cressey y E. Callaway, «Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel», *Nat. News*, vol. 550, n.º 7675, p. 167, oct. 2017.
- [4] R. Henderson y P. N. T. Unwin, «Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy», *Nature*, vol. 257, n.º 5521, p. 28, sep. 1975.
- [5] H. Fernandez-Moran, «Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 85, pp. 689-713, abr. 1960.
- [6] J. Dubochet, M. Adrian, J. Lepault, y A. W. McDowell, «Emerging techniques: Cryo-electron microscopy of vitrified biological specimens», *Trends Biochem. Sci.*, vol. 10, n.º 4, pp. 143-146, abr. 1985.
- [7] M. V. Heel, *Image formation and image analysis in electron microscopy*. 19??
- [8] S.-H. Roh *et al.*, «Subunit conformational variation within individual GroEL oligomers resolved by Cryo-EM», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, n.º 31, pp. 8259-8264, ago. 2017.
- [9] M. van Heel y M. Schatz, «Reassessing the Resolutions Resolutions», *bioRxiv*, p. 224402, nov. 2017.
- [10] D. Sirohi *et al.*, «The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus», *Science*, vol. 352, n.º 6284, pp. 467-470, abr. 2016.
- [11] A. Merk *et al.*, «Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery», *Cell*, vol. 165, n.º 7, pp. 1698-1707, jun. 2016.
- [12] S. Zhang, N. Li, W. Zeng, N. Gao, y M. Yang, «Cryo-EM structures of the mammalian endo-lysosomal TRPML1 channel elucidate the combined regulation mechanism», *Protein Cell*, vol. 8, n.º 11, pp. 834-847, nov. 2017.
- [13] «The 16th Annual Wiley Prize in Biomedical Sciences Awarded for Pioneering Developments in Electron Microscopy | Wiley News Room – Press Releases, News, Events & Media». [En línea].

Capítulo 2

Disponible en: <http://newsroom.wiley.com/press-release/all-corporate-news/16th-annual-wiley-prize-biomedical-sciences-awarded-pioneering-deve>. [Accedido: 16-ene-2018].

ANEXO 1

- La Sociedad Peruana de Bioquímica y Biología Molecular es reconocida como cuerpo adherente de la IUBMB.

<https://iubmb.org/adhering-bodies-and-associate-adhering-bodies/>

PERU:

Peruvian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SPBBM)

Dr. Pohl Luis Milon, SPBBM President, Lab. Applied Biophysics and Biochemistry, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Alameda San Marcos C2, Chorrillos, 15067, Lima, Peru
Phone: +51 1 313 3333 (2762)
e-mail: pmilon@upc.pe

Dr. Daniel Guerra Giraldez, SPBBM Secretary, Laboratorio de Biofísica de Moléculas Individuales, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, LID-CyT #008, Lima, Peru
Phone: +51 1 3190000-233217
e-mail: daniel.guerra@upch.pe

- Noticia local sobre la fundación de la SPBBM

<http://larepublica.pe/sociedad/1152163-crean-la-primera-sociedad-peruana-de-bioquimica-y-biologia-molecular-en-el-peru>

La República

POLÍTICA ECONOMÍA SOCIEDAD MUNDO DEPORTES ESPECTÁCULOS TENDENCIAS ED. IM

Ancash Amazonas Arequipa Cajamarca Cusco La Libertad Lambayeque Moquegua Pi

SOCIEDAD CIENCIA

Crean la primera Sociedad Peruana de Bioquímica y Biología Molecular en el Perú

Universidades: Católica, Agraria, San Marcos y Cayetano Heredia unieron esfuerzos para constituir este grupo destinado a científicos e investigadores nacionales. Eligen presidente a Daniel Guerra.

30 Nov 2017 | 18:53 h

Daniel Guerra, Biofísico de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Redacción:

Redacción LR Para crear espacios de participación y crecimiento destinados a científicos e investigadores nacionales, representantes de las universidades Mayor de San Marcos, Agraria, Católica del Perú y Cayetano Heredia fundaron la Sociedad Peruana de Bioquímica y Biología Molecular.

ANEXO 2

- Participación como accesitario en el comité de ética del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.



Daniel Guerra Giraldez <daniel.guerra@upch.pe>

Solicitud de Currículo Vitae firmado

3 mensajes

17 de octubre de 2016, 11:15
 RAQUEL RUTH HUAMANI AYALA <rhuamani@insnsb.gob.pe>
 Para: Antonio Carrasco Yalan <antonio1carrasco@hotmail.com>, Augusto Chafloque Cervantes <serctec@terra.com.pe>, Carla Colona Guadalupe <ccolona@pucp.edu.pe>, Daniel Guerra Giraldez <daniel.guerra@upch.pe>, Elias Meliton Arce Rodríguez <emarce2009@gmail.com>, Elizabeth Maquillon Acevedo <lissy.maquillon@gmail.com>, Enrique Haro Haro <deharo@speedy.com.pe>, Fredy Canchihuaman <fcanchihuaman@ins.gob.pe>, Isabel Neira Canales <psicologaisabelneira@gmail.com>, José Javier Tantaleán Da Fieno <tantaleanjose@hotmail.com>, Marisa Novoa <marisanovoaalvarado@gmail.com>, RENEE GLORIA HERRERA TAQUIA <rherrera@insnsb.gob.pe>, Roberto Rivero Quiroz <rriveroq@hotmail.com>, Roxana Lescano Guevara <roxana.lescano@med.navy.mil>, Sonia Escobar Mere <soniaescobarmere@gmail.com>, Teresa Ochoa <theresa.ochoa@upch.pe>

Estimados Srs. Del Comité de Ética del INSN-SB

La presente es para reiterarles la solicitud de la remisión de su currículum vitae no documentado, con la finalidad de cumplir con los requisitos estipulados por el Instituto Nacional de Salud para el registro del Comité que ustedes integran.

Cabe precisar que el CV debe ser firmado en **cada una de sus hojas**, en todo caso nos remiten y en la sesión lo firman.

Adjunto el cuadro de las personas que están pendiente de remitir el currículum no documentado.

Como Miembros Titulares:

N°	NOMBRES Y APELLIDOS	CV archivo	CV firmado
1	Elias Melitón Arce Rodríguez	Conforme	Conforme
2	Daniel Enrique Haro Haro	Conforme	Pendiente *
3	Freddy A. Canchihuamán Rivera	Pendiente	Pendiente
4	Theresa Jean Ochoa Woodell	Conforme	Pendiente
5	Antonio Alfredo Carrasco Yalán	Pendiente	Pendiente
6	Teresa Maquillón Acevedo	Conforme	Pendiente *
7	Carla Colona Guadalupe	Pendiente	Pendiente
8	Marisa Novoa Alvarado	Pendiente	Pendiente

Como Miembros Alternos

N°	NOMBRES Y APELLIDOS	CV Firmad	CV firmado
1	Augusto Chafloque Cervantes	Pendiente	Pendiente
2	Daniel Guerra Giraldez	Pendiente	Pendiente
3	José Alberto Javier Tantaleán Da Fieno	Pendiente	Pendiente
4	Roberto Rivero Quiroz	Conforme	Conforme
5	Roxana Lescano Guevara	Conforme	Conforme
6	Reneé Gloria Herrera Taquia	Conforme	Conforme
7	Isabel Neira Canales	Pendiente	Pendiente
8	Sonia Escobar Mere de Aguayo	Conforme	Conforme

*Firmado en una sola hoja.



Raquel Ruth Huamani Ayala
 Asistente Administrativo
 Unidad de Desarrollo de Investigación
 Tecnologías y Docencia
 Mail: rhuamani@insnsb.gob.pe
 Of.: 230-0600 Anexo: 3005

El presente mensaje puede contener información confidencial o privilegiada y su uso es exclusivo del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja. Su divulgación, distribución, copia y/o adulteración está prohibido y sólo debe ser conocido y usado por el destinatario previsto. Si usted ha recibido este mensaje por error proceda a eliminarlo y notificarlo al remitente.

ANEXO 3

Certificado del curso Conducta Responsable en Investigación



QUIPU
Centro Andino de Investigación y Entrenamiento
en Informática para la Salud Global



U.S. GLOBAL MEDICAL RESEARCH UNIT
Atlanta, GA

Certificamos que

Daniel Guerra Giraldez

Ha finalizado satisfactoriamente el curso

Conducta Responsable en Investigación

30 April 2020
Calificación del Curso: 20,00



Dra. Patricia J. García Funegra
Facultad de Salud Pública y Administración
Universidad Peruana Cayetano Heredia

ANEXO 4

ACTIVIDADES EN EDUCACIÓN NACIONAL Y DIVULGACIÓN DE LA CIENCIA

2019	<ul style="list-style-type: none"> • Consultor para el MINEDU – DIFOID, para la elaboración del currículo de formación inicial docente, en la carrera del docente de secundaria en el área de Ciencia y Tecnología. • Consultor para el MINEDU – DIFODS, para la elaboración de recursos pedagógicos a utilizarse online sobre el enfoque del área de Ciencia y Tecnología dentro del Programa de Formación en Servicio para docentes del nivel de educación secundaria (DIFODS).
2018 y 2019	<ul style="list-style-type: none"> • Consultor para el MINEDU para la revisión y validación de ítems de evaluación a docentes de EBR y EBA en didáctica y conocimiento de Ciencias Naturales.
2018	<ul style="list-style-type: none"> • Consultor para el MINEDU para la elaboración y dictado de un taller sobre el enfoque del área de Ciencia y Tecnología dentro del Programa de Formación en Servicio para docentes del nivel de educación secundaria (DIFODS).
2017	<ul style="list-style-type: none"> • Profesor invitado para la charla “Difusión científica”, en el curso “Diálogos de Ciencia, Política y Sociedad: El desafío de la ciencia en Chile”, programa de Cursos de Formación General, Universidad de Chile.
2016	<ul style="list-style-type: none"> • “Sistematización de la elaboración de los estándares de aprendizajes para el Perú, 2009- 2015”, ponencia en el V Seminario Nacional de Investigación Educativa, 10-12 Noviembre. Ayacucho, Perú.
2015	<ul style="list-style-type: none"> • Taller Internacional de Estructura de Proteínas y Enzimas para la Educación Secundaria, Proyecto Laboratorios Portátiles para la Enseñanza de la Biología en la Educación Media. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. • Observador de CONCYTEC y SINEACE en el Curso de Biología Molecular y Genómica para Profesores de Enseñanza Media, en Santiago, Chile. Organizado por RELAB.
2012-2015	<ul style="list-style-type: none"> • Asesor nacional del área de Ciencia y Tecnología para el SINEACE, en la Elaboración de estándares de aprendizaje, mapas de progreso y ejemplos de desempeño de la Educación Básica Regular.
2012	<ul style="list-style-type: none"> • Consultor para el MINEDU como evaluador de libros de texto de Ciencia y Ambiente del quinto ciclo (5° y 6° de primaria) para la Dirección de Educación Primaria, Ministerio de Educación del Perú.
2013	<ul style="list-style-type: none"> • Consultor para el MINEDU para la elaboración de matrices de evaluación a docentes de Educación Básica Regular en didáctica y conocimiento de Ciencias Naturales. Elaboración y revisión de ítems de evaluación.

Publicaciones en educación

2015	Rutas del Aprendizaje. Ciencia, Tecnología y Ambiente. Seis Fascículos, SINEACE. URL: http://recursos.perueduca.pe/rutas/secundaria.php
2015	Diez Grandes Ideas Científicas. Libro, SINEACE. 2015-09 https://goo.gl/EJeXVa , http://repositorio.minedu.gob.pe/handle/MINEDU/5150

ANEXO 5

Lista de proyectos

2020-2022	VLIR-UOS – South Initiative de la cooperación belga de Flandes para el proyecto “Inquiry-based science education in metal polluted areas in Peru: training teachers how to teach science by the use of biosensors”.
2019-2021	FONDECYT – BANCO MUNDIAL. Proyecto de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico 2018-01, para el proyecto “Desarrollo de un estimulador acústico que controla señales intracelulares involucradas en la formación de biofilm corrosivo o infeccioso”.
2019-2021	FONDECYT – SENCICO. Proyectos de Investigación Aplicada en Saneamiento y Construcción 2018-01, para el proyecto “Desarrollo de una nueva tecnología de ensayos no-destruictivos basada en el uso de nanopartículas proteicas”
2018-2021	REFRACT – RISE. Consorcio internacional Europa-Latinoamérica para profundizar y extender el conocimiento de la función, estructura y evolución de las repeticiones tándem en proteínas.
2015 - 2018	FONDECYT - Proyectos de Investigación Básica y Proyectos de Investigación Aplicada”– Convocatoria 2015-I, para el proyecto “Producción y ensayo de nuevos antibióticos mediante combinatoria genética y el desarrollo de una bacteria bi-funcional <i>E.coli-M.tuberculosis</i> ”
2014-2015	Subvención Especial CONCYTEC, para el proyecto “Biofísica de las interacciones ADN-Proteína en la transcripción”.
2013	Fondo Concursable UPCH 2013, para el estudio de la iniciación a partir de promotores ribosomales mediante microscopía de fuerza atómica.
2013	Penn-Peru Pilot Grant Program, research grant for the establishment of new collaborations between University of Pennsylvania and UPCH.
2012	PABMB/ASBMB PROLAB Grant. Financiamiento de viaje y estadía para la visita de un estudiante de Maestría de la UPCH a la Universidad de California en Berkeley (Omar Herrera).
2011	Center for Emerging and Neglected Diseases. Financiamiento de viaje y estadía para la visita de un postdoc de la Universidad de California – Berkeley a Lima (Christian Wilson).
2010	NIH-Fogarty International Research Colaboration Award, Basic Biomedical, research grant for the study of initiation and elongation of transcription by enzymes of <i>M. tuberculosis</i> and <i>E. coli</i> through AFM and optical tweezers.
2009	Fondo Concursable UPCH para el estudio de los efectos de la congestión molecular en transiciones ADN-ADN y ADN-Proteína.