



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**DINAMICA DEL COMPLEJO
ENROLLADO DE LA INICIACION
DE LA TRANSCRIPCION BACTERIANA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO
DE MAESTRO EN BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR**

ROBERT PAOLO SOSA PRINCIPE

LIMA - PERÚ

2017

JURADO EVALUADOR DE TESIS

DR. JORGE AREVALO ZELADA (PRESIDENTE)

DR. MIRKO ZIMIC PERALTA (VOCAL)

MG. ANA COLAROSI SALINAS (SECRETARIO)

ASESOR

DR. DANIEL GUERRA GIRALDEZ

DEDICATORIA

A mis padres Roberto Sosa Sandoval, Clara Elena Príncipe Alva y mi hermano Kevin Arnold Sosa Príncipe que son mi motor en todo y por su apoyo incondicional por más de 25 años.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Bustamante (U.C. Berkeley) y al Dr. Daniel Guerra (UPCH) por todas las reuniones para la discusión de resultados los cuales me guiaron en la realización de experimentos. Cada paso en el proyecto fue criticado de forma constructiva y cada siguiente paso dio soporte al anterior. Cabe recalcar que, gracias a la confianza depositada en mis habilidades de investigador, pude iniciar el proyecto que ha dado fruto a la presente tesis de maestría.

Específicamente, quisiera agradecer a la Dr. Cristina Guerra, porque a pesar de siquiera haber iniciado el inglés, confío que podría acabar la maestría y cumplir con los requerimientos de la beca.

Al Dr. Philip Elms (Bio-rad laboratories, Hercules) y Jesse Dill por el diseño del *scrip* en MATLAB para el análisis general de rips/zips de los experimentos de *force-ramp* y el análisis de longitud de contorno del DNA.

Al Bach. Alfredo Flórez y estudiante de maestría Keren Espinoza por la ayuda prestada y la compañía durante los experimentos con ppGpp, el mantenimiento del microscopio de pinzas ópticas, alineamiento óptico y en la realización de pruebas de calibración.

A la Srta. Vannesa Barros por su ayuda en la importación de oligonucleótidos y reactivos para la realización de la presente tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente tesis fue financiada gracias a la beca CONCYTEC y al convenio FONDECYT (014-2013-DONDECYT).

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
II.1 RNA polimerasa	3
II.2 Transcripción	3
II.3 Iniciación de la transcripción	4
II.4 La iniciación del promotor λP_R	5
II.5 El complejo enrollado de la iniciación bacteriana	10
II.6 El complejo enrollado de iniciación en eucariotas	11
II.7 Estudios de interacción DNA-proteína con microscopía de pinzas óptica	13
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
V. MATERIALES	19
V.1 Plásmidos y cepas	19
V.2 Reactivos químicos y equipos	20
V.3 Microscopio de pinzas ópticas	21

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Preparación de DNA para iniciación en pinzas ópticas	24
VI.2 Ensayos de inmovilidad electroforética (EMSA)	26
VI.3 Inmovilización de anticuerpos anti-DIG en microesferas de Poliestireno	26
VI.4 Formación del complejo RPo enrollado	28
VI.5 Diseño de microfluídica	29
VI.6 Geometría de experimento	30
VI.7 Análisis de datos	32

VII. RESULTADOS

VII.1 Producto de PCR y retención por microesferas	39
VII.2 Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)	41
VII.3 El enrollamiento de complejos RPo en pinzas ópticas	42
VII.4 Dos tipos de complejos RPo	45
VII.5 Caracterización del complejo RPo enrollado	45
VII.5.1 Propiedades mecánicas	45
VII.5.2 Longitud de contorno (ΔL_c) del DNA enrollado	47
VII.5.3 Termodinámica del enrollamiento	53
VII.6 Modulación del enrollamiento por cambio de secuencia y fuerza iónica	56
VII.6.1 Cambios en las propiedades mecánicas	57
VII.6.2 Efecto en la longitud del DNA en interacción	61

VII.6.3 Efectos en la termodinámica	64
VII.6.4 Cambios en la energía por par de base	65
VII.7 Modulación del enrollamiento por ppGpp	71
VII.7.1 Efecto en las propiedades mecánicas	71
VII.7.2 Efecto en la cantidad de DNA enrollado	71
VII.7.3 Efecto en las propiedades termodinámicas	74
VII.7.4 Efecto en la energía por par de base	75
VIII. DISCUSIÓN	
VIII.1 Importancia del complejo enrollado	80
VIII.2 El complejo enrollado a nivel de moléculas individuales	81
VIII.3 Longitud de persistencia del DNA	84
VIII.4 Dos tipos de complejos RPo enrollados	84
VIII.5 Dinámica del complejo RPo enrollado	86
VIII.6 Cantidad de DNA involucrado en el enrollamiento	88
VIII.7 Cooperatividad del enrollamiento	91
VIII.8 Termodinámica del enrollamiento	92
VIII.9 Efecto de la secuencia <i>upstream</i>	96
VIII.10 Efecto de reemplazo del anión cloro por glutamato	100
VIII.11 Efecto del aumento de la fuerza iónica	102
VIII.12 Efecto del ppGpp	103
VIII.13 Relación entre el trabajo disipado y la velocidad del proceso	106
VIII.14 El enrollamiento en el mecanismo del RPo	107

IX. CONCLUSIONES	111
X. RECOMENDACIONES	114
X. REFERENCIAS	115
XI. ANEXOS	

ABREVIATURAS

RNAP: RNA polimerasa

RPo: complejo DNA-proteína con ssDNA en el sitio activo de la RNAP

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

KGlu: Glutamato de potasio

KCl: Cloruro de potasio

Rip: Salto abrupto (en una gráfica de fuerza *vs* extensión) debido al desenrollamiento, durante el estiramiento de un DNA con la RNAP en complejo RPo.

Zip: Salto abrupto (en una gráfica de fuerza *vs* extensión) debido al enrollamiento, durante la relajación de un DNA con la RNAP en complejo RPo.

WLC (*worm like chain*): Modelo mecánico estadístico de polímeros flexibles que relaciona la fuerza y la extensión.

P : Longitud de persistencia del DNA (nm)

L_c : Longitud de contorno del DNA (nm)

$\Delta G_{w \rightarrow u}$: Diferencia de energía libre entre el estado desenrollado (u) y el enrollado (w).

ppGpp: Tetrafosfato de guanosina

RESUMEN

La transcripción es un proceso fundamental de la vida ya que es el primer paso de la expresión de genes. Este es llevado a cabo por la RNA polimerasa (RNAP) y el primer evento involucra la interacción DNA-proteína entre la RNAP y una secuencia específica en el DNA o promotor. En 1999, Rivetti *et al.*, mediante el uso de la microscopía de fuerza atómica (AFM), proponen que la interacción entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR genera una estructura donde el DNA se enrolla alrededor la RNAP. Posteriormente, esto fue observado en otros promotores como el *tRNA*^{tyr}, *hdeAB*, *rrnB* P1 y P2 con la RNAP de *E. coli*, y entre el promotor de adenovirus y la RNAP pol II de *S. cerevisiae*. Debido a esto, parece que el enrollamiento, en la iniciación de la transcripción, es un proceso conservado en los organismos vivos. Aquí, se presenta el primer estudio de la dinámica del enrollamiento del ADN sobre la RNAP de *E. coli* mediante microscopía de pinzas ópticas, con una resolución y detalle mecánico-termodinámico nunca antes alcanzado. El presente estudio establece una nueva línea de investigación en la que por primera vez se observa efectos mecánicos en las interacciones ADN-proteína causados por el cambio de la secuencia del DNA, el aumento de la fuerza iónica del medio, y el anión fisiológico glutamato; también se observa y discute la acción del ppGpp como regulador del inicio de la transcripción a través de sus efectos en estas interacciones.

Palabras clave: Moléculas individuales, complejo enrollado y termodinámica.

ABSTRACT

The transcription is a fundamental process in the life because is the first step in gene expression. This is carried out by the RNA polymerase (RNAP) and the initial event involves the interaction DNA-protein between the RNAP and the specific sequence in the DNA or promotor. In 1999, Rivetti *et al.*, using atomic microscopy force (AFM), proposed that the interaction between the RNAP from *E. coli* and the λ PR promotor involves a wrapped DNA around the RNAP. Later, it was observed in other promoters such as *tRNA*^{tyr}, *hdeAB*, *rrnB* P1 and P2 with *E. coli* RNAP and the adenovirus' promotor with *S. cerevisiae* RNAP. Due to these, the wrapping, in the transcription initiation, seems to be a conserved process in living organism. Here, we shown the first study of the dynamic of the DNA wrapping around the *E. coli* RNAP by using optical tweezers microscopy with a resolution and thermodynamic-mechanical detail that have never seen before. This study establishes a new research line where for first time we observed the mechanical effect in the DNA-protein interactions which are caused by the DNA sequence, high ionic strength and the physiological anion glutamate. Finally, we shown and discuss the action of the ppGpp like a regulator in the transcription initiation through their effects in those interactions.

Keywords: Single Molecule, wrapped complex and thermodynamic.

I. INTRODUCCIÓN

La transcripción es un proceso fundamental para la vida de los organismos ya que es el primer paso de la expresión de genes; formar RNA a partir de DNA, llevado a cabo por la RNA polimerasa (RNAP). La transcripción es un proceso complejo de múltiples pasos, donde el inicio requiere de la interacción entre la RNAP y una secuencia específica llamada promotor. Posterior a la unión inicial, se producen una serie de cambios conformacionales de la RNAP y apertura del DNA (isomerización) hasta la formación de un complejo de iniciación abierto estable (RPo) (Ruff *et al.*, 2015).

En 1999, mediante el uso del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), Rivetti y colaboradores proponen que el complejo de iniciación estable, entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR, involucra el enrollamiento del DNA alrededor de la RNAP (Rivetti *et al.*, 1999), lo cual va acorde con los resultados de protección del DNA o *footprinting* con DNasa I y radical OH (Craig *et al.*, 1995). Posteriormente, usando AFM, esto también fue sugerido para otros promotores como *rrnB P1*, *hdeAB* y *tRNA^{tyr}* con la RNAP $\sigma 70$ y $\sigma 38$ (Dame *et al.*, 2002, Maurer & Travers, 2006, Shin *et al.*, 2005); y el promotor de adenovirus con la RNA pol II de *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 1997; Forget *et al.*, 1997). Finalmente, Doniselli *et al.*, (2015) demostraron que el enrollamiento es reducido por efecto de reguladores negativos como el tetrafosfato de guanósina (ppGpp) y Dksa en el promotor λ PR y *rrnB P1*, respectivamente. Como se

observa, el enrollamiento, como blanco de la regulación del inicio de la transcripción, parece ser un fenómeno universal e importante para la fisiología celular.

Los estudios de manipulación de moléculas individuales han permitido caracterizar las propiedades mecánicas, termodinámicas y cinéticas del plegamiento de proteínas y RNA, y de la interacción DNA-proteína. Estas técnicas permiten perturbar y visualizar en tiempo real y a nivel individual la dinámica del proceso y cómo esta responde al cambio de secuencia de aminoácidos, cofactores, entre otros (Collin *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Mihardja *et al.*, 2006; Liphardt *et al.*, 2001; Cecconi *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2007; Elms *et al.*, 2012).

En la presente tesis mostramos la dinámica de la interacción DNA-proteína, entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR, con un detalle mecánico-termodinámico y resolución nunca antes alcanzado. Además, mostramos cómo el cambio de secuencia del DNA, el aumento de la fuerza iónica, el reemplazo del anión cloro por el fisiológico glutamato y el regulador ppGpp, modifican las propiedades mecánicas y termodinámicas de la interacción DNA-proteína. Específicamente se determinó: i) la extensión de DNA involucrado en el enrollamiento (ΔL_c) lo cual va acorde con los resultados estructurales de AFM y de *footprinting*; ii) las propiedades mecánicas como la fuerza a la cual ocurre en desenrollamiento y enrollamiento; iii) la diferencia de energía libre ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$) entre el estado enrollado (w) y desenrollado (u) y trabajo disipado de la perturbación por fuerza; y iv) la energía de interacción DNA-proteína por par de base (ΔG_{bp}).

II. MARCO TEÓRICO

II.1 RNA polimerasa

La RNAP es la enzima encargada de polimerizar nucleótidos en cadenas de RNA complementarias a partir de secuencias de DNA molde, proceso conocido como transcripción; cuyo en primer evento, la RNAP reconoce secuencias específicas llamadas promotores. En bacterias, la RNAP se compone de las subunidades α , β , β' y ω , y se encarga de la síntesis de todos los RNAs (RNAm, RNAt y RNAr) y existe en dos formas: núcleo- y holo- enzima. La RNAP núcleo se compone de las cuatro subunidades básicas con la estequiometría $\alpha_2\beta\beta'\omega$, con un peso total aproximado de 400KDa; mientras que la constitución de la RNAP holo (holoenzima) agrega una subunidad sigma (σ), con una estequiometría $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$. En *E. coli*, el factor σ más abundante es el σ^{70} , con el que la holoenzima tiene un peso total de 470KDa (15). La RNAP núcleo puede realizar la catálisis correspondiente a la formación del enlace fosfodiéster para la polimerización del ARN transcrito, pero no tiene especificidad requerida para la transcripción regulada a partir de diversos promotores. Las interacciones con ADN, que permiten el reconocimiento de secuencias específicas, como promotores, requieren la asociación de la subunidad sigma (σ).

II.2 Transcripción

La transcripción es el proceso de copia de la información genética del DNA en RNA, el cual puede ser “leído” durante la traducción para formar proteínas y realizar

funciones específicas a nivel celular. El paso y uso de la información a través de la transcripción del DNA, la traducción del RNA mensajero (RNAm) y la replicación del DNA, constituyen el dogma central de la biología molecular. En estos tres procesos existen motores moleculares encargados de leer, traducir y copiar la información genética (Bustamante *et al.* 2011). La RNAP es la enzima responsable de la primera etapa de expresión génica: transcribir el código de DNA en RNAm; por esto, la transcripción es uno de los procesos fundamentales de la vida y crucial en el control de la expresión de genes. La transcripción es dinámica en función de las condiciones ambientales y la correcta expresión de un grupo de genes determinará la fisiología celular que responde a señales externas como: estrés osmótico, antimicrobianos, exceso de sales, etc.

La transcripción se compone de 3 pasos básicos: i) Iniciación, cuando la RNAP se une a una secuencia específica llamada promotor; ii) Elongación, que es llevada a cabo por el complejo ternario de la elongación (CTE) mediante la unión de NTPs en secuencia complementaria al ADN molde para formar RNA; y iii) Terminación, que ocurre cuando el CTE se disocia y se libera el RNA, la RNAP y el DNA.

II.3 Iniciación de la transcripción

El proceso de iniciación es muy complejo y puede dividirse en 4 procesos para cualquier promotor bacteriano: i) Búsqueda del promotor: la RNAP σ^{70} se une a un segmento aleatorio del DNA de forma inespecífica y, mediante movimiento difusivo, encuentra al promotor y establece interacciones específicas; ii) Formación de complejo cerrado (RPC): se posiciona a la RNAP σ^{70} en interacción con la región -30, -10 y +1;

iii) Isomerización: ocurren cambios conformacionales que involucran al ADN y a la proteína que incluyen la apertura de la doble cadena de DNA (dsDNA) entre la posición -10 y +1; y iv) Formación del complejo RPo maduro: tras la formación de la burbuja de transcripción, pueden ocurrir algunos cambios conformacionales que estabilizan una configuración caracterizada por mantener el sitio activo disponible para el ingreso de los nucleótidos trifosfatados (NTPs) para el proceso de elongación (Saecker *et al.*, 2011; Dangkulwanich *et al.*, 2014; Ruff *et al.*, 2015). El proceso de iniciación ha sido extensivamente caracterizado con diversas técnicas bioquímicas en tan solo algunos pocos promotores. Entre ellos, uno de los más estudiados es el promotor λ PR ya que: i) es un modelo de estudio para regulación transcripcional, ii) es un promotor de tipo sigma 70, que es el factor sigma más frecuentemente hallado en interacción con la RNAP de *E. coli*; y iii) forma un complejo promotor-RNAP de muy alta vida media (~6h) lo que facilita realizar estudios de inhibición (Łyzen *et al.*, 2009; Potrykus *et al.*, 2002).

II.4 La iniciación del promotor λ PR

Para el caso del promotor λ PR, se ha identificado 3 estados intermediarios entre el RPe y el RPo (en la Figura 1, se presenta el diagrama energético), denominados I₁, I₂ e I₃, entre los cuales se relacionan los siguientes procesos:

- i) RPe \rightarrow I₁: Este proceso es cinéticamente más rápido que la isomerización (I₁ \rightarrow I₂) y el DNA se enrolla entre la posición -80 a +20. El complejo I₁ es sensible a competidores, como DNA inespecífico, o heparina; es muy estable a 0° C y su formación es favorecida por altas

concentraciones de glutamato (Davis *et al.*, 2007; Craig *et al.*, 1998; Kontur *et al.*, 2010). Mediante ensayos con nucleasas, una protección downstream (entre +15 y +25) también se ha observado en los promotores *rrnB* P1, *lacUV5* y T7A1, *λprmup-1 Δ265* y *groE* (Ruff *et al.*, 2015).

- ii) $I_1 \rightarrow I_2$: es un proceso lento (considerado paso limitante) donde se produce la isomerización o apertura (*melting*) del dsDNA entre -11 y +2. Involucra una energía de activación de 34 ± 2 kcal/mol, un valor relativamente alto, por lo que el proceso resulta fuertemente dependiente de la temperatura. Este proceso no es afectado por urea y sales como Mg^{+2} o Na^{+1} (también observado en el promotor T7A1), y altas concentraciones de glutamato y flúor (Craig *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2005; Gries *et al.*, 2010, Kontur *et al.*, 2010); pero es favorecido por el dominio 1.1 N-terminal de la subunidad σ , $\sigma 1.1$ (Wilson *et al.*, 1997).
- iii) $I_2 \rightarrow I_3 \rightarrow RPo$: el DNA pierde interacción con la RNAP entre -80 y -70, se ensambla y ajusta el clamp/jaw formado por las subunidades β/β' con el DNA *downstream* sin cambio en la extensión total de la interacción. Este paso es cinéticamente más rápido que el paso $I_1 \rightarrow I_2$, es fuertemente estimulado por glutamato, y el complejo formado no es sensible a competidores como la heparina (Davis *et al.*, 2007; Saecker *et al.*, 2011; Kontur *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2012) (Figura 1).

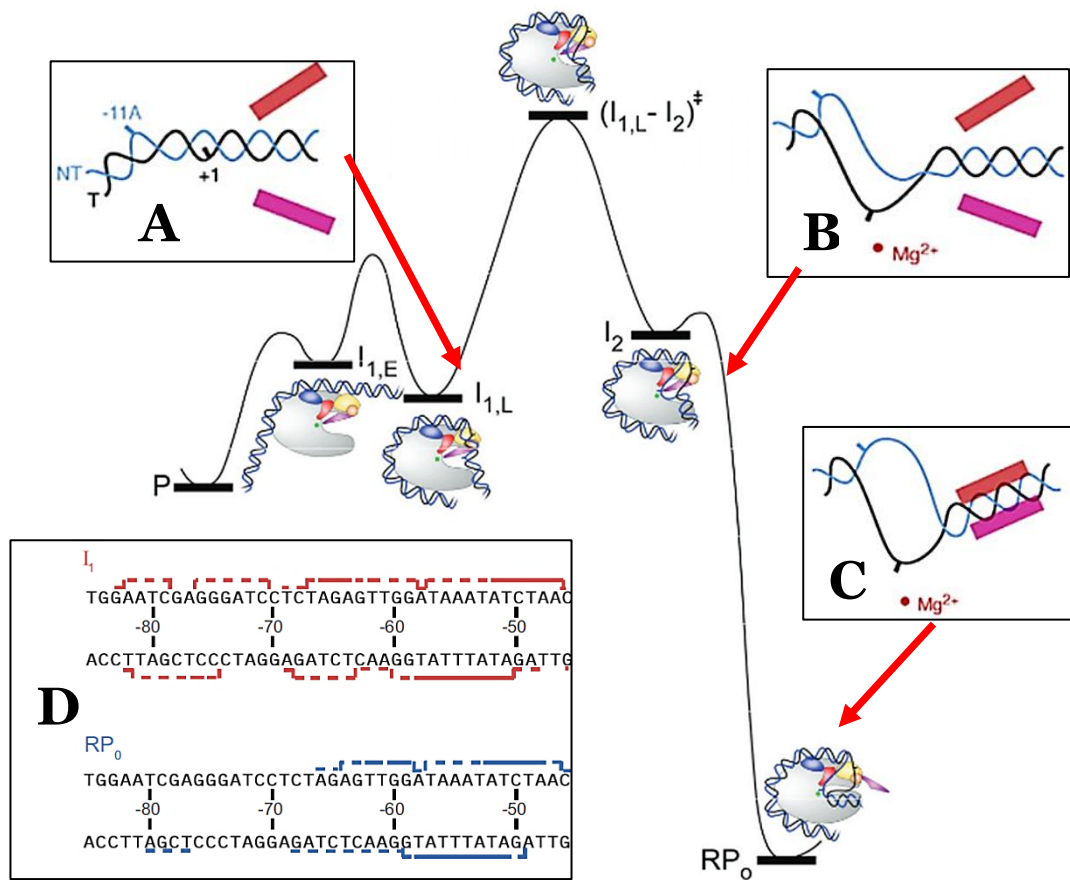


Figura 1: Diagrama energético de las reacciones para la formación de RPO. Primero se forman los intermediarios cerrados $I_{1,E}$ y $I_{1,L}$ que se equilibran rápidamente; el $I_{1,L}$ produce una protección del promotor entre -85 y +25. Luego, se produce el *melting* del dsDNA, $I_1 \rightarrow I_2$, lo que involucra una alta energía de activación (paso limitante) y no depende de Mg^{+2} . Finalmente, se producen una serie de cambios conformacionales en la RNAP para formar el complejo estable RPO, por ajuste del DNA *downstream* por el β clamp/ β' jaw (Davis *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2005; Saecker *et al.*, 2011; Craig *et al.*, 1998; Gries *et al.*, 2010; Kontur *et al.*, 2006; Kontur *et al.*, 2010). El diagrama energético fue tomado de Ruff *et al.*, (2015). El DNA codante y no codante son representados como líneas azules oscuras y claras, respectivamente; el β clamp/ β' jaw son la barra naranja y morada, respectivamente; y la RNAP (insertos A, B y C), es la esfera celeste. El inserto A indica que el complejo RPO, en relación al I_1 , la protección del DNA se reduce de -85 a -65.

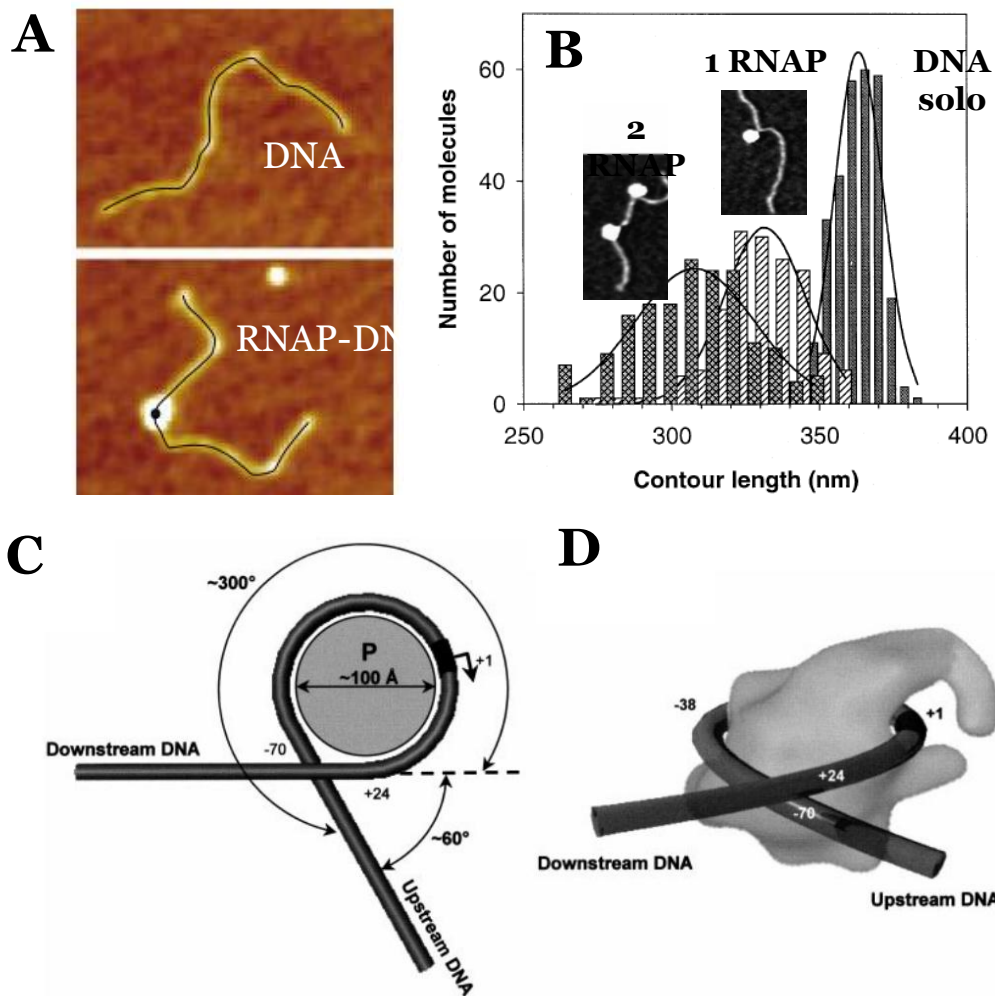


Figura 2: **A)** Imagen representativa de AFM de una molécula de DNA y complejo DNA-proteína entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR. **B)** Comparación de la longitud de contorno (L_c) de una molécula de DNA libre contra un complejo DNA-proteína con 1 y 2 RNAP. Se observa que cuando una o dos RNAP se unen al promotor, la L_c disminuye en 30nm o 60nm, respectivamente. Este resultado, junto a otros estudios de protección de DNA con DNasa I y radica OH, se postula que el DNA se enrolla sobre la RNAP de *E. coli* en el complejo de iniciación. **C y D)** Modelo del DNA enrollado sobre la RNAP, se observa que 90 pb del DNA (posición -70 y +24) abarcan 300° de ángulo; considerando que la RNAP como una esfera y de radio de 5nm. La imagen A y B-D fueron tomadas de Cellai *et al.*, (2007) y Rivetti *et al.*, (1999).

Tabla 1: Resumen de los promotores estudiados por AFM a nivel del complejo de iniciación

Promotor	DNA*	Notas**	N***	Referencia
λP_R	32 nm	---	514	Rivetti <i>et al.</i> , 1999
	16nm	ppGpp		Doniselli <i>et al.</i> , 2015
λP_{RM}	8nm	---	76	Mangiarotti <i>et al.</i> , 2009
λP_R (-79 a +34)	20nm	---	117	
λP_R (-59 a +34)	20nm	---	90	
<i>rrnBP1</i>	30nm	---	32	Dame <i>et al.</i> , 2002
	79nm	H-NS	42	
<i>rrnBP1</i>	16nm	---		Doniselli <i>et al.</i> , 2015
	16nm	ppGpp		
	2nm	DksA		
tRNA ^{tyr}	52nm	---	200	Maurer & Travers, 2006
d61	22nm	---	232	
hdeAB	30nm	---	---	Shin <i>et al.</i> , 2005
	20nm	RNAP- σ^{38}	---	
<i>LacUV5</i> (ICAP)	4nm	---	354	Cellai <i>et al.</i> , 2007
<i>LacUV5</i> (UP ^{prox})	2nm	---	130	
<i>LacUV5</i> (UP ^{full})	21nm	---	130	
	13nm	$\Delta\alpha CTD^I/\Delta\alpha CTD^{II}$ RNAP	79	
	13nm	$\Delta\alpha CTD^{II}$ RNAP	55	
	13nm	$\Delta 6-\alpha^I/\Delta 6-\alpha^{II}$ RNAP	51	
12nm	$\Delta 12-\alpha^I/\Delta 12-\alpha^{II}$ RNAP	35		

* Extensión del DNA compactado

** Otras proteínas adicionadas al análisis, además de RNAP- σ^{70}

II.5 El complejo enrollado de la iniciación bacteriana

Estudios de protección del DNA (*footprinting*) con DNasa I y radical OH \cdot , en los complejos RPo de λP_R , mostraron que la RNAP de *E. coli* protege el DNA en ~100pb entre las posiciones -75 y +25 (Nickerson & Achberger, 1995; Craig *et al.*, 1995); y en 1999 se demostró que el DNA, con el promotor λP_R , sufre una “compactación” aparente del DNA en el complejo RPo. Esto se concluye de comparar la longitud de contorno de moléculas individuales de DNA libre y DNA en RPo, utilizando el microscopio de fuerza atómica (AFM) (Rivetti *et al.*, 1999), ver figura 2. Tomando en cuenta las dimensiones de la RNAP estimadas por microscopía crioelectrónica (Cryo-EM) (90 x 95 x 160 Å) (Darts *et al.*, 1989), la estructura cristalina de la RNAP de *E. coli* (Murakami, 2013) y los resultados estructurales de AFM y de *footprinting* (Nickerson & Achberger, 1995; Craig *et al.*, 1995; Rivetti *et al.*, 1999); los autores proponen que es imposible acomodar 100pb de interacción sin suponer que el DNA se enrolla alrededor de la RNAP.

Para el caso del promotor λP_R , se ha observado que i) el DNA enrollado que envuelve a la RNAP forma un ángulo entre brazos de 300° y se compone de 20 y 10nm de DNA *upstream* y *downstream*, respectivamente, tomando de referencia el sitio +1, de inicio de la transcripción (Rivetti *et al.*, 1999); ii) es estabilizado por las regiones C-terminal ($\alpha CTD^I/\Delta\alpha CTD^{II}$) y el espaciador entre los dominios C y N-terminal de la subunidad α ($12-\alpha^I/12-\alpha^{II}$) (28); iii) La región *upstream* (UP), donde se encuentran zonas ricas en AT (*AT-tracts*) los cuales tienen una curvatura o capacidad de curvatura intrínseca, favorece la constante de asociación de la RNAP al promotor (Mangiarotti *et al.*, 2009; Nickerson & Achberger, 1995). Según estudios posteriores, el enrollamiento

se mantiene parcialmente en los complejos de elongación y no bloquea el canal de salida del RNAm (Rivetti *et al.*, 2003), y el regulador negativo ppGpp reduce el enrollamiento de 30 a 16nm (32).

El fenómeno de enrollamiento también ha sido observado, a nivel del AFM y TEM, entre los promotores bacterianos *rrnB P1*, *hdeAB* y *tRNA^{tyr}* y la RNAP $\sigma 70$ y $\sigma 38$ (Dame *et al.*, 2002, Maurer & Travers, 2006, Shin *et al.*, 2005); y el promotor de adenovirus y la RNA pol II de *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 1997; Forget *et al.*, 1997). Sin embargo, esto no ocurre en los promotores *LacUV5* y λP_L (28), Mangiarotti *et al.*, 2009), ver tabla 1. Debido a la escasez de promotores estudiados a nivel de moléculas individuales, no se sabe si el enrollamiento es un fenómeno común en la transcripción.

II.6 El complejo enrollado de iniciación en eucariotas

En eucariotas existen tres diferentes formas de RNAP, de las cuales la RNAP pol II tiene la función de transcribir la mayoría del mRNA. La iniciación de la transcripción se produce como sigue: i) La proteína de unión a caja TATA (TBP), que forma parte de TFIID, se une a la caja TATA en la posición -30; ii) La TBP recluta a TFIIB y TFIIF-RNAP pol II, formando así el complejo de pre-iniciación (PIC) y iii) Se une la TFIIE y TFIIH, donde se produce la isomerización del promotor, formando así el complejo de iniciación.

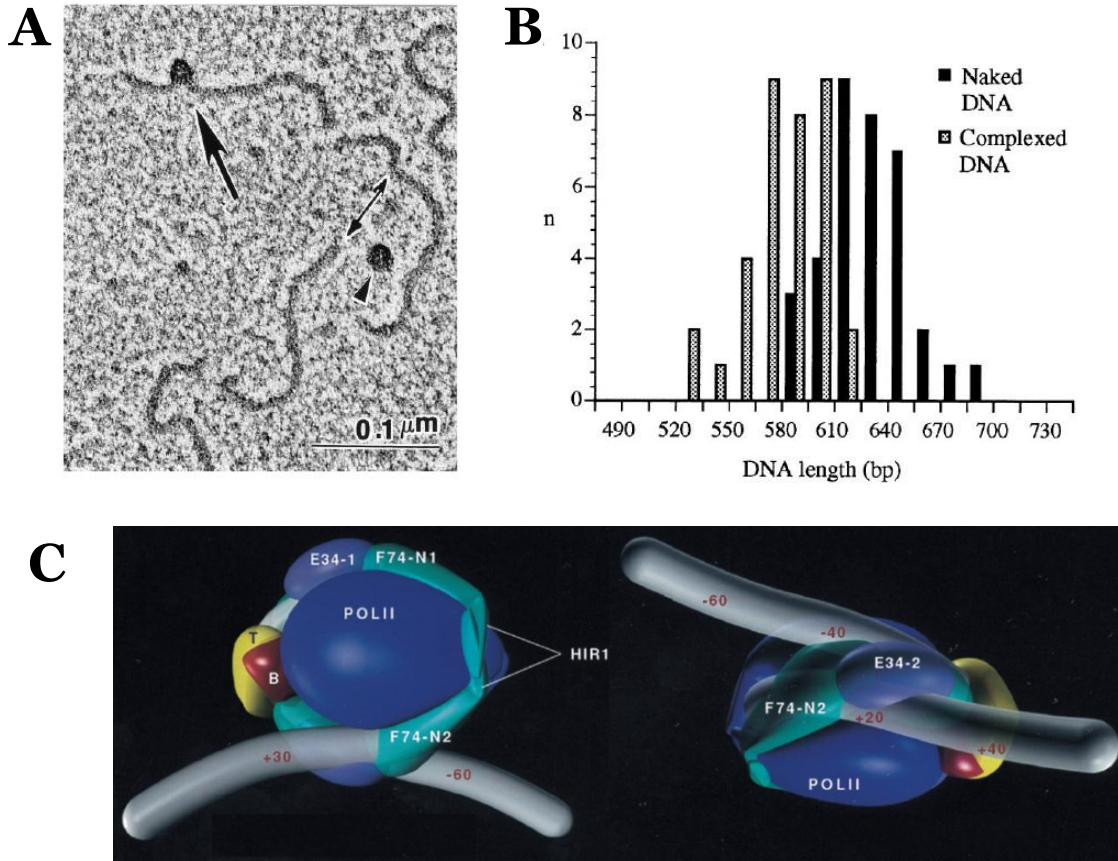


Figura 3: **A)** Fotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) del PIC con el promotor de adenovirus; **B)** Comparación de la longitud de contorno del DNA libre (barras grises) y el DNA en PIC (barras negras), ver Forget *et al.* (1997); **C y D)** Modelo estructural del enrollamiento del DNA sobre la RNA pol II en el PIC donde se observa la TBP (T, amarillo), TFIIE (F74-N1, celeste), TFIIE (E34, azul claro), TFIIB (B, rojo), Pol II (azul oscuro) y el DNA (gris); se observa que el DNA compactado involucra desde +30 a -60 (Coulombe, 1999; Coulombe y Burton, 1999).

Estudios de fotoentrecruzamiento (*crosslinking*) sitio-específico DNA-proteína entre la Pol II y el promotor de adenovirus, en el PIC, muestra que el DNA es protegido de -40 a +13 y que dicha interacción es impulsada por el factor TFIIF (Robert et al., 1998; Kim et al., 1997; Forget et al., 1997). Además, estudios de TEM, a nivel del PIC, muestran que el DNA presenta un compactamiento de 51 pb; esto se deduce de comparar la longitud de contorno del DNA libre y el DNA en el PIC (Kim *et al.*, 1997; Forget *et al.*, 1997), ver Figura 3. Además, tomando en cuenta las dimensiones de la Pol II ($14 \times 13.6 \times 11$ nm), entre 70 y 100 pb de DNA de forma B es suficiente para enrollar el DNA alrededor de la enzima. Los autores concuerdan que el enrollamiento del DNA en la Pol II es la explicación más sencilla a las observaciones (Coulombe & Burton, 1999; Coulombe, 1999; Robert *et al.*, 1998).

II.7 Estudios de interacción DNA-proteína con microscopía de pinzas óptica

Pocos son los artículos que estudian la interacción DNA-proteína a nivel de microscopía de pinzas ópticas (Heller *et al.*, 2014). A continuación se resume alguno de ellos,

- **Dinámica de nucleosoma:** Mediante el uso de la microscopía de pinzas ópticas, se observó que el nucleosoma sometido a tensión sufría un desenrollamiento en dos eventos; a bajas (3 pN) y altas fuerzas (8 – 9 pN) con cambios de extensión de 21 ± 0.22 y 22 ± 0.18 nm, respectivamente (Mihardja *et al.*, 2006), ver Figura 4. Para la transición de 8 pN, se estimó la diferencia de energía libre (ΔG^0), constante de velocidad de

enrollamiento ($k_{u \rightarrow w}^0$) y desenrollamiento ($k_{w \rightarrow u}^0$) de 29.7 ± 2.42 kJ/mol, 58.2 s^{-1} y 0.00038 s^{-1} , respectivamente. Finalmente, el uso de una alta concentración de sales, redujo el ΔG^0 a 23.2 ± 1.17 kJ/mol, por lo que los autores proponen que la interacción tiene un componente electrostático. En un análisis por par de base, se estima el valor de la energía de interacción en $-2.41 \text{ pN} \cdot \text{nm/pb}$.

- **Interacción IHF-DNA:** Utilizando microscopía de pinzas ópticas y agregando la proteína en *trans*, se observó que la interacción del factor IHF-DNA (medido como un cambio de extensión) es dependiente de la concentración de IHF (Le *et al.*, 2013). Además, trabajando a modo de fuerza constante (ver metodología) entre 0 y 1pN de fuerza (Figura 3C), se observó que la interacción del IHF-DNA involucra dos estados con una diferencia de $17.34 \pm 0.08 \text{ nm}$ (Δz). Utilizando la relación:

$$P_{bend} = \frac{(C/K_d) \exp(-\Delta z \cdot f / K_B T)}{1 + (C/K_d) \exp(-\Delta z \cdot f / K_B T)}$$

Donde C es la concentración de IHF (mM), f es la fuerza aplicada al DNA (pN) y K_d es la constante disociación del IHF al DNA; se observó que a 21 y 31° C el K_d es 0.44 ± 0.06 y $1.54 \pm 0.08 \text{ nM}$. Gracias a esto los autores concluyen que la disociación es dependiente de la temperatura (Le *et al.*, 2013).

- **Enrollamiento del promotor *lacCONS*:** Usando la microscopía de pinzas magnéticas e introduciendo superenrollamiento, se puede observar un cambio de extensión al formarse los complejos RPo, de 80 ± 5 y $50 \pm 5 \text{ nm}$,

respectivamente para superenrollamiento positivo y negativo. De acuerdo a esto, es posible separar el componente de enrollamiento y de isomerización durante la formación del RPo (Revyakin *et al.*, 2004). Los autores determinan que 15 nm de DNA se encuentra enrollado en la RNAP de *E. coli* (Figura 3A). La desventaja de esta técnica es que tiene una resolución relativamente gruesa, de 10nm.

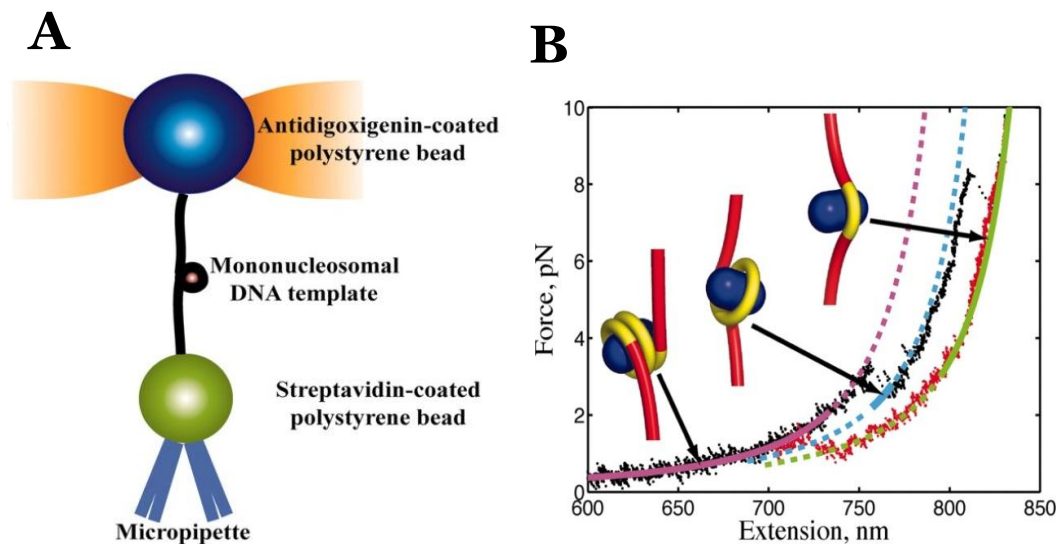


Figura 4: A) Geometría del experimento del estudio de mononucleosomas en el microscopio de pinzas ópticas; como se observa, el complejo DNA proteína se encuentra suspendido entre dos microesferas de poliestireno por DNA. B) Gráficas de fuerza vs extensión producto del estiramiento y relajación del DNA unido al octámero de histonas, se observan los cambios de extensión producto del desenrollamiento; Las Figuras fueron obtenidas de Mihardja *et al.*, (2006).

III. HIPÓTESIS

El complejo DNA-proteína, entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR, forma una estructura donde el DNA se enrolla alrededor de la RNAP. Esta estructura parece ser conservada e importante biológicamente ya que es blanco de reguladores transcripcionales como el ppGpp y DksA. La estabilidad de un complejo DNA-proteína es medida por la energía involucrada en sus interacciones; sin embargo, hasta la fecha, la contribución del enrollamiento a la energía total no ha sido explorada. Por lo tanto, proponemos que mediante la aplicación directa de fuerza mecánica sobre el DNA enrollado en el complejo, se podrá estudiar la cantidad de DNA y energía involucradas en su interacción, y como estas son afectadas por el cambio de secuencia del DNA, fuerza iónica, estabilizadores y reguladores transcripcionales. Esta información permitirá interpretar la importancia que el enrollamiento cumple en la iniciación de la transcripción y su regulación.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivos generales

1. Estudiar la dinámica de la interacción DNA-proteína del complejo enrollado de la iniciación de la transcripción bacteriana formado por la RNA polimerasa de *Escherichia coli* y el promotor λ PR; en tiempo real y a nivel individual, mediante microscopía de pinzas ópticas.

IV.2 Objetivos específicos

1. Generar un sistema experimental que permita el estudio del complejo enrollado entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR silvestre en el microscopio de pinzas ópticas.
2. Estudiar las propiedades mecánicas y termodinámicas del complejo enrollado de la transcripción bacteriana, formado entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR.
3. Caracterizar el efecto del cambio de secuencia en el promotor λ PR, en las propiedades mecánicas y termodinámicas del complejo enrollado de la transcripción bacteriana, formado con la RNAP de *E. coli*.
4. Estudiar el efecto del reemplazo del anión cloro (Cl^-) por anión fisiológico glutamato (Glu^-) en las propiedades mecánicas y termodinámicas del complejo enrollado entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR silvestre.

5. Determinar el efecto del aumento de la fuerza iónica en las propiedades mecánicas y termodinámicas del complejo enrollado entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR silvestre.
6. Caracterizar el efecto del ppGpp en la dinámica de la interacción DNA-proteína, entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR silvestre.

V. MATERIALES

V.1 Plásmidos y cepas.

Se diseñaron los plásmidos pD100/30 (3298pb) y pP75/30 (3298pb), los fueron mantenidos en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con 10 – 15% glicerol en 1 ml y a -80°C. Las bacterias fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) (Merk) (1.5% agar) suplementado con ampicilina (Amp) a 10µg/ml para la purificación de los plásmidos y crecimiento en placa.

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Material	Descripción	Referencia
Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS	B F-dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal λ(DE3) [pLysS Camr]	Stratagene (La Jolia, CA)
pD100/30 (3 298 pb)	Para la producción de DNA con el promotor λPR silvestre (2043 pb)	Este estudio
pP75/30 (3 298 pb)	Para la producción de DNA con el promotor λPR mutante (2043 pb)	Este estudio

El diseño de los plásmidos y oligonucleótidos considero: i) el producto de PCR debe de incluir el promotor λPR entre -100 a +30, rodeados por DNA aleatorio (~1Kb por cada brazo) o *handles* para que el complejo RPo enrollado no se vea afectado por interacción con la bead; ii) el DNA total debe de ser de un tamaño que reduzca el ruido

y que facilite la búsqueda del DNA en el microscopio, por lo que se decidió por ~2Kb (~1Kb por la *handle* derecha e izquierda, y el 130pb de λ PR); y iii) no incluir ningún otro promotor en el DNA total de tal manera que se forme un complejo RPo enrollado por cada DNA individual.

V.2 Reactivos químicos y equipos.

V.2.1 Reactivos y equipos para DNA. Plásmidos pD100/30 y pP75/30 (GenScript), Primer Forward pFAB_pin_F modificado con 5'-biotina, Primer Reverse pFAB_pin_R modificado con 5'-digoxigenina (IDT), Buffer PCR 10X, MgCl₂ (Thermo), Enzima TaqDNA polimerasa (Thermo), desoxinucleótidos (dNTPs) (Fermentas), Gel Pilot loading dye 5X (Fermentas), Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus), Agarosa (Cleaver Scientific Ltd), Bromuro de Etidio, Agua ultrapura, GeneJET PCR purification kit, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (thermo), Termociclador (AB Applied Biosystems) y Nanodrop.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Primers	%CG	Secuencia	Tm (°C)
pFAB_pin_R	60	5-/Biosg/CCGAAAAGTGCCACCTGACG-3	59.0
pFAB_pin_F	55	5-/Dig/TAACTGGCTTCAGCAGAGCG-3	57.5

V.2.2 Reactivos y equipos para el estudio de iniciación en pinzas ópticas. RNA polimerasa- σ 70 de *E. coli* (colaboración de Mikhail Kashlev Ph.D., National Cancer

Institute, NIH), RNA polimerasa- σ 70 de *E. coli* (Epicentre), Heparina de sodio grado I-A (SIGMA-ALDRICH), microesferas de poliestireno de 2.1 μm y de 2.1 μm con estreptavidina (Spherotech), Trisma® base (SIGMA), KCl (Merk), MgCl_2 hexahidratado (Merk), Ditioneitol (DTT) (ENZO® life sciences), DMP (Thermoscientific Pierce 21666), anticuerpo policlonal de oveja de anti-digoxigenina (200 μg), BSA (NEB), filtros 0.22 μm (Millipore), Jeringas 20ml.

V.2.3 Sistema de microfluidica. Microcover glass rectangular N°2, 25x60 mm (1 x 23/8"); nescofilm con orificios hechos con láseres en los extremos; microcover glass rectangular con orificios hechos con láseres, tubing king precisión glass 0.025x0.01 mm (IDxOD) para dispensadores; tubing king precision glass 0.040x0.01 mm (IDxOD) para micropipeta; tubo de polietileno P10 0.28x0.64 mm (IDxOD); tubo de polietileno P50 0.58x0.99 mm (IDxOD), Jeringas de 1 ml, agujas, soporte o holder para microcámara.

V.3 Microscopio de pinzas ópticas.

El microscopio de Pinzas Ópticas tiene una resolución de fuerza de 1×10^{-12} Newton (1 pN), de $1-5 \times 10^{-9}$ m de extensión (1-5 nm, dependiendo del ruido del sistema) y temporal de 4 milisegundos (ms). Trabaja con una longitud de onda de 845 nm. El instrumento de Pinzas Ópticas utiliza el *momentum* de la luz para capturar objetos de alto índice de refracción. La luz que incide sobre una partícula es refractada y reflejada. La luz que incide sobre la partícula genera un *momentum* (fuerza) sobre ella y, según el ángulo de difracción, la partícula es empujada en dirección opuesta con la misma fuerza. Si la luz incide en el centro de la partícula, los ángulos de difracción

se cancelan juntamente con las fuerzas, atrapando la partícula en el centro del foco (Smith *et al.*, 2003), ver Figura 5A.

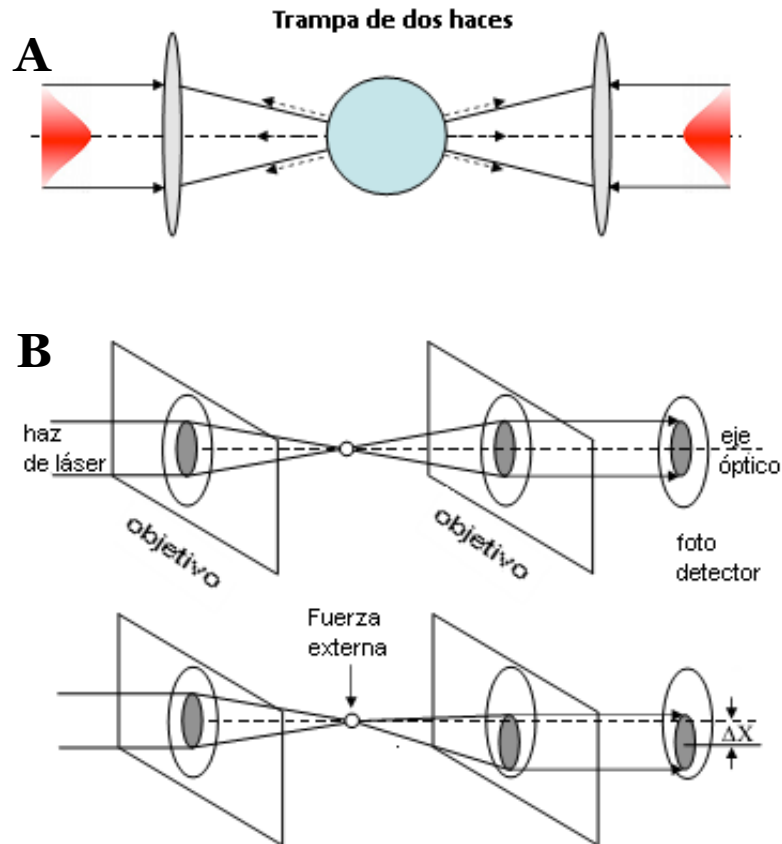


Figura 5. Diagrama de una trampa óptica. **A)** Haces duales de láseres que se propagan en contraposición. La partícula es atrapada en el foco de la luz, cuando las fuerzas dispersas formadas por los rayos reflectados son canceladas mientras las fuerzas en gradiente son dobladas. **B)** Sensor de la fuerza del *momentum* de la luz (Smith *et al.*, 2003).

La forma de medir la fuerza en una trampa óptica es considerar esta última como un pozo de potencial armónico o un resorte virtual que atrae a la partícula hacia el

centro de la trampa. La fuerza es dada por $F = k\Delta x$, donde Δx es el desplazamiento de la partícula en la trampa (nm) y k la constante del resorte (pN/nm). Esto es posible usando dos haces de luz de propagación opuesta como se observa en la Figura 5B. En esta disposición experimental, las fuerzas de dispersión generadas por los rayos reflejados son canceladas, mientras que las fuerzas transversales en gradiente son duplicadas (Smith *et al.*, 2003).

El diseño de los plásmidos y oligonucleótidos considero: i) el producto de PCR debe de incluir el promotor λ PR entre -100 a +30, rodeados por DNA aleatorio (~1Kb por cada brazo) o *handles* para que el complejo RPo enrollado no se vea afectado por interacción con la bead; ii) el DNA total debe de ser de un tamaño que reduzca el ruido y que facilite la búsqueda del DNA en el microscopio, por lo que se decidio por ~2Kb (~1Kb por la *handle* derecha e izquierda, y el 130pb de λ PR); y iii) no incluir ningún otro promotor en el DNA total de tal manera que se forme un complejo RPo enrollado por cada DNA individual.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Preparación de DNA para iniciación en pinzas ópticas

VI.1.1 Preparación de plásmidos. Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLyss, que contienen los plásmidos pD100/30 y pP75/30 se cultivaron en 10 ml de Luria-bertani (LB) con ampicilina (10 µg/ml), por 18 h, 37°C y 200 rpm. La extracción de plásmido se realizó con el GeneJET Plásmid Miniprep Kit. La concentración del DNA se cuantificó en el Nanodrop y la pureza del DNA se verificó por la relación A260/A280 (2) y A260/A230 (1.8 – 2.2).

VI.1.2 Producción de DNA con el promotor λPR. Se usaron los primers pFAB_pin_R y pFAB_pin_F. Este PCR se realizó con la TaqDNA polimerasa con un Ta de 60°C (Tabla 4). El producto esperado es de 2043 pb.

Los productos de PCR para cada reacción fueron observados en electroforesis de agarosa 0.8%, 100V, 1h y se cargaron 3 µl de cada reacción. Para todos los casos, se utilizó el marcador de peso Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados con el transluminador. El producto de PCR se purificó mediante el GenJET PCR purification Kit, se cuantificó en el Nanodrop y se anotaron los valores de A260/A280 y A260/A230 para verificar su pureza.

Tabla 4. Diseño del PCR para la obtención del DNA que contiene el promotor λ PR

Reactivo	[] inicial	[] final	Volumen (μl)
H2O	---	---	33
Buffer 10X TaqDNA pol	10X	X	20
MgCl₂	25mM	1mM	8
dNTPs	10 mM	0.2 mM	4
pFAB_pin_R	10 μ M	0.2 μ M	4
pFAB_pin_F	10 μ M	0.2 μ M	4
pD100/30/ pP75/30	100 ng/ μ l	1 μ l	1
TaqDNA pol	5 U/ μ l	1.25 U/50 μ l	1
Volumen final			200

Tabla 5. Termociclado del PCR para producir el DNA con el promotor λ PR

Número de ciclos	Temperatura	Duración
1	95 °C	5 min
30	95 °C	30 s
	60 °C	30 s
	72 °C	2 min
1	72 °C	10 min
1	4 °C	∞

VI.2 Ensayos de inmovilidad electroforética (EMSA)

Estos ensayos fueron realizados para evaluar la formación de complejos específicos RPo enrollados. Se usó 0.3 pmol (450 ng) del DNA de pinzas (2300pb) con 1.5 pmol de RNAP de *E. coli*, estos se incubaron por 20min a 37°C en TB40 1X en un volumen final de 5 µl. Luego, se agregó 0.5 µl de heparina 2 mg/ml para seleccionar los complejos específicos, se incubó por 20 min a 25°C (Rivetti *et al.*, 1999 y Craig *et al.*, 1995). Finalmente, se agregó 1 µl de buffer de carga 6X y todo fue cargado en el gel nativo.

Todos los gels fueron corridos en Buffer TBE 0.5X por 1h con 30 min a 120V en condiciones nativas en PAGE 4% y a 4°C (Stellwagen, 2013); se usó un marcador de DNA entre 100pb y 1Kb. Los gels fueron teñidos con bromuro de etidio al 0.01% por 15min y visualizados en un transluminador. Estos ensayos fueron realizados con el objetivo de sondear la estabilidad de los complejos en las condiciones usadas en el microscopio de pinzas ópticas.

VI.3 Inmovilización de anticuerpos anti-DIG en microesferas de poliestireno.

Este protocolo fue realizado para inmovilizar, de forma covalente, los anticuerpos anti-digoxigenina en la superficie de las microesferas de poliestireno de 3.4µm.

1. Centrifugar por 30 min a 3000 rpm, 1ml de microesferas recubiertos con proteína G (Spherotech PGP-30-5, 0.5% w/v) y remover el sobrenadante.
2. Resuspender las microesferas en 1ml de AB buffer.

3. Disolver el anticuerpo policlonal de oveja de anti-digoxigenina (200 μg) en 200 μl de buffer PBS pH 7.4.
4. Disolver 50mg de DMP (Thermoscientific Pierce 21666) en 1ml de AB buffer.
5. Agregar 60-65 μl de anti-digoxigenina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a las microesferas y mezclar rápidamente.
6. Agregar 30 μl la solución de DMP a los microesferas y mezclar rápidamente. Mantener en agitación leve por 1h a 25°C.
7. Centrifugar por 10min a 3000 rpm a 4°C, remover el sobrenadante y Resuspender en 1ml de Tris-base 1M pH 7.8. Mantener en agitación leve por 2h a 25°C
8. Centrifugar por 10min a 3000 rpm a 4°C, remover el sobrenadante y Resuspender en 1ml de Buffer microesferas.
9. Centrifugar por 10min a 3000 rpm a 4°C, remover el sobrenadante y resuspender 500 μl de Buffer microesferas 3 veces.
10. Incubar en BSA 10X (NEB) por 10min y centrifugar por 10min a 3000rpm a 4°C, remover el sobrenadante y Resuspender en 500 μl buffer microesferas.
11. Repetir el paso anterior, pero Resuspender en 900 μl de buffer microesferas.
12. Separar en alícuotas de 50-80 μl , guardar a 4°C.

Se tomaron entre 30-40ng del DNA usado para las pinzas ópticas, luego se agregó 1, 3, 5 y 7 μl de microesferas preparadas en 10 μl de volumen de reacción. Todo el volumen fue corrido en agarosa 0.8% a 100V por 40 min y visualizado por tinción con bromuro de etidio en transluminador.

VI.4 Formación del complejo RPo enrollado

Se realizó en 3 pasos de acuerdo a Rivetti *et al.*, 1999 y Craig *et al.*, 1995.

- Primero, se usó 0.2136 pmol RNAP- σ^{70} y 0.042pmol de DNA (2300 pb) (relación 5:1) en TB40 1X (20mM Tris HCl, 40mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT); se incubó por 20 min a 37 °C en un volumen final de 5 μ l. En este paso se forman los complejos de iniciación abiertos (RPo) entre la RNAP y el promotor λ P_R.
- Segundo, se adicionó 0.5 μ l de heparina (2 mg/ml). Se incubó a 25 °C por 15 min. En este paso, la heparina selecciona los complejos DNA-proteína específicos. Luego de la incubación, se completó a 10 μ l en TB40 1X y se realizó una dilución de 1/20.
- Finalmente, se tomaron 1.5 μ l de 1/20 RPo con 5 μ l de microesferas de poliestireno (3.4 μ m), que tienen anti-digoxigenina inmovilizada, en TB40 1X y se incubaron por 20 min a 25 °C. Los complejos formados fueron diluidos en 500 μ l de TB40 1X y mantenidos a 4 °C antes de su utilización en las pinzas ópticas.

El mismo protocolo fue usado para el estudio del promotor λ PR silvestre y la mutante upstream; el aumento de la fuerza iónica y el efecto del ppGpp (ver figura 6). Sin embargo, para el estudio del efecto del anión glutamato, los complejos RPo y el buffer de transcripción se prepararon a 100mM de KGlu.

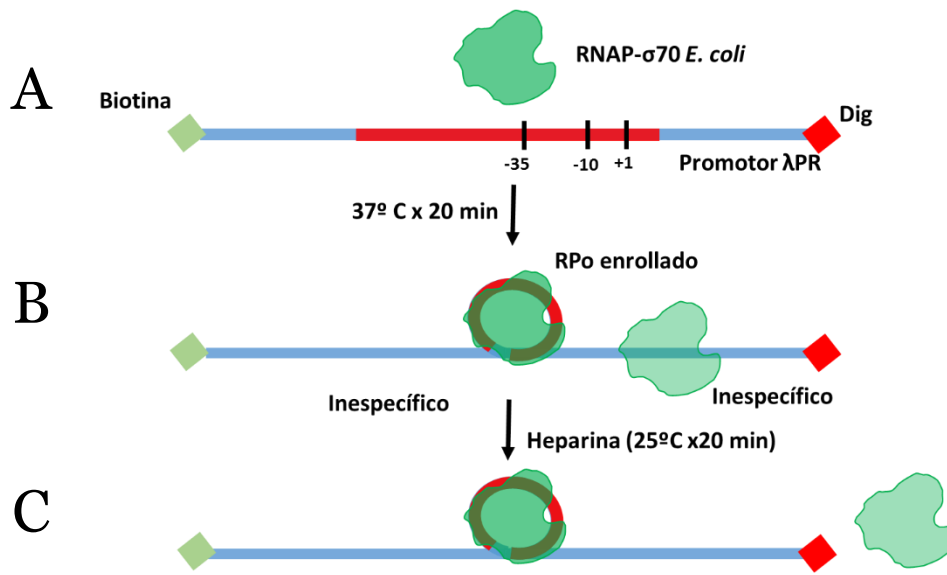


Figura 6: Pasos en la formación del complejo RPo. Como se observa, hay dos pasos: **A)** La incubación entre la RNAP de *E. coli* (sombra verde) y el DNA que contiene el promotor λ PR (línea roja); los extremos del DNA están marcados con Digoxigenina (rojo, derecho) y biotina (verde, izquierdo); **B)** Formación de complejos DNA-proteína específicos (unido al promotor) e inespecíficos; y **C)** Selección de complejos específicos RPo por adición del competidor heparina.

VI.5 Diseño de microfluídica

La cámara de microfluidos consta de dos capas externas de vidrio 24 mm x 60 mm x 0.2 mm, donde una de ellas contiene 6 agujeros hechos con láser. Estas láminas de vidrio encierran dos láminas de nescofilm (Figura 7A) entre las cuales se colocan la pipeta y los 3 dispensadores (Figura 7B). La pipeta se genera utilizando un sistema que, por medio de un aro caliente y la gravedad, agudiza la punta hasta lograr una luz de, aproximadamente 1 μ m. En el canal principal de la Figura 7B (central), se realizan los experimentos de transcripción de acuerdo a la geometría de la Figura 8. Los dispensadores agregan, al canal central, microesferas con RNAP-DNA, con

estreptavidina y NTPs. El sistema de microfluidos se completa colocando y asegurando las láminas ensambladas a una armazón de metal (41), ver Figura 7C y D.

VI.6 Geometría de experimento

Los complejos RPo enrollados, entre el promotor λ PR y la RNAP- σ 70 de *E. coli*, fueron capturados entre dos microesferas (esferas azules, Figura 8) que contienen anticuerpos anti-digoxigenina (anti-DIG) y estreptavidina. El DNA tiene una digoxigenina y biotina en los extremos (Figura 8) y estos interacciona con un anticuerpo anti-Dig inmovilizado en una bolita de 3.4 μ m y con la estreptavidina en una bolita de 2.1 μ m, respectivamente. La bolita de 3.4 μ m es capturada por el láser (trampa óptica) y la bolita 2.1 μ m, mediante presión negativa, por una pipeta (Li *et al.*, 2006; Mihardja *et al.*, 2006; Liphardt *et al.*, 2001; Cecconi *et al.*, 2005), ver Figura 8. La misma geometría se utilizó para todas las condiciones estudiadas.

A continuación se procedió a manipular el complejo DNA-proteína con los experimentos de *Force-ramp*. Como se observa, no se agregó la RNAP de *E. coli* en *trans*, ya que la formación del complejo RPo con el DNA capturado en las pinzas es muy difícil a 25° C (temperatura de trabajo del microscopio de pinzas ópticas). Los complejos RPo específicos fueron seleccionados con heparina y trabajando a temperatura ambiente. Es decir, se pre-incubó la proteína y el DNA antes de trabajar en el microscopio de pinzas ópticas; similar a Mihardja *et al.*, (2006). Este protocolo fue posible ya que el tiempo de vida media del complejo es de 6h a 25°C (Łyzen *et al.*, 2009).

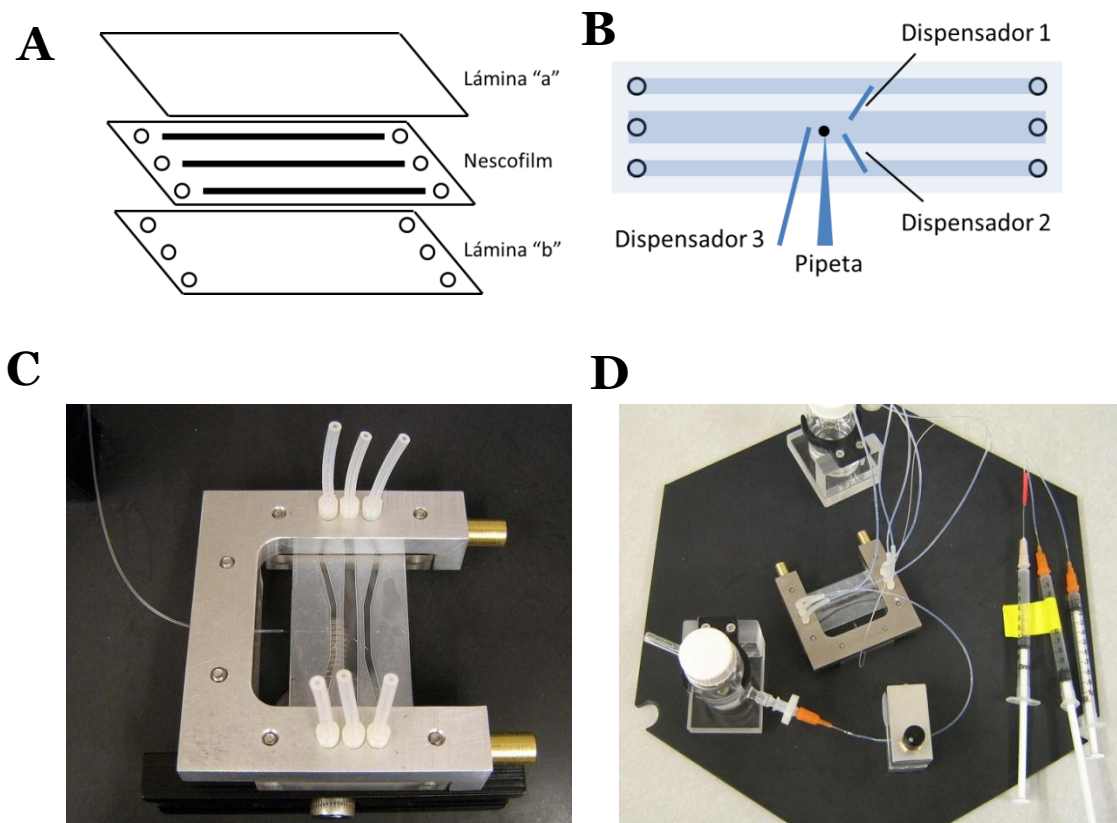


Figura 7. **A)** Imagen mostrando la forma de ensamblaje de la cámara de microfluidos. Las láminas a y b son de vidrio N°2, 25 x 60 mm (1 x 23/8"). El nescofilm tiene orificios y canales hechos con láser. Las láminas de vidrio sellan el nescofilm con la pipeta y dispensadores. **B)** Geometría de la disposición de pipeta y dispensadores. La micropipeta fija una bolita de poliestireno de 2.1 μm por presión negativa; mientras que los dispensadores 1, 2 y 3 adicionan, al canal central, bolita con anti-digoxigenina (2.1 μm), bolita con el DNA que contiene a la RNAP- σ 70 unida al promotor λ PR (3.4 μm), y otros factores como ppGpp, respectivamente. **C)** Armazón unido a las láminas ensambladas y con tubos de silicona, conectando los canales generados por el nescofilm, y **D)** Sistema completo de microfluidica, las jeringas contienen soluciones que son llevadas, mediante presión positiva, a los canales mostrados en B.

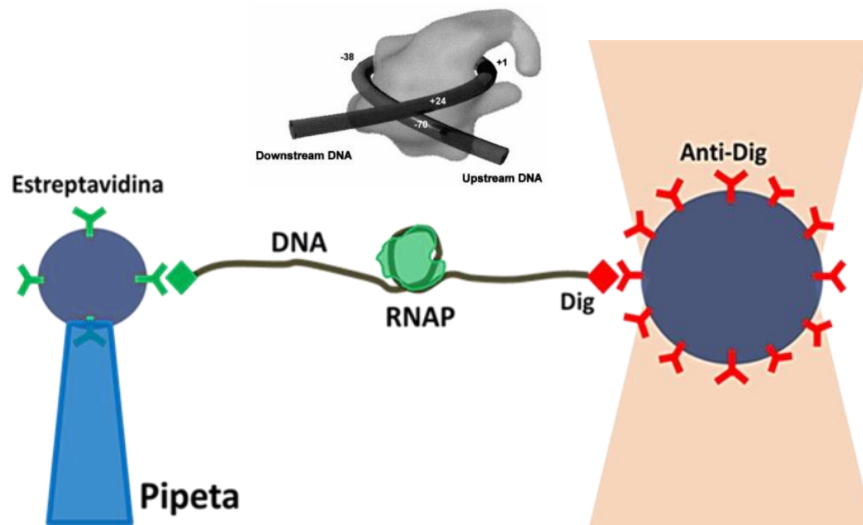


Figura 8: Geometría del experimento, se observa que el complejo enrollado es capturado a partir de los extremos del DNA por las modificaciones en el extremo 5´ y 3´ con biotina (rojo) y digoxigenina (verde), respectivamente. El extremo 5´ fue capturado por una bolita que tiene estreptavidina inmovilizada (rojo); mientras que el extremo 3´ será captura por otra bolita que tiene anti-digoxigenina inmovilizada (Verde). El extremo 3´ es manipulado por la trampa óptica, mediante estiramiento o relajación del complejo DNA-proteína (entre 4 y 15 pN de fuerza) con el protocolo *Force-ramp*.

VI.7 Análisis de datos

VI.7.1 Recuperación de datos: El instrumento usado fue una trampa óptica de doble laser *counterpropagating*, el cual es controlado por un piezoelectrico y deja una resolución menor a 0.5nm (Smith *et al.*, 2003). El movimiento del *light-lever* es usado para recuperar los datos de movimiento de la trampa; mientras que la detección del PSD (*position-sensitive photo-detector*), desviaciones de la microesfera del centro de

la trampa (J. Wen *et al.*, 2007, Manosas *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2006). Al iniciar cada experimento, se requiere manipular las microesferas hasta hallar un complejo entre ellas; durante esta búsqueda se registró los datos continuamente a una frecuencia relativamente baja, de 10 datos/s (10 Hz). Al hallar un complejo, todos los datos se recuperaron a 250 datos/s (0.25 kHz). Los datos fueron suavizados con una ventana de 4ms.

VI.7.2 Experimentos de gradiente de fuerza: También llamado *Force-ramp*, en estos se provocó el desenrollamiento y enrollamiento reversible de los complejos RPo mediante movimientos cíclicos de la trampa óptica entre 4 y 15pN a velocidad constante de 3pN/s.

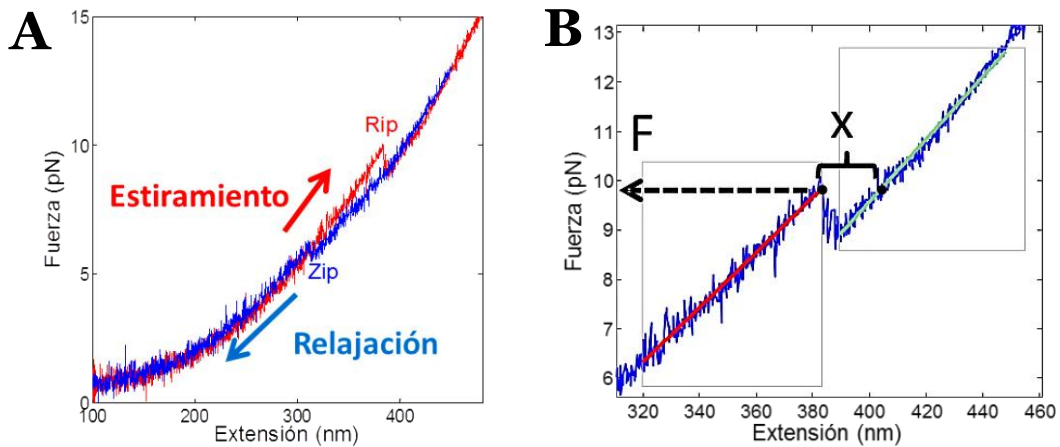


Figura 9: **A)** Traza representativa de estiramiento y relajación, se observan el cambio de extensión, *rip* y *zip*, respectivamente. El *rip* representa el evento de desenrollamiento, mientras que el *zip*, el enrollamiento; **B)** Ejemplo representativo del análisis de cada evento de cambio de extensión; cada *rip/zip* ocurre a una fuerza (F , pN) y cambio de extensión (x , nm). A partir de dichos datos, se podrá calcular el trabajo mecánico ($W = F \cdot x$) involucrado en el *rip/zip*.

VI.7.3 Distribución de fuerza vs extensión. Se realizó el experimento de perturbar al complejo enrollado con fuerzas entre 4 y 15 pN. Durante el experimento, se observarán eventos de desenrollamiento (rip) y enrollamiento (zip) que estarán representados con un cambio de extensión (x, nm) a una fuerza determinada (F, pN) (Figura 9). Se realizará el análisis de distribución de fuerza y extensión para determinar las propiedades mecánicas del complejo enrollado y, usando un análisis de dispersión de rips/zips (F vs x), la homogeneidad de las poblaciones. A partir de cada transición (rip o zip) se calculará el trabajo realizado como $w = \int_{x_1}^{x_2} F(x)dx$.

VI.7.4 Análisis de longitud de contorno (ΔL_c) del DNA enrollado. Para hallar la longitud de ADN involucrado en el enrollamiento, analizamos la extensión de cada rip/zip considerando dos correcciones importantes a partir de los datos colectados.

Primera corrección; para la estimación de la longitud de persistencia (P) del DNA: Cuando estiramos un DNA, la señal recolectada en el PSD (*position sensitive detector*) es la posición de la trampa óptica y no del DNA. Por lo tanto, antes de realizar el ajuste de una curva fuerza vs extensión de DNA a un modelo de polímeros, debemos extraer la distancia por desplazamiento de la microesfera del centro de la trampa. La fuerza que experimenta la microesfera es $F = \left. \frac{dV_b}{dx} \right|_{x=b}$, donde dV_b es la energía potencial de la microesfera a una distancia $x = b$ del centro de la trampa óptica. Sin embargo, podemos usar una aproximación donde, $V_b = \frac{1}{2}kx^2$, por lo tanto, $F = kx$, donde k es la constante del resorte de la trampa o *stiffness* (44). Una vez determinado

el *stiffness* de la trampa, se procedió corregir la contribución de x a la extensión del DNA (ver Apéndice para más detalle).

Las curvas de fuerza vs extensión del DNA fueron corregidas y ajustadas al modelo WLC (*worm like chain model*, modelo de la cadena vermiforme) (Smith *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996),

$$\frac{FP}{K_B T} = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c(DNA)} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c(DNA)}$$

Donde P es la longitud de persistencia (nm), $L_c(DNA)$ es la longitud del DNA que se está estirando (nm), x es el desplazamiento del polímero (nm) a una fuerza F determinada (pN). Conociendo la longitud de nuestro DNA ($L_c \sim 2024$ pb o 688nm) podemos extraer P para nuestras condiciones experimentales de TB40 1X (20mM Tris HCl, 40mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 8.0).

Segunda corrección, para estimar los cambios de extensión a fuerza cero o longitud de contorno. Ya que el cambios de extensión (Figura 9B) a diferentes fuerzas no involucra el mismo DNA enrollado a fuerza cero; se procedió a usar el gráfico de dispersión (F vs x) para todos los *rip* y *zip* de cada población estudiada. Posteriormente, se usó la longitud de persistencia P estimada en el paso anterior y ajustaron los datos del dispersión (F vs x) al WLC model para calcular la longitud de contorno del DNA involucrado en el desenrollamiento y enrollamiento, $\Delta L_c(rip)$ y $\Delta L_c(zip)$ respectivamente (ver en resultados, Figura 17 y 18).

VI.7.5 Análisis termodinámico: Se utilizó el teorema de fluctuación de Crooks (Collin *et al.*, 2005). De acuerdo al teorema, es posible calcular la diferencia de energía

libre, en el equilibrio, a partir experimentos fuera del equilibrio. Se determinó la distribución de probabilidad del trabajo de cada rip ($w_{w \rightarrow u}$) y zip ($w_{u \rightarrow w}$) y estos se ajustaron a una distribución normal,

$$P(w_{i \rightarrow j}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{w_{i \rightarrow j}}}} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{\langle w_{i \rightarrow j} \rangle - w_{i \rightarrow j}}{\sigma_{w_{i \rightarrow j}}}\right)^2\right\}$$

Donde $i \rightarrow j$ representa $w \rightarrow u$ o $u \rightarrow w$. Posteriormente, se utilizó la relación,

$$\frac{P(w_{w \rightarrow u})}{P(w_{u \rightarrow w})} = e^{-\left(\frac{\Delta G_{w \rightarrow u} - W}{K_B T}\right)}$$

Donde $\Delta G_{w \rightarrow u}$ es la diferencia de energía libre entre el estado enrollado y desenrollado a una fuerza determinada; K_B y T son la constante de Boltzmann y la temperatura (Kelvin), y $w_{w \rightarrow u}$ y $w_{u \rightarrow w}$ son el trabajo realizado en el rip o zip (pN.nm), respectivamente. Del teorema se observa que cuando las probabilidades son iguales $P(w_{w \rightarrow u}) = P(w_{u \rightarrow w})$, el trabajo realizado es igual a la diferencia de energía libre en el equilibrio, $\Delta G = w$ (Alemany *et al.*, 2011; Collin *et al.*, 2005). Aquí, cada $w_{i \rightarrow j}$ es un trabajo fuera del equilibrio o irreversible se compone de trabajo en el equilibrio o reversible (ΔG) y trabajo disipado $w_{i \rightarrow j}^{dis}$. De acuerdo a lo anterior podemos mencionar que (8), Gore *et al.*, 2003),

$$\langle w_{i \rightarrow j} \rangle = \Delta G + \langle w_{i \rightarrow j}^{dis} \rangle$$

Donde $\langle w_{i \rightarrow j}^{dis} \rangle$ es el trabajo disipado medio, y se cumple lo siguiente,

- ✓ Si $\langle w_{i \rightarrow j}^{dis} \rangle = 0K_B T$ el estiramiento/relajación ocurre en el equilibrio
- ✓ Si $\langle w_{i \rightarrow j}^{dis} \rangle \leq 6K_B T$ el estiramiento/relajación ocurre cercano al equilibrio.

- ✓ Si $\langle w_{i \rightarrow j}^{dis} \rangle \geq 60K_B T$ el estiramiento/relajación ocurre muy lejos del equilibrio.

El ΔG calculado corresponde a la diferencia de energía libre del rip/zip. Por lo tanto, ΔG tiene las siguientes contribuciones,

$$\Delta G_{w \rightarrow u} = \Delta G_{w \rightarrow u}^0 + W_{handle} + W_{complex}$$

Donde $W_h = W_{handle} + W_{complex}$; W_{handle} es la contribución entrópica de las mangas de DNA (*handles*, 643nm; 317 y 326nm para la *handle* derecha e izquierda, respectivamente) cuando se produce el cambio de extensión y reducción de la fuerza; $W_{complex}$ es la contribución entrópica de tener el complejo enrollado a una fuerza determinada; y $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ es la diferencia de energía libre a fuerza cero (Liphardt *et al.*, 2001; Manosas & Ritort, 2005), de manera que,

$$W_h = \{W(h_2, u) + W(h_1, u)\} - \{W(h_2, w) + W(h_1, w)\}$$

Donde $W(h_2, u)$ es el costo entrópico de la *handle* 2 (h_2) cuando el RPo se encuentra desenrollado (u); y $W(h_1, u)$ es el costo entrópico de la *handle* 1 (h_1) cuando el RPo se encuentra desenrollado (u). Mientras que $W(h_2, w)$ es el costo entrópico de la *handle* 2 (h_2) cuando el RPo se encuentra enrollado (w); y $W(h_1, w)$ es el costo entrópico de la *handle* 1 (h_1) cuando el RPo se encuentra enrollado (w). Todos estos componentes son definidos por,

$$W(h_2, u) = \int_0^{x_{h_2}(u)} F(L_c(x_{h_2}, u)) dx$$

$$W(h_1, u) = \int_0^{x_{h_1}(u)} F(L_c(x_{h_1}, u)) dx$$

$$W(h_2, w) = \int_0^{x_{h_2}(F)} F(L_c(x_{h_2}, w)) dx$$

$$W(h_1, w) = \int_0^{x_{h_1}(F)} F(L_c(x_{h_1}, w)) dx$$

Donde $F(L_c(x_{h_2}, u))$ es la fuerza generada al estirar la handle h_2 en un valor de x_{h_2} cuando el RPo se encuentra desenrollado (u); $F(L_c(x_{h_1}, u))$ es la fuerza generada por la handle h_1 cuando se estira x_{h_1} cuando el RPo se encuentra desenrollado (u); $F(L_c(x_{h_2}, w))$ es la fuerza generada por la handle h_2 cuando se estira x_{h_2} cuando el RPo se encuentra enrollado (w); y $F(L_c(x_{h_1}, w))$ es la fuerza generada por la handle h_1 cuando se estira x_{h_1} cuando el RPo se encuentra enrollado (w).

Finalmente, la corrección entrópica de ocurrencia del rip/zip del DNA enrollado alrededor de la RNAP es,

$$W_{complex} = \int_0^{x_{\Delta L_c}} F(x_{\Delta L_c}, \Delta L_c) dx$$

Donde $F(x_{\Delta L_c}, \Delta L_c)$ es la fuerza generada del DNA enrollado ΔL_c al ser estirado $x_{\Delta L_c}$ durante el rip. Los valores de $F(L_c(x_{h_2}, u))$, $F(L_c(x_{h_1}, u))$, $F(L_c(x_{h_2}, w))$, $F(L_c(x_{h_1}, w))$ y $F(x_{\Delta L_c}, \Delta L_c)$ se obtienen por el modelo WLC,

$$F(L_c(x_i, \theta)) = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x_i}{L_c(h_j, \theta)} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x_i}{L_c(h_j, \theta)}$$

Donde $i = \{h_1, h_2, \Delta L_c\}$, $\theta = \{w, u\}$ y $j = \{1, 2\}$. Para el caso particular, cuando $x_i = x_{\Delta L_c}$ se tendrá $L_c(h_j, \theta) = \Delta L_c$.

VII. RESULTADOS

VII.1 Producto de PCR y retención por *microesferas*:

Se obtuvo un producto de PCR de 2024 pb el cual contiene el promotor λ PR silvestre desde las posiciones -100 *upstream* hasta +30 *downstream* y modificaciones de biotina y digoxigenina en sus extremos. Este producto fue purificado mediante corte de gel de agarosa para obtener un DNA homogéneo para su posterior estudio en las pinzas ópticas (Figura 10A). Para verificar si el DNA purificado puede ser capturado por las *microesferas* con anti-digoxigenina, se realizó un ensayo de retención. Como se observa, con una incubación de 15 min y 20 min, el DNA es capturado y esto es dependiente de la concentración de *microesferas* (Figura 10B).

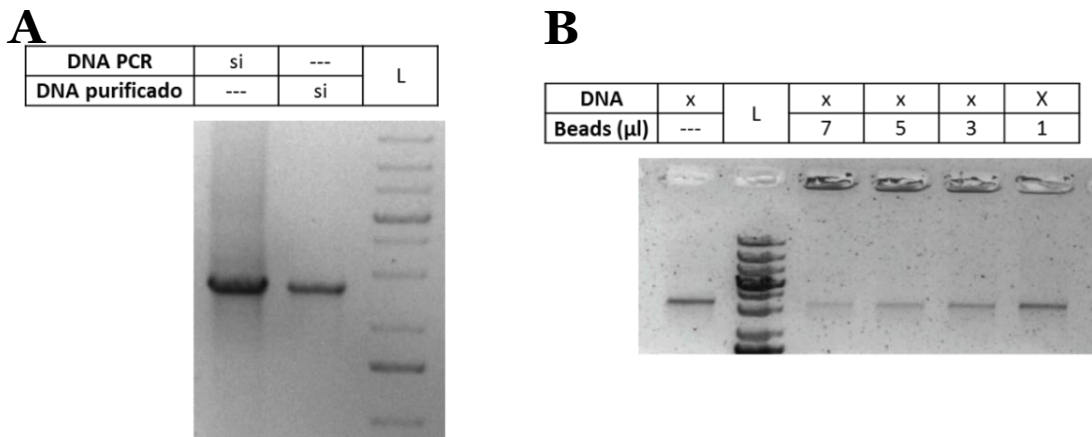


Figura 10: Ensayos en gels de agarosa, previos a la formación del complejo RPo enrollado y su estudio en el microscopio de pinzas ópticas. **A)** Purificación del producto de PCR por gel, **B)** retención del DNA por microesferas con anti-digoxigenina a 15 min de incubación.

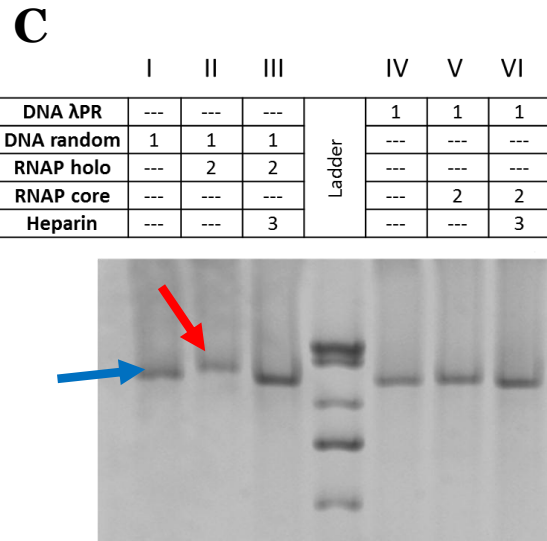
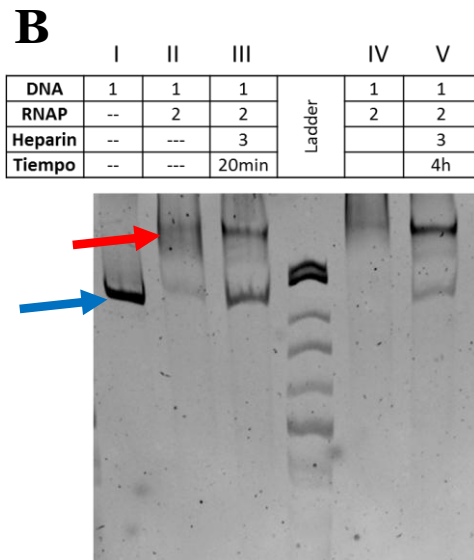
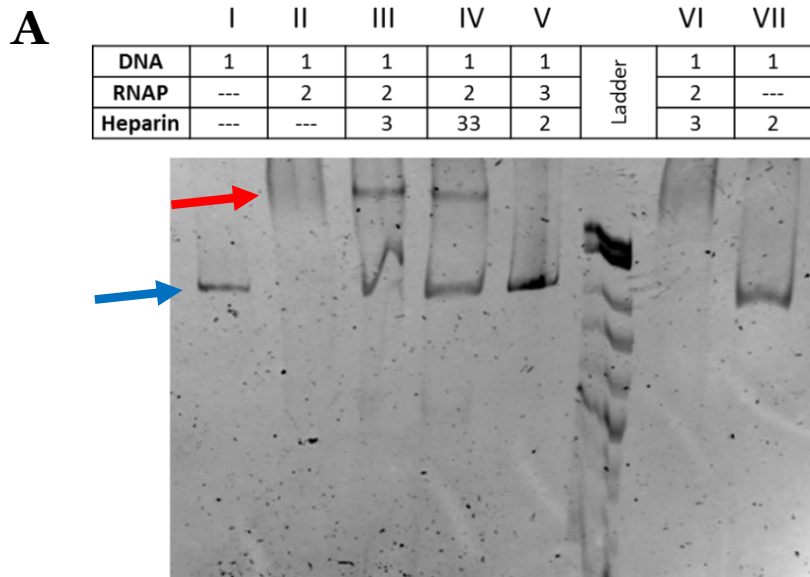


Figura 11: Ensayos EMSA en gels de poliacrilamida para verificar la formación de complejos DNA-proteína entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR (A), la estabilidad de los complejos en las condiciones ambientales de trabajo del microscopio de pinzas ópticas (B), y los controles usando un DNA aleatorio y RNAP sin factor sigma o core (C). La flecha roja indica los complejos DNA-proteína y la flecha azul, el DNA solo.

VII.2 Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)

Previo al microscopio de pinzas ópticas, se procedió a realizar ensayos en PAGE nativo que nos muestren la formación de complejos DNA-proteína entre la RNAP *E. coli* y el promotor λ PR. Como se observa en la figura 11A, en ausencia de heparina (carril II y VI) se forma un complejo DNA-proteína de diferentes tamaños ya que se observa una banda muy amplia; sin embargo, cuando se agrega heparina (200 $\mu\text{g/ml}$) gran parte de estos complejos inespecíficos se disocian y se observa una banda de DNA en ausencia de proteína (carril III); y la movilidad del DNA solo no se ve afectado (carril VII). Lo anterior nos indica que la banda superior en el carril III son los complejos DNA-proteína específicos; además, cuando la cantidad de heparina es duplicada (400 $\mu\text{g/ml}$), la banda de complejos específicos no se modifica.

Las condiciones de trabajo en el microscopio de pinzas ópticas son a temperatura ambiente y los complejos son estudiados uno por uno en el lapso de 3-4 horas. Por lo tanto, los complejos formados entre la RNAP *E. coli* y el promotor λ PR deben de ser lo suficientemente estables para poder capturarlos aun después de ese tiempo. Como se observa en la figura 11B (carril IV y V), los complejos específicos son estables a 25°C por 4 horas.

En la Figura 11C se observa que un DNA sin promotor forma complejos inespecíficos (carril II), pero cuando la heparina está presente (200 $\mu\text{g/ml}$) destruyen todo tipo de asociación dejando el DNA libre (carril III). Además, el carril V y VI muestran que la RNAP de *E. coli* sin el factor sigma 70 no puede formar complejos inespecíficos (carril V) ni específicos (carril VI).

VII.3 El enrollamiento de complejos RPo en pinzas ópticas:

Una vez formados los RPo enrollados, se procedió a llevarlos al microscopio de pinzas ópticas. Cuando una molécula de DNA fue capturada, se observó, en una gráfica de fuerza *vs* extensión (protocolo de *Force-ramp*), dos tipos de comportamiento; i) algunas se parecían a un DNA solo y ii) otras presentaban un cambio de extensión súbito (rip o zip) a una fuerza determinada (Figura 12A y B).

Estos cambios de extensión en el estiramiento (rip) y la relajación (zip) pueden corresponder a eventos de desenrollamiento y enrollamiento, del complejo enrollado entre el promotor λ PR silvestre y la RNAP- $\sigma 70$ de *E. coli* (Figura 12C y 13), respectivamente. Las moléculas que se estiraron y no mostraron transición o cambio súbito de extensión se identificaron como DNA libre de proteína. Para evaluar si las señales observadas (cambios de extensión) son dependientes de RNAP- $\sigma 70$, se realizaron los siguiente controles negativos: i) Se estiraron muchas moléculas de DNA, las cuales no fueron incubadas con proteína; y ii) Se pre-incubó el DNA con la heparina (200 μ g/ml) y luego se adicionó la enzima. Se estiraron ~ 120 moléculas de DNA bajo estas condiciones y no se observó ningún cambio de extensión, por lo tanto los rip/zip aparecen como dependiente de la RNAP.

Cada RPo que fue estirado y relajado por $\sim 5-30$ min; y cada ciclo presento un rip y zip, lo que quiere decir que el proceso es reversible en el intervalo de fuerzas aplicado (4 – 15pN), ver Figura 13. Esto indica que, a fuerzas <15 pN, aunque el ADN se halle probablemente muy estirado, se mantiene la interacción RNAP- $\sigma 70$ de *E. coli* con el promotor λ PR silvestre y mutante, y para todas las condiciones estudiadas.

Los experimentos se realizaron de manera semejante para todas las condiciones:

- i) λ PR silvestre a 50mM de KCl, ii) λ PR mutante a 50mM KCl, iii) λ PR silvestre a 100mM de KGluc, iv) λ PR silvestre a 300mM de KCl y v) λ PR silvestre a 100 μ M de ppGpp.

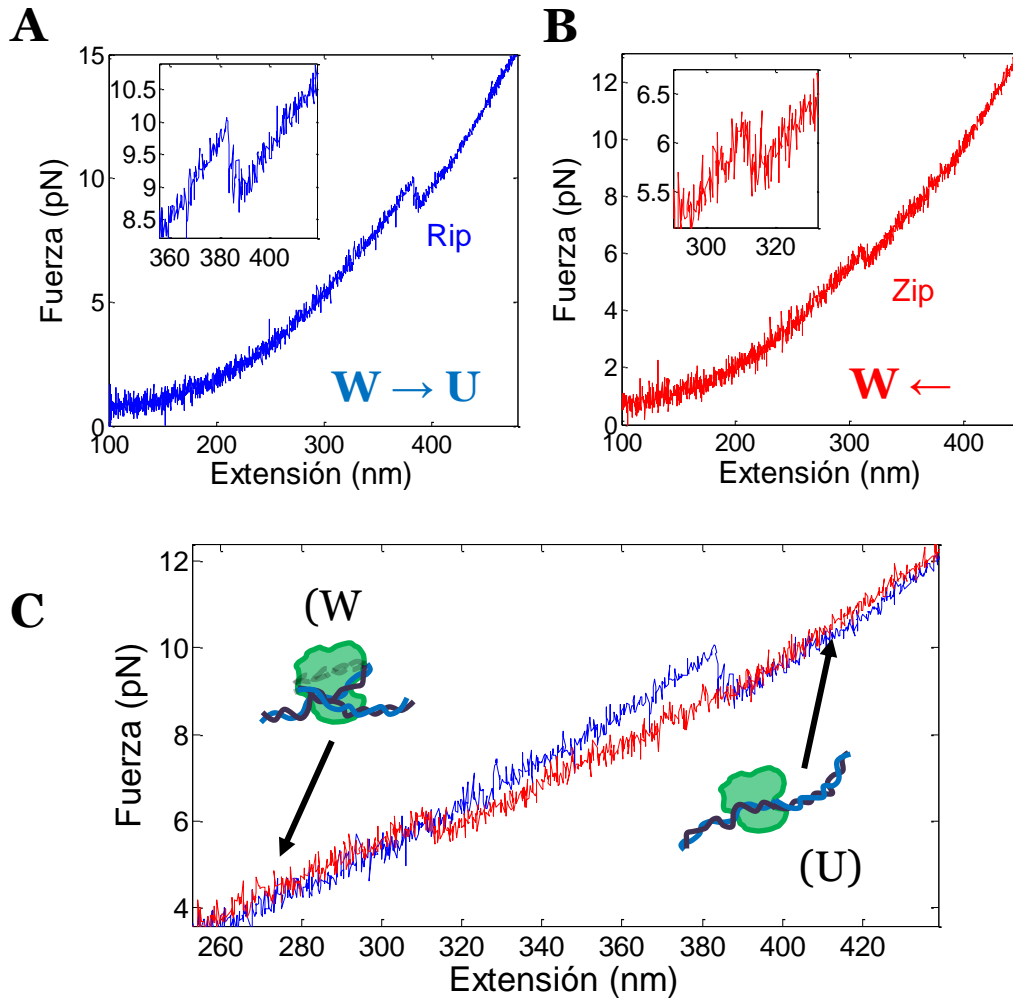


Figura 12: **A)** Estiramiento del RPO, se observa un rip que corresponde al desenrollamiento ($W \rightarrow U$) del DNA alrededor de la RNAP; **B)** relajación del RPO, se observa un zip que corresponde en enrollamiento ($U \rightarrow W$) del DNA alrededor de la RNAP; **C)** El estiramiento (curva azul) y relajación (curva roja) se muestran para un complejo RPO enrollado individual (experimento de *force-ramp*).

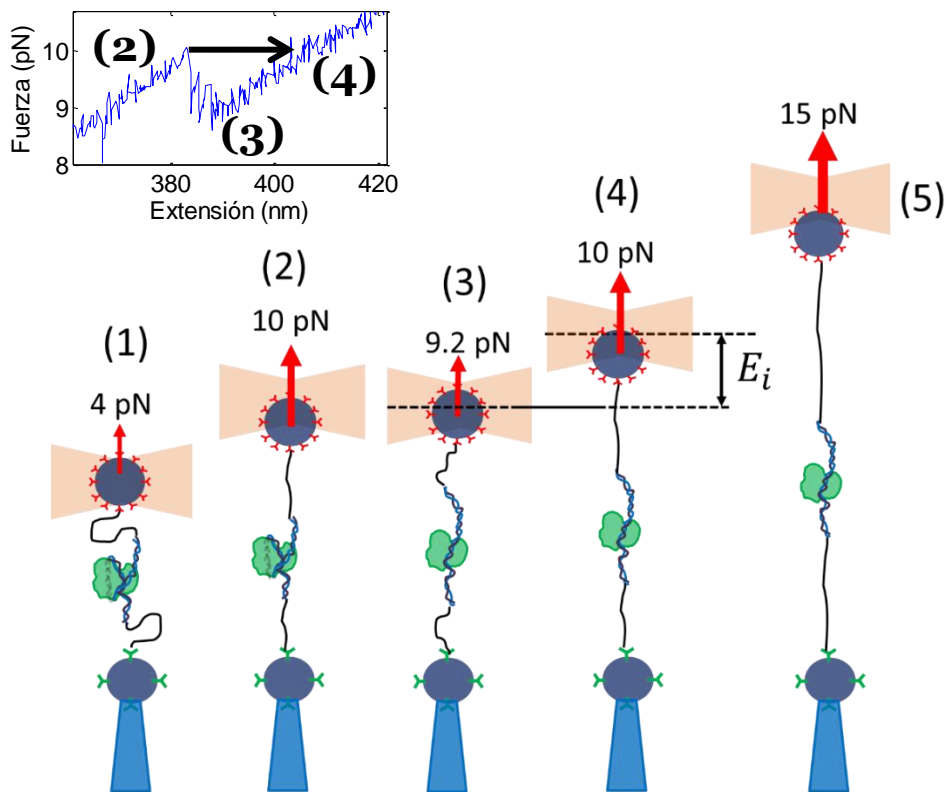


Figura 13: Esquema general del protocolo de *force-ramp*. Una vez capturado una molécula de DNA, este se procedió a estirar (1 → 5) y relajar (5 → 1) entre fuerza de 4-15pN. A continuación se resumen los eventos: (1) una molécula de DNA, que tiene la RNAP- σ 70 unida al promotor λ PR, se encuentra entre dos *microesferas* y se observa una tensión de 3pN por movimiento manual de la trampa óptica; (2) Este DNA es estirado a una velocidad constante de 3pN/s de forma automática, luego; (3) repentinamente, ocurre una caída de la fuerza, de 10 a 9.2 pN para este caso, debido al desenrollamiento del complejo RPo; (4) La trampa óptica se sigue moviendo hasta que llega a 10pN, provocándose un cambio de extensión, E_i donde $i = \text{rip}$ o zip , debido al DNA desenrollado; y (5) el complejo RPo desenrollado se tensa hasta una fuerza máxima de 15pN, momento en el que el desplazamiento de la trampa óptica se revierte de acuerdo al protocolo. Este proceso se repite muchas veces tanto en estiramiento o relajación. En el inserto se muestra la relación del proceso descrito y un rip experimental.

VII.4 Dos tipos de complejos RPo

Sorprendentemente, y en todas las condiciones, se identificó dos tipos de complejos RPo enrollados entre la RNAP de *E. coli* y el promotor λ PR. Un tipo de complejo, que será denominado Tipo 1, tiene dos transiciones (Figura 14A), una a baja fuerza y otra a alta fuerza que llamaremos transiciones tipo 1a y 1b, respectivamente; y el otro, que presenta una sola transición (Figura 14B) será llamado Tipo 2. Además, durante el experimento de *force-ramp*, cada complejo fue estirado y relajado por un tiempo prolongado (~5-30min), lo que involucra típicamente de 50 a 300 ciclos de estiramiento. Notablemente, el comportamiento de cada complejo (tipo 1 o 2) se mantuvo a lo largo del tiempo; la conversión de un tipo de complejo RPo en otro nunca ocurrió.

VII.5 Caracterización del complejo RPo enrollado

VII.5.1 Propiedades mecánicas. Se observó que el complejo enrollado RPo resiste fuerzas menores a 9 – 10 pN. Para la transición 1a, los complejos se desenrollan a una fuerza media $\langle F_{rip} \rangle = 8.0 \pm 0.1$ pN con un cambio de extensión de $\langle E_{rip} \rangle = 20.7 \pm 0.1$ nm; mientras que el enrollamiento ocurre a $\langle F_{zip} \rangle = 7.1 \pm 0.1$ pN y $\langle E_{zip} \rangle = 18.4 \pm 0.2$ nm (Figura 15A y 16A).

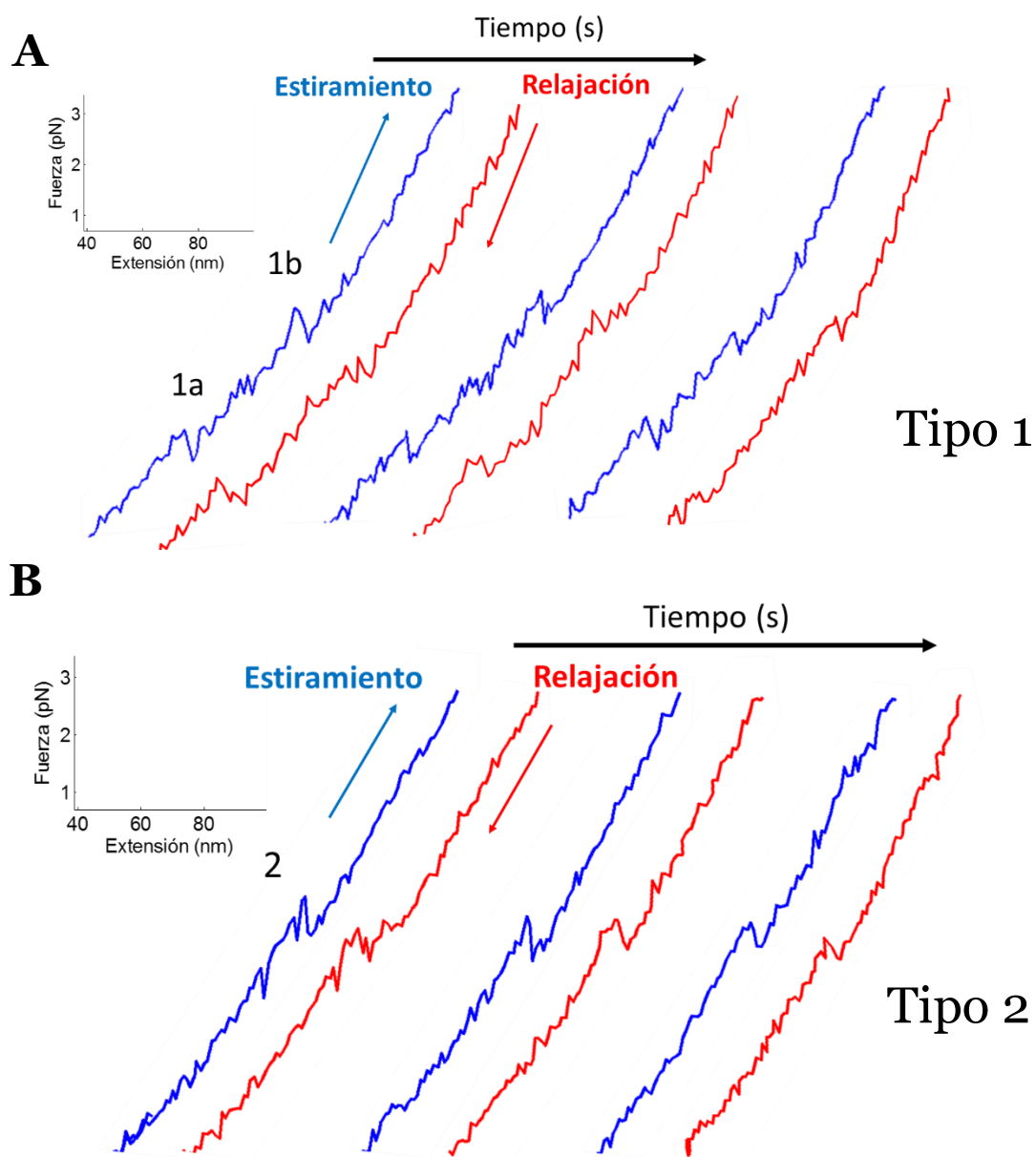


Figura 14: Trazas representativas de los dos tipos de complejos RPo enrollados, 1 y 2. Estos corresponden al promotor λ PR silvestre (-100/+30). Como se observa, el tipo 1 (A) presenta dos transiciones 1a y 1b, a bajas y altas fuerzas, respectivamente; mientras que el tipo 2 (B), solo una transición, la cual es muy parecida al tipo 1b. Además, cada tipo de complejo RPo enrollado fue estirado y relajado muchas veces en el experimento de *force-ramp*, entre 4-15pN de fuerza, y estas mantuvieron su identidad en el tiempo; es decir el tipo 1 nunca se convierte en 2, ni viceversa.

Para la transición 1b el rip y zip se solapan en fuerza y cambios de extensión para las condiciones experimentales (3pN/s de estiramiento y relajación en *force-ramp*); $\langle F_{rip} \rangle = 8.8 \pm 0.1$ pN y $\langle E_{rip} \rangle = 15.3 \pm 0.4$ nm para el desenrollamiento, y $\langle F_{zip} \rangle = 8.7 \pm 0.1$ pN y $\langle E_{zip} \rangle = 15.0 \pm 0.5$ nm para el enrollamiento. Para el caso de la transición tipo 2, el comportamiento es muy similar al tipo 1b; $\langle F_{rip} \rangle = 9.3 \pm 0.1$ pN y $\langle E_{rip} \rangle = 15.5 \pm 0.2$ nm para el desenrollamiento y $\langle F_{zip} \rangle = 9.0 \pm 0.1$ pN y $\langle E_{zip} \rangle = 15.1 \pm 0.1$ nm para el enrollamiento (Figura 15 y 16).

Como se observa, el comportamiento de la transición 2 es muy similar el tipo 1b, para el caso de los complejos formados entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR silvestre (-100/+30). Como se verá más adelante, esto se mantiene para las otras condiciones estudiadas. Debido a lo anterior, podemos mencionar que: i) el complejo RPo tipo 1 desenrolla en dos pasos, $Wab \rightarrow Wb \rightarrow U$ donde Wb es un intermediario y el proceso $Wb \rightarrow U$ es más rápido y más estable, mientras que $Wab \rightarrow Wb$ es el paso limitante; y ii) el complejo RPo tipo 2, se desenrolla en un solo paso, $Wb \rightarrow U$.

VII.5.2 Longitud de contorno (ΔL_c) del DNA enrollado. Un cambio de extensión a una fuerza determinada no equivale al DNA que participa en el enrollamiento de los complejos tipo 1 y 2, debido a que la extensión del ADN depende de la fuerza a la que está sometido. Se procedió a utilizar el modelo WLC de polímeros para estimar el cambio de extensión a fuerza cero o longitud de contorno ΔL_c a partir de los cambios de extensión vs la fuerza de los rips y zips (Figura 17 y 18).

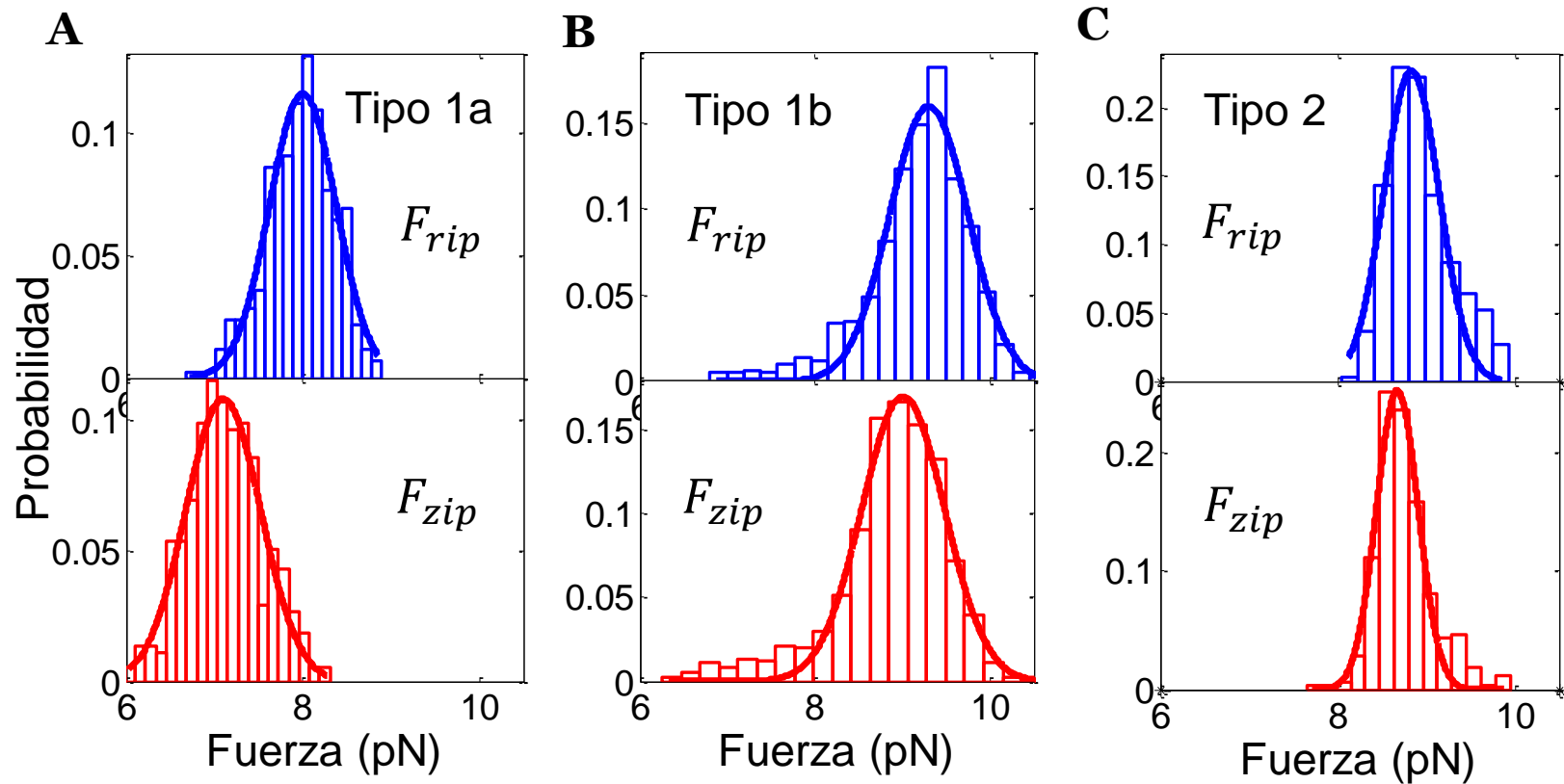


Figura 15: Distribución probabilidad de fuerza del desenrollamiento (rip, azul) y enrollamiento (zip, rojo) de las transiciones 1a (A), 1b (B) y 2 (C). Todos los gráficos se encuentra sobre una escala entre 6 y 10.5pN. Claramente se observa que la fuerza del rip es superior a la del zip, para el 1a (A); mientras que para el tipo 1b y 2 estos se solapan. Todas las distribuciones se ajustaron a la ecuación Gaussiana. Los valores de medias y desviaciones estandar pueden encontrarse en la Tabla 6.

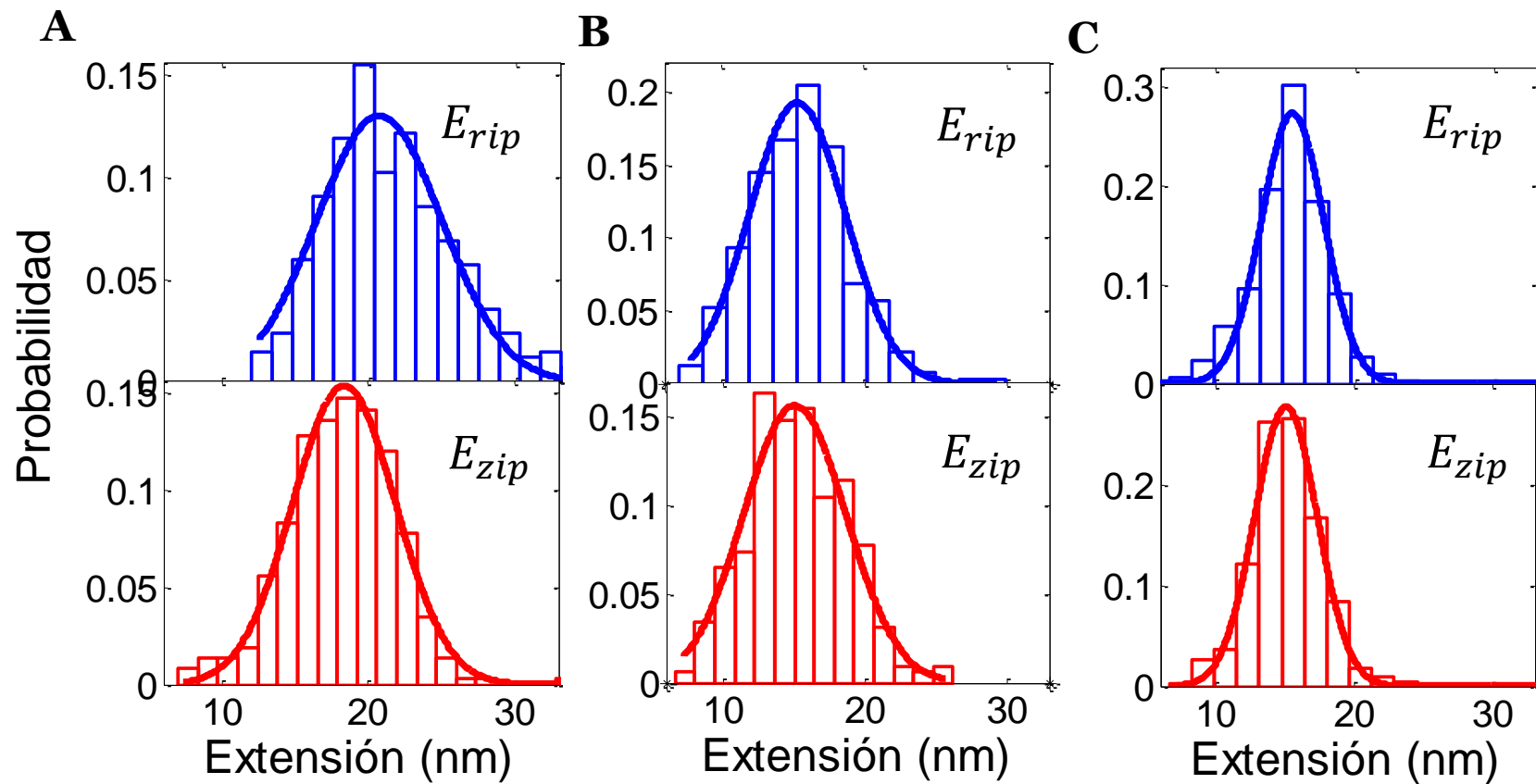


Figura 16: Distribución probabilidad de los cambios de extensión del desenrollamiento (rip, azul) y enrollamiento (zip, rojo) de las transiciones 1a (A), 1b (B) y 2 (C). Todos los gráficos se encuentra sobre una escala entre 6 y 33 nm. Claramente se observa que la extensión del rip es ligeramente mayor a la del zip, para el 1a (A); mientras que para el tipo 1b y 2 estos se solapan. Todas las distribuciones se ajustaron a la ecuación Gaussiana. Los valores de medias y desviaciones estandar pueden encontrarse en la Tabla 7.

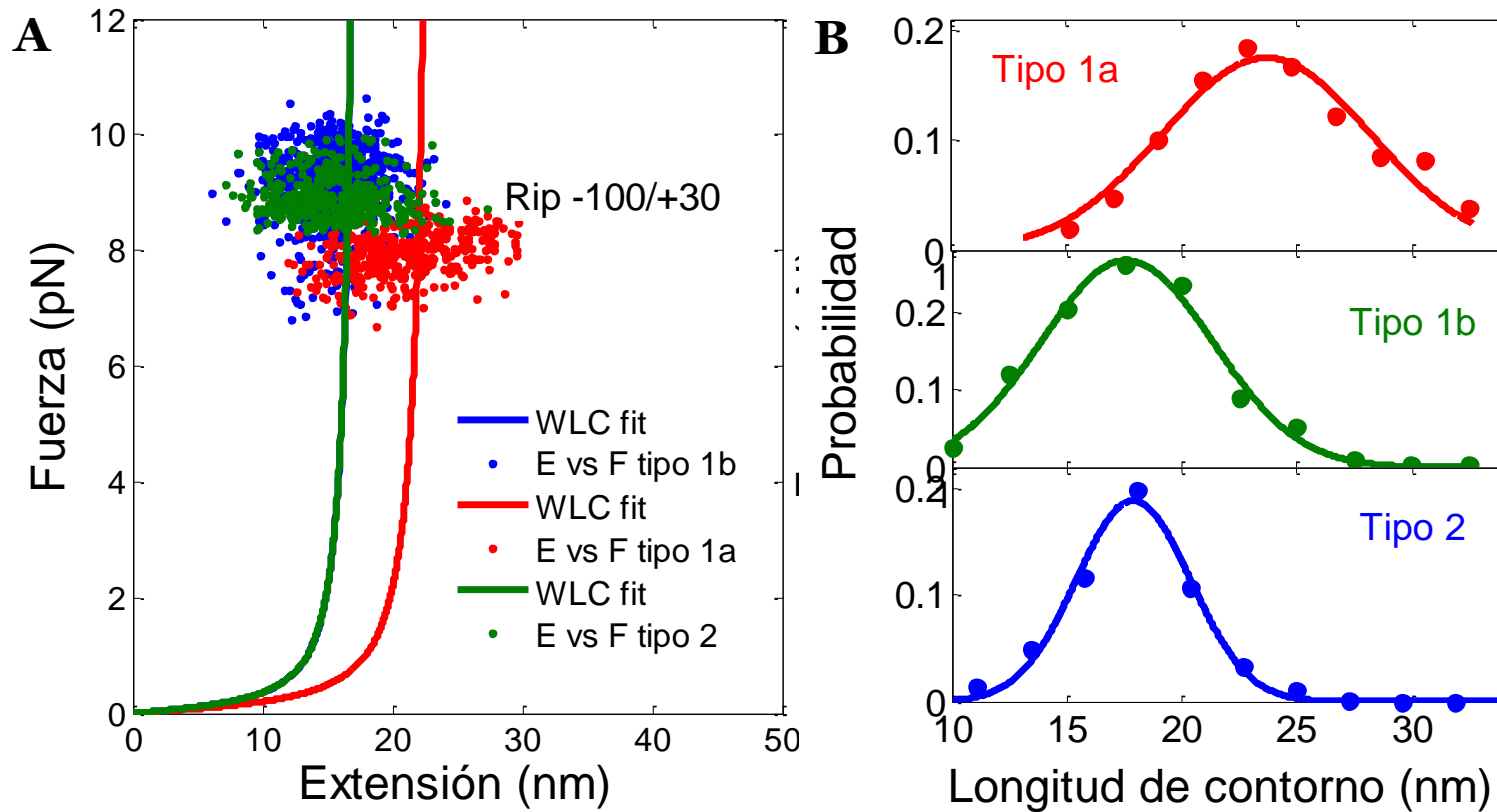


Figura 17: Gráficos de cambios de extensión vs fuerza de todos los rip (A) y la distribución de longitud de contorno estimada (B) para el complejo RPO 1, transiciones 1a (rojo) y 1b (verde), y del complejo RPO 2 (azul). Los puntos son los datos experimentales, mientras que la línea continua es el ajuste de los datos a la ecuación $F = \frac{K_B T}{P} \left\{ \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{\Delta L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{\Delta L_c} \right\}$ donde se ha utilizado una longitud de persistencia de $P = 20\text{nm}$ y $K_B T = 4.1 \text{ pN}\cdot\text{nm}$ para nuestras condiciones de trabajo (24°C); y donde F y x son los valores de fuerza y cambios de extensión de cada rip/zip. Como se observa, el único parámetro a estimar es ΔL_c ya que F y x son conocidos experimentalmente.

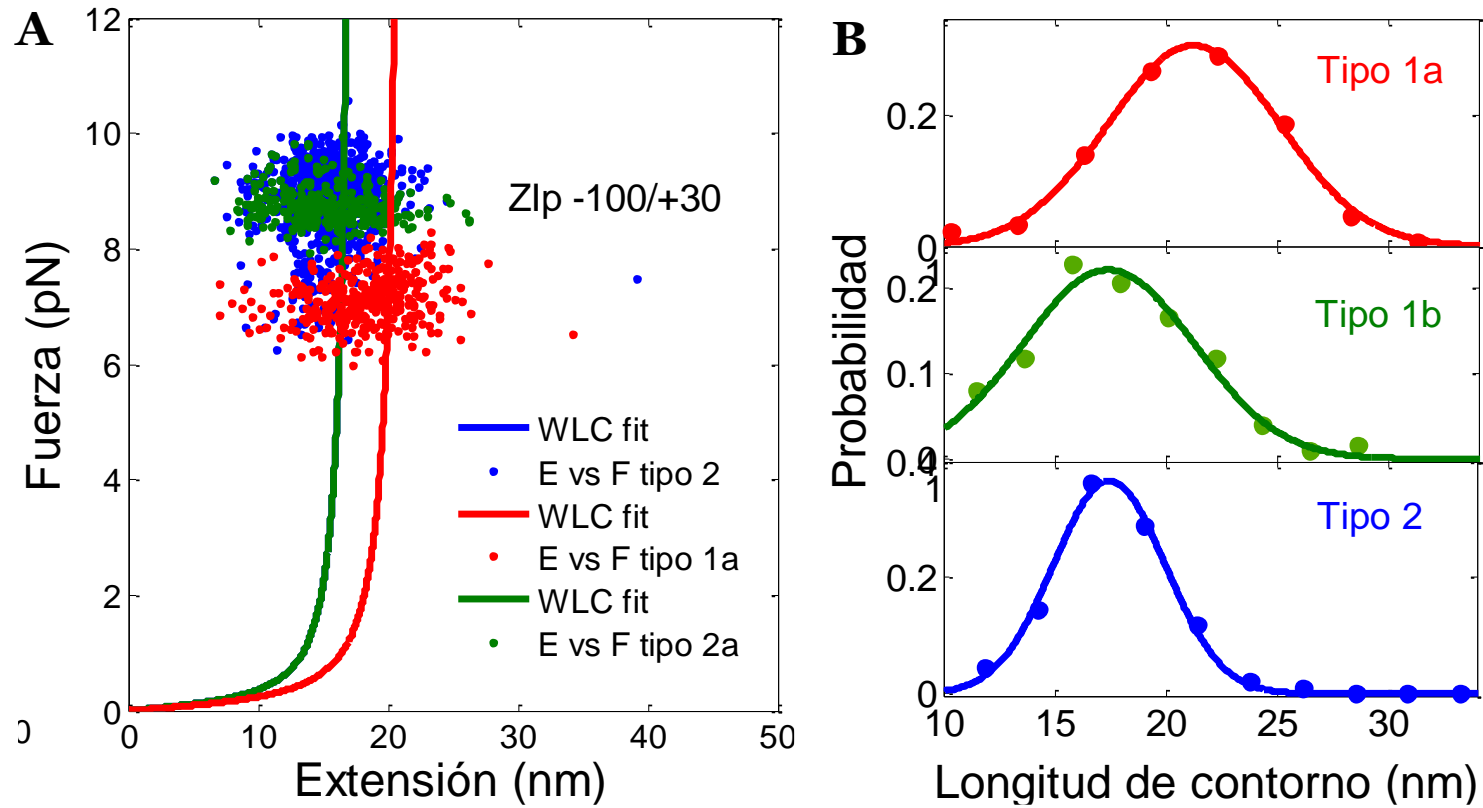


Figura 18: Gráficos de cambios de extensión vs fuerza de todos los zip (A) y la distribución de longitud de contorno estimada (B), para el complejo RPo 1, transiciones 1a (rojo) y 1b (verde), y del complejo RPo 2 (azul). Los puntos son los datos experimentales, mientras que la línea continua es el ajuste de los datos a la ecuación del modelo WLC, $F = \frac{K_B T}{P} \left\{ \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{\Delta L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{\Delta L_c} \right\}$, donde se ha utilizado una longitud de persistencia de $P = 20\text{nm}$ y $K_B T = 4.1 \text{ pN}\cdot\text{nm}$ para nuestras condiciones de trabajo (24°C); y donde F y x son los valores de fuerza y cambios de extensión de cada rip/zip. Como se observa, el único parámetro a estimar es ΔL_c ya que F y x son conocidos experimentalmente.

Para el caso de la transición 1a, se obtuvo una longitud de contorno de desenrollamiento $\Delta L_c(\text{rip}) = 70.6 \pm 2.1$ pb y de enrollamiento $\Delta L_c(\text{zip}) = 64.7 \pm 0.9$ pb. Sorprendentemente, la diferencia de longitud de contorno entre el desenrollamiento y enrollamiento es significativa, $\Delta\Delta L_c = 6.7 \pm 0.6$ (p-value = 0.000). Lo anterior nos indica que los eventos de zip no llegan a enrollar la misma longitud de ADN que es desenrollada por los rip. Es importante comprender que el trabajo de desenrollamiento o enrollamiento puede ser identificado gracias a que registra una transición súbita; si ocurriese de manera suave, se registraría solamente una sutil desviación en la curva fuerza-extensión y, una posible explicación, es que una fracción del enrollamiento ocurre de alguna forma no-cooperativa, probablemente antes de la transición, de manera que no puede ser detectada por el instrumento.

A diferencia de 1a, la transición 1b presenta $\Delta\Delta L_c = 0$ pb, por lo tanto, el trabajo del enrollamiento ocurre con la misma cooperatividad que el de desenrollamiento. Se obtuvo un $\Delta L_c(\text{rip}) = 52.9 \pm 1.5$ y $\Delta L_c(\text{zip}) = 52.9 \pm 1.5$ pb para desenrollamiento y enrollamiento, respectivamente. Tal como se mencionó, los cambios de extensión $\langle E_{\text{rip}} \rangle$ y $\langle E_{\text{zip}} \rangle$ son muy similares entre la transición 1b y 2, y lo mismo ocurre con sus respectivos cambios de longitud de contorno, para los que se obtuvo los valores de $\Delta L_c(\text{rip}) = 52.9 \pm 0.9$ y $\Delta L_c(\text{zip}) = 52.9 \pm 0.6$; además, debe notarse que al igual que el tipo 1b, la transición 2 recupera el enrollamiento en un proceso 100% cooperativo, ya que presenta un $\Delta\Delta L_c = 0$ pb.

Del análisis anterior, se desprende que los complejos RPo tipo 1 presentan dos transiciones, una desenrollando ~ 65 pb ($Wab \rightarrow Wb$) y otra ~ 50 pb ($Wb \rightarrow U$) dando un total de ~ 115 pb que se desenrollan de forma cooperativa. Además, en la relajación $Wb \rightarrow Wab$, ~ 7 pb se enrollan de forma no cooperativa ($Wb \rightarrow Wb'$); en cambio, el RPo tipo 2 presenta

solo una transición ($U \rightarrow Wb$) con ~ 50 pb de forma cooperativa (ver Figura 19 para más detalle en la descripción).

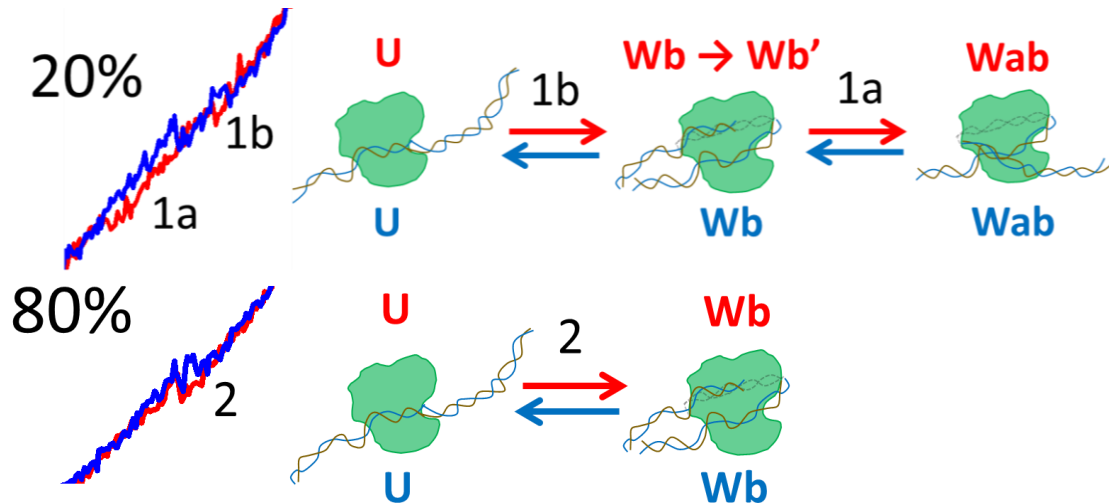


Figura 19: Descripción del desenrollamiento durante el estiramiento (curva azul en traza representativa) y del enrollamiento durante la relajación (curva roja en traza representativa) del complejo RPo enrollado entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR. En la parte superior se explica los eventos del RPo tipo 1, donde: i) la transición a baja fuerza (1a) involucra el enrollamiento $Wb \rightarrow Wb' \rightarrow Wab$ donde $Wb \rightarrow Wb'$ es de forma no-cooperativa y $Wb' \rightarrow Wab$ de forma cooperativa, y el desenrollamiento cooperativo $Wab \rightarrow Wb$; y ii) la transición a alta fuerza (1b) involucra el enrollamiento $U \rightarrow Wb$ y el desenrollamiento $Wb \rightarrow U$ ambos totalmente cooperativos. En la parte inferior se explica el evento del RPo tipo 2, donde se observa el enrollamiento $U \rightarrow Wb$ y el desenrollamiento $Wb \rightarrow U$ ambos totalmente cooperativos. En la parte izquierda se observa que los RPo 1 y 2 representan el ~ 20 y 80% de toda la población de complejos RPo enrollados

VII.5.3 Termodinámica del enrollamiento. Todas las distribuciones de probabilidad de trabajo de rip y zip, desenrollamiento y enrollamiento respectivamente, fueron ajustados a una distribución normal ($R^2 > 0.9$) y, para todos los casos, estas se intersectan (transición 1a), o se superponen (1b y 2) (Figura 20). Usando el teorema de fluctuación de Crooks fue posible determinar el trabajo reversible ($\Delta G_{u \rightarrow w}$) para todas las transiciones.

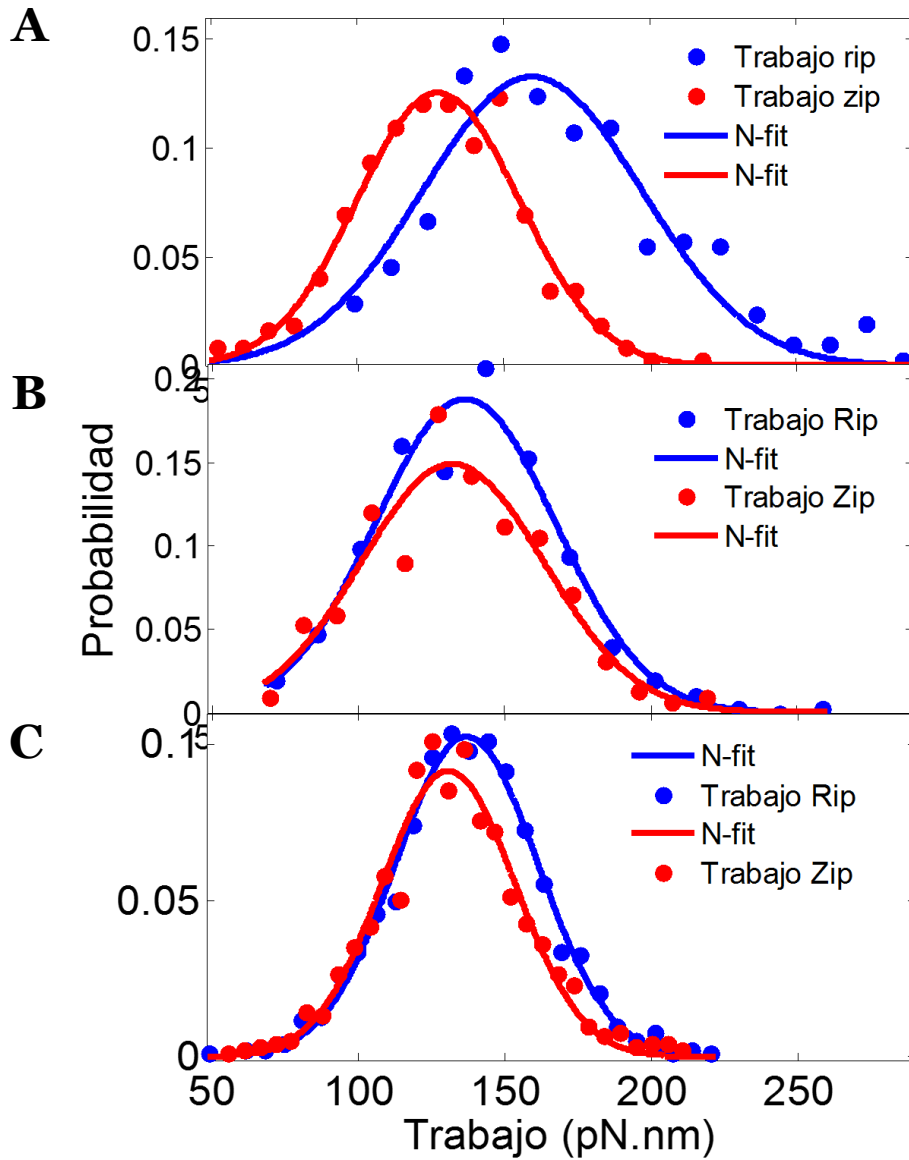


Figura 20: Distribución de trabajo del rip (azul) y zip (rojo), desenrollamiento ($w_{w \rightarrow u}$) y enrollamiento ($w_{u \rightarrow w}$), respectivamente. Los puntos son los datos experimentales y la curva continua el ajuste a la curva Gaussiana. **A)** Transición tipo 1a, las distribuciones se intersectan, y el trabajo de intersección equivale al trabajo reversible o diferencia de energía libre; ya que, de acuerdo al teorema de fluctuación de Crooks, $\frac{P(w_{w \rightarrow u})}{P(w_{u \rightarrow w})} = e^{-\left(\frac{\Delta G - W}{k_B T}\right)}$, cuando $P(w_{w \rightarrow u}) = P(w_{u \rightarrow w})$, se cumple que $\Delta G = W$; **B y C)** Transición tipo 1b y 2, las distribuciones de trabajo se superponen, por lo que para estos casos el trabajo es de tipo reversible o muy cerca del equilibrio a las condiciones experimentales (3pN/s de perturbación).

Para el caso de la transición 1a ($Wab \rightarrow Wb$), se obtuvo un $\Delta G_{w \rightarrow u}$ de ~ 131 pN.nm (figura 20A, intersección de distribución de probabilidades). Como se mencionó en los materiales y métodos, este valor no equivale a la diferencia de energía libre a fuerza cero, ya que la transición ocurre a una fuerza determinada, que restringe los movimientos del ADN y, por lo tanto, implica un costo entrópico (Liphardt *et al.*, 2001; Manosas & Ritort, 2005) que en este caso correspondería al complejo enrollado y del DNA que rodea al promotor (~ 643 nm). Restando las dos contribuciones anteriores (47.5 pN.nm) se obtiene una diferencia de energía libre de desenrollamiento a fuerza cero de $\Delta G_{w \rightarrow u}^0 \sim 92$ pN.nm o $\sim 22 K_B T$ lo cual corresponde a una constante de equilibrio de $\sim 3.5 \times 10^9$ para $Wab \rightarrow Wb$.

Para las transiciones 1b y 2 las distribuciones de trabajo están aproximadamente superpuestas (Figura 20B y C), debido a esto, se procedió a promediar el valor de los trabajos medios para calcular el trabajo reversible. Restando las contribuciones entrópicas, 36.9 y 37.6 pN.nm; se obtuvo un $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ de ~ 97 y 92 pN.nm o ~ 24 y $23 K_B T$ para 1b y 2, respectivamente. Estos valores corresponden a constantes de equilibrio de 19.6×10^9 y 5.9×10^9 para 1b y 2, respectivamente. Esto apoya la hipótesis que las transiciones 1b y 2 son el mismo proceso $Wb \rightarrow U$ (Figura 19) ya que coinciden en su termodinámica y propiedades mecánicas.

De lo mencionado arriba, se concluye que: el complejo enrollado RPo tipo 1 presenta dos transiciones, donde el desenrollamiento sigue la vía $Wab \rightarrow Wb \rightarrow U$, con diferencias de energía de $\Delta G_{Wb \rightarrow U}^0 \sim 92$ y $\Delta G_{Wab \rightarrow Wb}^0 \sim 97$ pN.nm dando un total de ~ 189 pN.nm, o $\sim 46 K_B T$ (27.6 Kcal/mol a 25°C). Mientras que el complejo RPo tipo 2, presenta una única transición $Wb \rightarrow U$ con $\Delta G_{Wb \rightarrow U}^0 \sim 23 K_B T$ (14 Kcal/mol a 25°C).

VII.6 Modulación del enrollamiento por cambio de secuencia y fuerza iónica

Para comprobar que las señales observadas, *rip* o *zip* (Figura 12) corresponden efectivamente a la asociación/disociación del ADN enrollado en complejos RPo, se procedió a: i) Modificar la secuencia del promotor silvestre λ PR (-100/+30), específicamente el tercer motivo rico en AT, conocido por su importancia en enrollamiento (Mangiarotti *et al.*, 2009), por una secuencia aleatoria en la región *upstream* del promotor entre -75 y -10 (-75/+30); ii) Reemplazar el anión cloro (Cl⁻) por glutamato (Glu⁻), que principalmente afecta a la región *downstream* del promotor λ PR en interacción con el jaw/clamp de la RNAP (Kontur *et al.*, 2010); e iii) Incrementar la fuerza iónica de 50 a 300mM de KCl, que reduciría la estabilidad del complejo RPo (Roe & Record, 1985) con un efecto tanto a la región *upstream* como *downstream* (Figura 21).

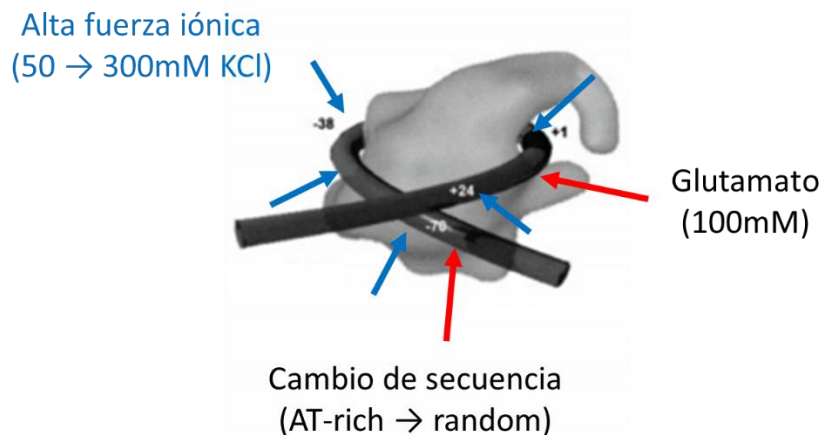


Figura 21: Esquema que muestra el principal efecto del cambio de secuencia, de una región *AT-rich* a *random*, el uso de glutamato y el aumento de la fuerza iónica en el complejo enrollado RPo entre RNAP- σ 70 y el promotor λ PR. Modelo tomado de Rivetti *et al.*, 1999.

Todo lo anterior fue realizado con el objetivo de observar cambios esperados como lo mencionan los estudios cinéticos de formación del complejo RPo entre la RNAP- σ 70 de *E. coli* y el promotor λ PR, y estudios estructurales de AFM. Como se verá más adelante, el comportamiento de las señales observadas corresponden al complejo RPo. Además, gracias a esto, fue posible estudiar, con un detalle termodinámico y mecánico nunca antes alcanzado, cómo la dinámica de la interacción DNA-proteína es modificada por diversos factores.

VII.6.1 Cambios en las propiedades mecánicas. Todas las condiciones estudiadas aumentan la fuerza mecánica del desenrollamiento y enrollamiento. Además, este aumento va acompañado por el incremento en el cambio de extensión por el reemplazo de Cl^- por Glu^- y de la secuencia del promotor λ PR en los complejos RPo enrollados (Figura 22A y B). Sin embargo, esto no se observa por aumento de la fuerza iónica, ya que el cambio de extensión se reduce; y esto es más acentuado para la transición 2 ($Wb \rightarrow U$); de 15.1 ± 0.1 a 12.5 ± 0.2 nm (Figura 22, Tabla 6 y 7). Como se mencionó, los cambios de extensión observados (Tabla 7), no corresponde al DNA enrollado alrededor de la RNAP ya que estos ocurren a una fuerza determinada y la relación entre ellas va de acuerdo al modelo WLC.

Como se verá más adelante, la respuesta de la transición 1b y 2 ($Wb \rightarrow U$) es muy similar para todas las condiciones estudiadas; por ejemplo, la fuerza del rip o zip aumentan ~ 2 pN para ambos casos y transiciones (Figura 22). Esto también ocurre por efecto del aumento de la fuerza iónica; $\langle F_r \rangle$ y $\langle F_z \rangle$ aumentan de ~ 9 a 10 pN (~ 1 pN adicional) para el tipo 2; algo similar también se observa para $\langle F_z \rangle$, ver Tabla 6.

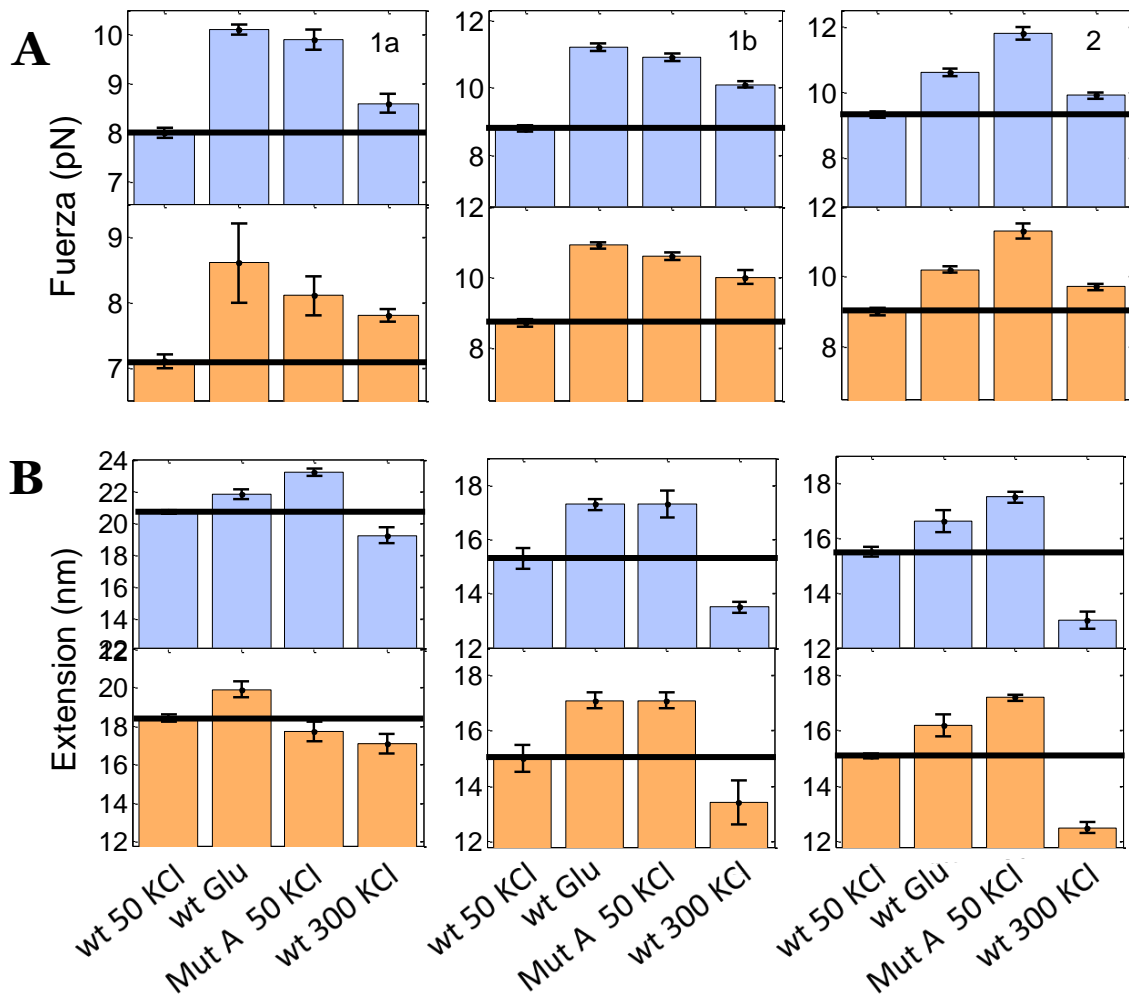


Figura 22: Efecto del cambio de secuencia (mut A 50 KCl), glutamato a 100mM (wt Glu) y alta fuerza iónica a 300mM KCl (wt 300 KCl) en la fuerza (A, pN) y cambios de extensión (B, nm) de los rip (azul) y zip (naranja). Como se observa, todas las condiciones incrementan la fuerza (A, rojo y azul). Además, tanto el Glu como el cambio de secuencia inducen un aparente incremento en cambios de extensión; mientras que a 300mM de KCl, este se reduce. La línea negra indica el valor para la condición de 50mM KCl con el λ PR silvestre.

Tabla 6: Resumen de los valores de fuerza de rips/zip para todas las condiciones estudiadas

Promotor	C	type	n%	$\langle F_r \rangle$ (pN)	SD_{F_r}	R^2 (r)	$\langle F_z \rangle$ (pN)	SD_{F_z}	R^2 (z)	N	T ⁺⁺⁺
λ PR wt (-100/+30)	50mM KCl	1a	20	8.0 ± 0.1	0.5	0.94	7.1 ± 0.1	0.6	0.92	419	6
		1b		8.8 ± 0.1	0.4	0.93	8.7 ± 0.1	0.3	0.93	405	
		2	80	9.3 ± 0.1	0.6	0.96	9.0 ± 0.1	0.7	0.98	920	23
λ PR mut A (-75/+30)	50mM KCl	1a	25	9.9 ± 0.2	1.1	0.84	8.1 ± 0.3	1.3	0.87	124	3
		1b		10.9 ± 0.1	0.9	0.98	10.6 ± 0.1	0.7	0.90	125	
		2	75	11.8 ± 0.2	1.1	0.86	11.3 ± 0.2	1.1	0.86	246	9
λ PR wt (-100/+30)	100mM KGlu	1a	30	10.1 ± 0.1	0.6	0.97	8.6 ± 0.6	1.0	0.95	376	7
		1b		11.2 ± 0.1	0.5	0.98	10.9 ± 0.1	0.5	0.99	370	
		2	70	10.6 ± 0.1	1.1	0.96	10.2 ± 0.1	0.9	0.91	812	18
	300mM KCl	1a	70	8.6 ± 0.2	0.8	0.92	7.8 ± 0.1	1.0	0.96	218	10
		1b		10.1 ± 0.1	0.8	0.91	10.0 ± 0.2	0.8	0.93	217	
		2	30	9.9 ± 0.1	0.5	0.99	9.7 ± 0.1	0.5	0.97	293	5

* R-sq del ajuste de la distribución de cambio de extensión del rip (E_r).

** R-sq del ajuste de la distribución de cambio de extensión del zip (E_z).

*** N: número total de trazas obtenidas por cada tipo de transición y condición.

+ Condición estudiada.

++ % de complejo tipo 1 y 2 para cada condición estudiada.

+++ T: total de complejos RPo enrollados.

Tabla 7: Resumen de los valores de cambios de extensión de rips/zip para todas las condiciones estudiadas

Promotor	C ⁺	type	n ⁺⁺	$\langle E_r \rangle$ (pN)	SD_{E_r}	R^{2*}	$\langle E_z \rangle$ (pN)	SD_{E_z}	R^{2**}	N ^{***}	T ⁺⁺⁺
λ PR wt (-100/+30)	50mM KCl	1a	20	20.7 ± 0.1	6.0	0.94	18.4 ± 0.2	4.9	0.99	419	6
		1b		15.3 ± 0.4	4.7	0.95	15.0 ± 0.5	4.9	0.91	405	
		2	80	15.5 ± 0.2	3.2	0.98	15.1 ± 0.1	3.2	0.99	920	23
λ PR mut A (-75/+30)	50mM KCl	1a	25	23.2 ± 0.2	2.8	0.98	17.7 ± 0.5	3.4	0.91	124	3
		1b		17.3 ± 0.5	2.9	0.90	17.1 ± 0.3	2.1	0.94	125	
		2	75	17.5 ± 0.2	1.9	0.96	17.2 ± 0.1	1.7	0.95	246	9
λ PR wt (-100/+30)	100mM KGlu	1a	30	21.8 ± 0.3	3.3	0.96	19.9 ± 0.4	3.9	0.96	376	7
		1b		17.3 ± 0.2	3.2	0.99	17.1 ± 0.3	3.0	0.96	370	
		2	70	16.6 ± 0.4	3.6	0.95	16.2 ± 0.4	3.5	0.96	812	18
	300mM KCl	1a	70	19.2 ± 0.5	3.5	0.96	17.1 ± 0.5	3.0	0.95	218	10
		1b		13.5 ± 0.2	2.1	0.98	13.4 ± 0.8	2.8	0.92	217	
		2	30	13.0 ± 0.3	2.6	0.96	12.5 ± 0.2	2.4	0.98	293	5

* R-sq del ajuste de la distribución de cambio de extensión del rip (E_r).

** R-sq del ajuste de la distribución de cambio de extensión del zip (E_z).

*** N: número total de trazas obtenidas por cada tipo de transición y condición.

+ Condición estudiada.

++ % de complejo tipo 1 y 2 para cada condición estudiada.

+++ T: total de complejos RPo enrollados.

VII.6.2 Efecto en la longitud del DNA en interacción. Usando el modelo WLC para los datos de cambios de extensión y fuerza, fue posible estimar los cambios de extensión a fuerza cero o longitud de contorno (ΔL_c) para el desenrollamiento (rip, $Wab \rightarrow Wb \rightarrow U$) y enrollamiento (zip, $U \rightarrow Wb \rightarrow Wb' \rightarrow Wab$).

La transición $Wb \rightarrow U$, del complejo RPo tipo 1 (1b) y 2, se desenrollan ~52 pb de DNA; lo cual no es modificado por efecto del cambio de secuencia. Para la transición $Wab \rightarrow Wb$ (1a), se observa un desenrollamiento de ~70 pb, pero tan solo 64pb de enrollamiento ($Wb' \rightarrow Wab$) para el promotor silvestre; mientras que la secuencia mutante produce cambios de ~73 y 58 pb de desenrollamiento y enrollamiento, respectivamente (Tabla 8). Por lo anterior, se estima un total de ~120pb DNA enrollado en el RPo tipo 1 y ~52pb en el RPo tipo 2. Sorprendentemente, la no-cooperatividad, medida por $\Delta\Delta L_c$, aumenta de ~7 a 15 pb por el cambio de secuencia en el promotor λ PR (Figura 23B). En otras palabras, el principal cambio del reemplazo de secuencias *AT-rich* por aleatorias, en la región *upstream* del promotor λ PR, es el aumento de la no-cooperatividad ($Wb \rightarrow Wb'$) en ~2 veces para la transición 1a del complejo RPo 1.

A diferencia del cambio de secuencia, el efecto del cambio de Cl^- por Glu^- y alta fuerza iónica de KCl modifican la cantidad de DNA involucrado en el desenrollamiento y enrollamiento del complejo RPo 1 de ~120 y 110pb a ~130 y 120pb para el caso del 100mM Glu^- y ~110 y 100pb a 300mM de KCl, respectivamente (Figura 23A, Tabla 8). Es decir, el Glutamato estimula el aumento del DNA involucrado en el enrollamiento; mientras que la alta fuerza iónica, lo reduce. Contrariamente, a 300mM de KCl y 100mM de $KGlu^-$ no modifican la cooperatividad de la transición 2, $Wb \rightarrow U$ (Figura 23B).

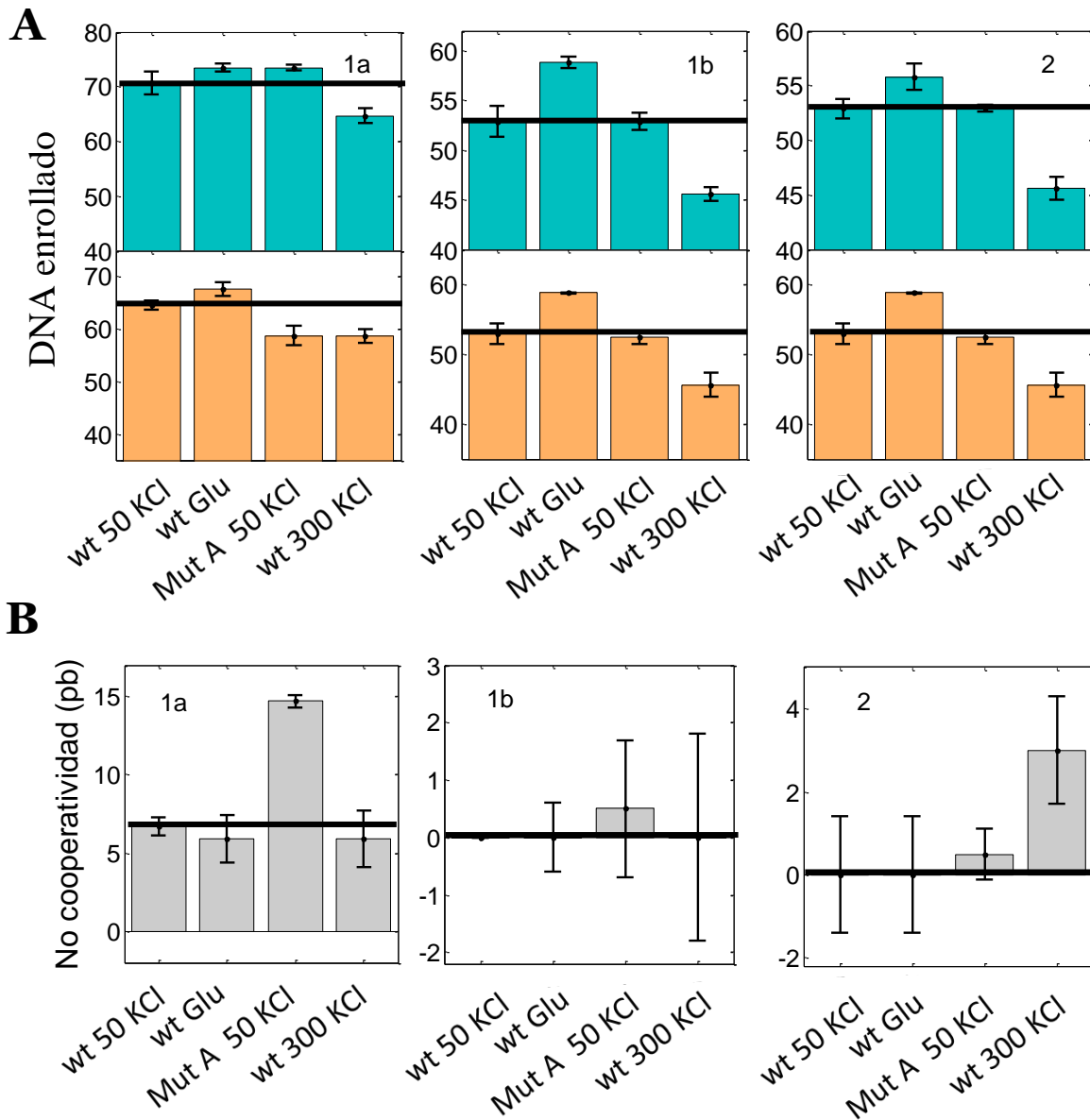


Figura 23: A) Valores de longitud de contorno (ΔL_c) para todas las condiciones estudiadas (pb): Efecto del cambio de secuencia (mut A 50 KCl), glutamato a 100mM (wt Glu) y alta fuerza iónica a 300mM KCl (wt 300 KCl) de los rip (verde) y zip (naranja). El Glu aumenta la cantidad de DNA involucrado en el enrollamiento, mientras que la mutante no tiene efectos. Además, el incremento de la fuerza iónica, reduce la cantidad de DNA en interacción. B) Diferencia de la longitud de contorno del desenrollamiento y enrollamiento, $\Delta L_c(\text{rip}) - \Delta L_c(\text{zip}) = \Delta\Delta L_c$ y, sorprendentemente, la transición tipo 1a y 2, aumentan por efecto del cambio de secuencia ($\sim 2X$) y alta fuerza iónica ($\sim 3X$), respectivamente. La línea negra indica el valor para la condición de 50mM KCl con el λ PR silvestre.

Tabla 8: Longitud de contorno de las transiciones para todas las condiciones experimentales

Promotor	C ⁺	type	ΔL_c (rip)*	$SD_{L_c,U}$	ΔL_c (zip)*	$SD_{L_c,W}$	$\Delta\Delta L_c$ **	$\langle\Delta L_c\rangle$	p ⁺⁺	N***
λ PR wt (-100/+30)	50mM KCl	1a	70.6 ± 2.1	12.9	64.7 ± 0.9	16.2	6.7 ± 0.6	67.6 ± 1.1	0.000	419
		1b	52.9 ± 1.5	15.3	52.9 ± 1.5	16.2	0	52.9 ± 1.5	1.000	405
		2	52.9 ± 0.9	10.9	52.9 ± 0.6	10.6	0 ± 1.4	52.9 ± 0.5	1.000	920
λ PR mut A (-75/+30)	50mM KCl	1a	73.5 ± 0.6	8.6	58.8 ± 1.8	12.5	14.7 ± 0.4	66.2 ± 0.9	0.000	124
		1b	52.9 ± 0.9	7.6	52.4 ± 0.9	6.5	0.5 ± 1.2	52.7 ± 0.6	0.577	125
		2	52.9 ± 0.3	6.2	52.4 ± 0.6	5.3	0.5 ± 0.6	52.7 ± 0.6	0.337	246
λ PR wt (-100/+30)	100mM KGlu	1a	73.5 ± 0.7	11.6	67.6 ± 1.3	11.5	5.9 ± 1.5	70.6 ± 0.7	0.000	376
		1b	58.8 ± 0.6	9.5	58.8 ± 0.1	9.5	0 ± 0.6	58.8 ± 0.3	1.000	370
		2	55.8 ± 1.2	11.3	55.8 ± 0.8	10.7	0 ± 1.4	55.8 ± 0.7	1.000	812
	300mM KCl	1a	64.7 ± 1.3	11.9	58.8 ± 1.3	9.2	5.9 ± 1.8	61.8 ± 1.8	0.000	218
		1b	45.6 ± 0.7	7.3	45.6 ± 1.7	8.8	0 ± 1.8	45.6 ± 1.8	1.000	217
		2	45.6 ± 1.0	8.3	42.6 ± 0.9	7.4	3.0 ± 1.3	44.1 ± 1.3	0.000	293

* Longitud de contorno del desenrollamiento o rip, estimada de $F = \frac{K_B T}{P} \left\{ \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right\}$, usando un P de 20nm,

a partir de los datos de cambios de extensión vs fuerza.

** Longitud de contorno del enrollamiento o zip.

*** N: número total de trazas obtenidas por cada tipo de transición y condición.

+ Condición estudiada.

++ p-value de la diferencia de medias entre ΔL_c (rip) y ΔL_c (zip).

VII.6.3 Efectos en la termodinámica. Gracias al uso del teorema de fluctuación de Crooks, fue posible determinar el trabajo reversible o diferencia de energía libre en el equilibrio entre el estado enrollado y desenrollado de los complejos RPo tipo 1 ($Wab \rightarrow Wb' \rightarrow Wb \rightarrow U$) y 2 ($Wb \rightarrow U$).

Como se observa en la Figura 24A, el cambio de secuencia y el reemplazo de Cl^- por Glu^- aumentan la diferencia de energía libre a fuerza cero ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$); de ~ 92 , 97 y 92 pN.nm de la transición tipo 1a ($Wab \rightarrow Wb$), 1b y 2 ($Wb \rightarrow U$) hacia ~ 123 , 135 y 147 pN.nm los cuales representan un aumento del ~ 30 , 40 y 60% para la secuencia λPR mutante y hacia ~ 123 , 136 y 119 pN.nm con un aumento del ~ 30 , 40 y 30% a 100 mM $KGlu$, respectivamente (tabla 9).

A diferencia del cambio de secuencia y el efecto del glutamato, el aumento de la fuerza iónica de 50 a 300 mM de KCl reduce la diferencia de energía libre de la transición 1b y 2 ($Wb \rightarrow U$), de 97 y 92 pN.nm hacia 84 y 75 pN.nm, lo cual corresponde con una reducción del ~ 15 y 20% (Tabla 9, Figura 24A y B), respectivamente. Lo anterior significa que el proceso $Wb \rightarrow U$, para el complejo RPo 1 o 2, implica el enrollamiento de DNA por contactos de tipo electrostático con la superficie de la RNAP- $\sigma 70$ de *E. coli*. Sin embargo, la transición 1a del RPo 1 ($Wab \rightarrow Wb$), aumenta ligeramente en estabilidad, de ~ 92 a 99 , $\sim 8\%$ adicional (Tabla 9 o Figura 24A); lo cual implicaría que el tipo de interacción DNA-proteína en $Wab \rightarrow Wb$ incluye interacciones de tipo electrostáticas, polares y apolares.

Sumado a lo anterior y, claramente, como se ve en la Figura 25, para todas las condiciones estudiadas, el trabajo disipado $\langle W_{w \rightarrow u}^{dis} \rangle$ y $\langle W_{u \rightarrow w}^{dis} \rangle$ no se modifica; con excepción de la transición 1a del complejo RPo tipo 1 formado con el promotor λPR y la secuencia mutante. Para este último caso, se observa que este valor aumenta de ~ 21 a 46 pN.nm para el

desenrollamiento (rip, $Wab \rightarrow Wb$) lo cual corresponde con un aumento del ~ 2 veces; y de 11 a 38 pN.nm para el enrollamiento (zip, $Wb \rightarrow Wab$), aumento de ~ 4 veces (Tabla 23, Figura 25). Además, el trabajo disipado para las transiciones 1b y 2 es casi nulo ($Wb \rightarrow U$), en otras palabras estos procesos son reversibles a las condiciones experimentales usadas (3pN/s en *Force-ramp*)

Como se observa, el principal cambio por efecto del cambio de secuencia es aumento de la estabilidad del complejo RPo tipo 2 ($Wb \rightarrow U$) en $\sim 70\%$ e incremento del trabajo disipado por encima del 100% para la transición 1a del RPo tipo 1 ($Wab \rightarrow Wb$). Por otro lado, el glutamato aumenta la estabilidad del complejo RPo tipo 1 en $\sim 40\%$ y no modifica la cooperatividad de la transición 1a ($Wb \rightarrow Wb'$).

Además, para el desenrollamiento $Wb \rightarrow U$ del RPo 1 (transición 1b) y 2; el aumento de fuerza iónica del medio reduce la diferencia de energía libre y el reemplazado de Cl^- por Glu^- la aumentan (Figura 24B), tal cual como lo demuestran los estudios cinético de formación del complejo RPo (Kontur *et al.*, 2010; Roe & Record, 1985).

VII.6.4 Cambios en la energía por par de base. Hasta el momento, hemos estimado la diferencia de energía libre y cambio de extensión a fuerza cero (longitud de contorno), $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ y ΔL_c , respectivamente. Usando un modelo sencillo donde la contribución de cada par de base, en la interacción DNA-proteína, es uniforme; es posible estimar la energía por par de base entre (ΔG_{pb}) la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λPR en todas las condiciones estudiadas, y definiremos a ΔG_{pb} como $\Delta G_{w \rightarrow u}^0 / \Delta L_c(zip)$. Como se observa en la Figura 26 y Tabla 10, la transición 1a, 1b (RPo 1) y 2 (RPo 2) involucra una ΔG_{pb} de ~ 1.3 , 1.8 y 1.8pN.nm, respectivamente para el promotor λPR silvestre.

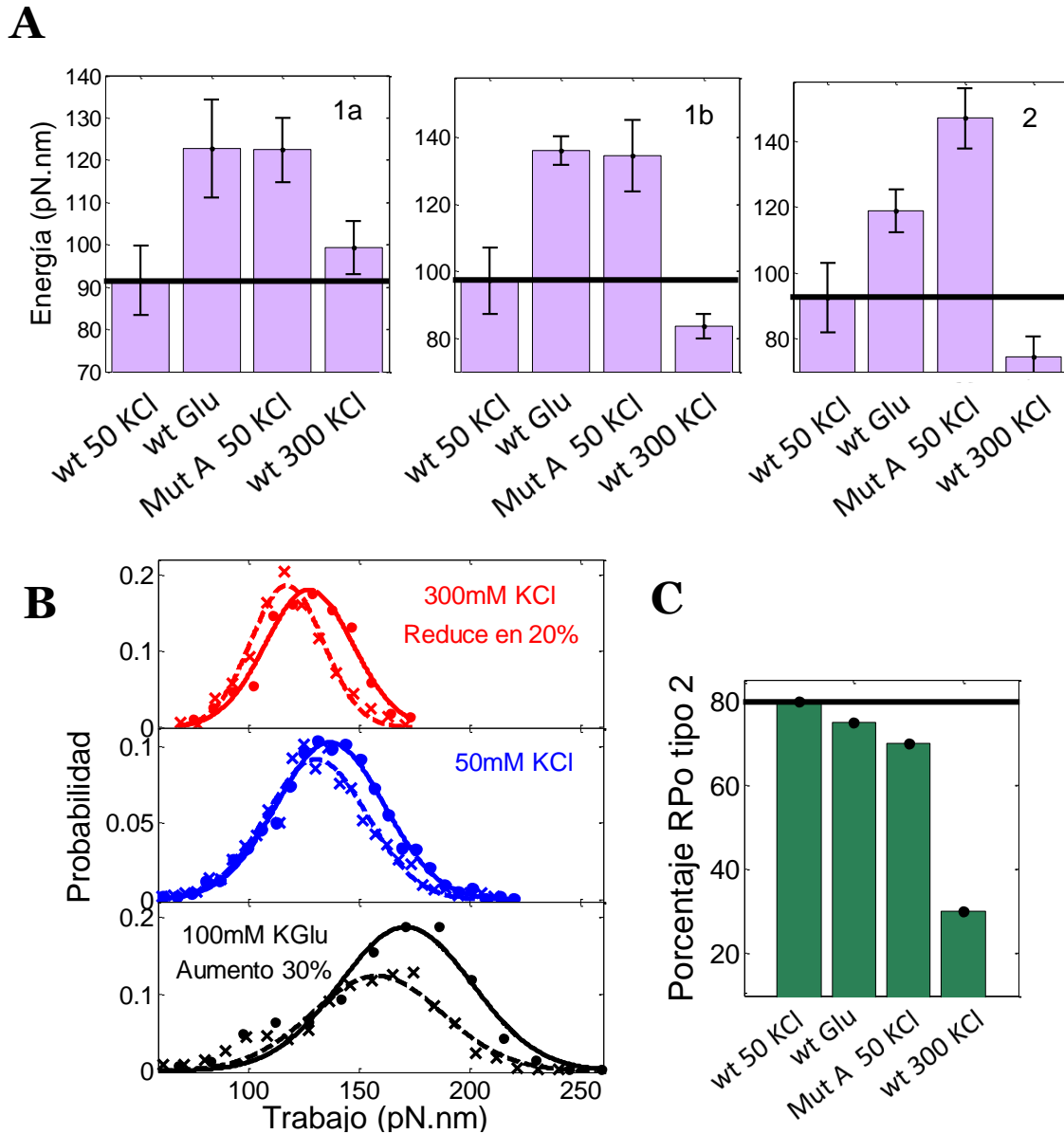


Figura 24: **A)** Diferencia de energía libre para todos los tipos de transiciones, a fuerza cero ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$). Como se observa, tanto el cambio de secuencia y el Glu estabilizan el estado enrollado, mientras que el aumento de la fuerza iónica (de 50 a 300mM KCl) lo reduce; **B)** Comparación de la distribución de trabajo del rip (puntos) y zip (aspa) para la transición tipo 2; para las condiciones de alta fuerza iónica 300mM KCl (rojo) y a 100mM de Glu⁻ (negro), los cuales aumentan y disminuyen la estabilidad, respectivamente; tal cual predice los estudios cinético de RPo; y **C)** Fracción de complejos tipo 2 del total de complejos RPo enrollados para todas las condiciones mencionadas. La línea negra indica el valor para la condición de 50mM KCl con el λ PR silvestre.

Tabla 9: Resumen de los parámetros termodinámicos (pN.nm) para todas las condiciones estudiadas

Promotor	C°	Tipo	$\langle W_{w \rightarrow u} \rangle^*$	$SD_{w \rightarrow u}^\diamond$	$\langle W_{u \rightarrow w} \rangle^*$	$SD_{u \rightarrow w}^\diamond$	$\Delta G_{w \rightarrow u}^{**}$	$\langle W_{w \rightarrow u}^{dis} \rangle^+$	$\langle W_{u \rightarrow w}^{dis} \rangle^+$	$W_h^{\prime\prime}$	$\Delta G_{w \rightarrow u}^{0***}$	n^{++}
λ PR wt (-100 to +30)	50mM KCl	1a	159.9 ± 5.3	53.0	127.7 ± 2.5	39.3	139 ± 8.2	20.9 ± 6.8	11.29 ± 4.9	47.5	91.5 ± 8.2	419
		1b	135.8 ± 1.7	44.1	131.8 ± 3.9	45.6	134.2 ± 9.9	2.39 ± 7.1	2.4 ± 7.9	36.9	97.3 ± 9.9	405
		2	130.6 ± 1.0	34.3	130.6 ± 1.7	32.2	130 ± 10.5	0.59 ± 1.8	-0.6 ± 2.6	37.6	92.4 ± 10.5	920
λ PR mut A (-75 to +30)		1a	223.2 ± 4.0	37.5	139.2 ± 6.8	35.9	181 ± 7.7	45.7 ± 5.4	38.3 ± 7.7	58.6	122.4 ± 7.7	124
		1b	185.9 ± 5.1	34.4	178.9 ± 4.0	27.1	177.5 ± 10.6	4.9 ± 6.9	2.09 ± 6.2	42.9	134.6 ± 10.6	125
		2	197.3 ± 3.3	26.6	185.7 ± 1.7	25.1	191 ± 9.1	6.3 ± 3.9	5.3 ± 2.7	44.1	146.9 ± 9.1	246
λ PR wt (-100 to +30)	100mM KGlu	1a	211.5 ± 3.7	44.8	169.5 ± 2.9	45.0	181.7 ± 11.6	29.8 ± 12.2	12.2 ± 11.9	58.9	122.8 ± 11.6	376
		1b	189.0 ± 2.4	35.9	183.4 ± 3.6	35.7	186.2 ± 4.3	2.8 ± 4.9	2.8 ± 5.6	50.1	136.1 ± 4.3	370
		2	171.0 ± 5.2	42.3	158.1 ± 3.9	41.6	164.5 ± 6.5	6.5 ± 8.3	6.4 ± 7.6	45.8	118.7 ± 6.5	812
	300mM KCl	1a	156.9 ± 3.3	37.1	125.7 ± 3.6	29.9	139.3 ± 6.2	17.6 ± 7.0	13.6 ± 7.2	39.7	99.3 ± 6.2	218
		1b	134.6 ± 3.5	24.6	130.8 ± 2.5	31.7	132.0 ± 3.7	2.6 ± 5.1	1.2 ± 4.5	48.4	83.6 ± 3.7	217
		2	127.3 ± 2.5	27.9	117.3 ± 1.6	23.1	122.6 ± 6.0	4.7 ± 6.5	5.3 ± 6.2	48.0	74.6 ± 6.0	293

° Condición estudiada.

* Trabajo irreversible medio de desenrollamiento (rip) y enrollamiento (zip), $\langle W_{w \rightarrow u} \rangle$ y $\langle W_{u \rightarrow w} \rangle$, respectivamente.

◇ Desviación estándar de la distribución de trabajo del rip y zip, $SD_{w \rightarrow u}$ y $SD_{u \rightarrow w}$, respectivamente.

** Trabajo reversible o diferencia de energía libre para cada rip/zip, $\Delta G_{u \rightarrow w}$. Estimado del teorema de fluctuación de Crooks, $\frac{P(w_{w \rightarrow u})}{P(w_{u \rightarrow w})} = e^{-\left(\frac{\Delta G_{w \rightarrow u} - W}{k_B T}\right)}$, Se observa

que cuando las probabilidades son iguales $P(w_{w \rightarrow u}) = P(w_{u \rightarrow w})$ (intersección de las distribuciones de trabajo), se cumple que $\Delta G = W$.

+ Trabajo medio disipado del desenrollamiento y enrollamiento, $\langle W_{w \rightarrow u}^{dis} \rangle = \langle W_{w \rightarrow u} \rangle - \Delta G_{w \rightarrow u}$ y $\langle W_{u \rightarrow w}^{dis} \rangle = \langle W_{u \rightarrow w} \rangle - \Delta G_{w \rightarrow u}$, respectivamente.

*** Diferencia de energía libre entre el estado enrollado y desenrollado a fuerza cero, $\Delta G_{w \rightarrow u}^0 = \Delta G_{w \rightarrow u} - W_h$.

′′ Costo entrópico del DNA que rodea al promotor λ PR y del complejo enrollado a las fuerza del rip/zip, W_h .

++ Cantidad de trazas totales para cada condición estudiada.

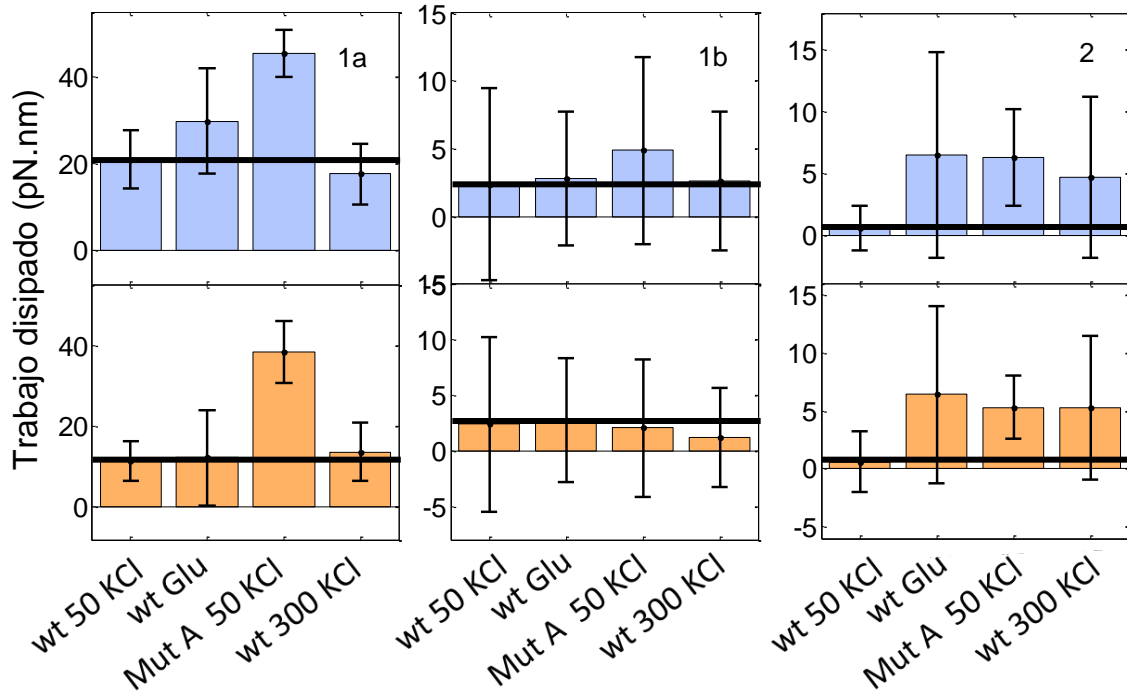


Figura 25: Comparación de valores de trabajo disipado del trabajo irreversible de desenrollamiento (azul) y enrollamiento (naranja), $\langle W_{w \rightarrow u}^{dis} \rangle = \langle W_{w \rightarrow u} \rangle - \Delta G_{w \rightarrow u}$ y $\langle W_{u \rightarrow w}^{dis} \rangle = \langle W_{u \rightarrow w} \rangle - \Delta G_{w \rightarrow u}$, respectivamente. Como se observa, para las condiciones experimentales (3pN/s de velocidad de perturbación) el trabajo disipado de las transiciones 1b y 2 son aproximadamente cero; en otras palabras el trabajo de estas transiciones son de tipo reversible o cerca del equilibrio y este no es modificado por las condiciones estudiadas. Sin embargo, para la transición 1a, solo el cambio de secuencia, aumento el $\langle W_{w \rightarrow u}^{dis} \rangle$ y $\langle W_{u \rightarrow w}^{dis} \rangle$ en aproximadamente ~ 2 y 3 veces, respectivamente.

Anteriormente se mencionó que el cambio de secuencia aumenta la diferencia de energía libre para todas las transiciones. Esto también se observa para ΔG_{pb} , dando valores de 1.7, 2.6 y 2.8pN.nm, los cuales corresponden a un aumento del 30, 40 y 60% para las transiciones 1a, 1b y 2, respectivamente. De la misma manera, a 100mMm de KGlu, ΔG_{pb} aumenta a 1.7, 2.3 y 2.1pN.nm, que corresponde a 30, 25 y 20% de aumento para 1a, 1b y 2,

respectivamente (Tabla 10, Figura 26). Como se observa, el principal efecto en la formación de los complejos RPo entre el promotor λ PR y la RNAP- σ 70 de *E. coli*, es: i) el reemplazo de la secuencia AT-rich por random aumenta la ΔG_{pb} en la transición 2 ($U \rightarrow Wb$) en ~60% del RPo 2, ii) el reemplazo de Cl^- por Glu^- aumenta el ΔG_{pb} de la transición tipo 1a ($Wb \rightarrow Wab$) del RPo 1, en ~30%.

Sorprendentemente, el aumento de la fuerza iónica de 50 a 300mM de KCl, no modifica ΔG_{pb} para las transiciones 1b y 2 ($U \rightarrow Wb$). Sin embargo, este aumenta de 1.3 a 1.7pN.nm para 1a (Tabla 10). En otras palabras, el proceso $Wb \rightarrow Wab$ del complejo RPo 1 implica una interacción de tipo no electrostática.

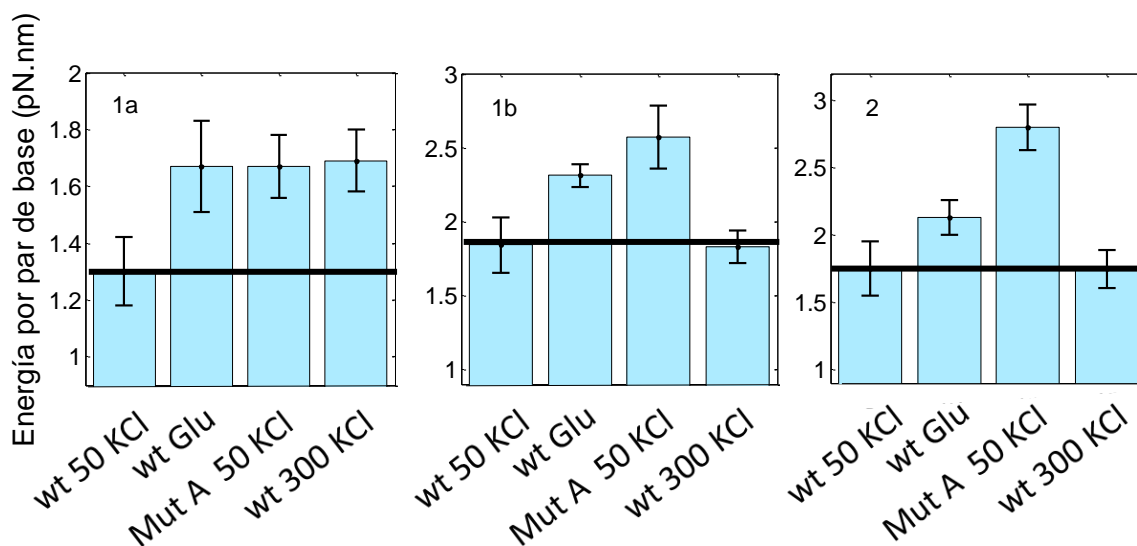


Figura 26: Energía por par de base (pN.nm) ΔG_{bp} para todas las condiciones y los tipo de transición. Tanto el Glu y el cambio de secuencia aumenta dicha energía para todos los tipos de transiciones. Sin embargo, el aumento de la fuerza iónica aumenta la ΔG_{bp} para la transición tipo 1a, pero no tiene efecto en 1b y 2.

Tabla 10: valores de energía por par de base para todas las condiciones estudiadas

Promotor	C	Type	ΔL_{zip} (bp)*	ΔG^0 (pN.nm)**	ΔG_{bp} (pN.nm)***
λ PR wt (-100 to +30)	50mM KCl	1a	70.6 ± 2.1	91.5 ± 8.2	1.30 ± 0.12
		1b	52.9 ± 1.5	97.3 ± 9.9	1.84 ± 0.19
		2	52.9 ± 0.9	92.4 ± 10.5	1.75 ± 0.20
λ PR mut A (-75 to +30)	50mM KCl	1a	73.5 ± 0.6	122.4 ± 7.7	1.67 ± 0.11
		1b	52.4 ± 0.9	134.6 ± 10.6	2.57 ± 0.21
		2	52.4 ± 0.3	146.9 ± 9.1	2.80 ± 0.17
λ PR wt (-100 to +30)	100mM KGluc	1a	73.5 ± 0.7	122.8 ± 11.6	1.67 ± 0.16
		1b	58.8 ± 0.6	136.1 ± 4.3	2.31 ± 0.08
		2	55.8 ± 1.2	118.7 ± 6.5	2.13 ± 0.13
	300mM KCl	1a	58.8 ± 1.3	99.3 ± 6.2	1.69 ± 0.11
		1b	45.6 ± 1.7	83.6 ± 3.7	1.83 ± 0.11
		2	42.6 ± 0.9	74.6 ± 6.0	1.75 ± 0.14

* L_{zip} Longitud de contorno del enrollamiento en pb.

** Diferencia de energía libre a fuerza cero (pN.nm)

*** Energía por par de base, estimado como $\Delta G_{bp} = \Delta G^0 / L_{zip}$.

VII.7 Modulación del enrollamiento por ppGpp

VII.7.1 Efecto en las propiedades mecánicas. Al igual que las condiciones antes estudiadas, el tetrafosfato de guanosina (ppGpp), a concentraciones saturantes ($100\mu\text{M}$), aumenta la fuerza mecánica del desenrollamiento y enrollamiento del complejo RPo formado entre la RNAP- $\sigma 70$ de *E. coli* y el promotor λPR silvestre. Como se observa en la Figura 27 y Tabla 11, $\langle F_r \rangle$ y $\langle F_z \rangle$ aumentan en $\sim 1\text{pN}$. Aparentemente, el ppGpp estabiliza el complejo enrollado; sin embargo, esto no es así ya que, como se verá más adelante, la diferencia de energía libre se reduce.

VII.7.2 Efecto en la cantidad de DNA enrollado. Como se mencionó anteriormente, los cambios de extensión del desenrollamiento (rip) y enrollamiento (zip) no corresponden al DNA involucrado en la interacción DNA-proteína ya que estos ocurren a una fuerza determinada, $\langle F_r \rangle$ y $\langle F_z \rangle$. Al igual para las otras condiciones, se usó el modelo WLC de polímero para estimar los cambios de extensión a fuerza cero o longitud de contorno (ΔL_c).

Como se observa en la Figura 28 y Tabla 12, el ppGpp reduce la longitud de contorno para todos los tipos de transición. El proceso $Wb \rightarrow U$, del complejo RPo tipo 1 (1b) y 2, involucra una reducción de ~ 10 y 15pb de DNA enrollado, respectivamente. Para el proceso $Wab \rightarrow Wb$ (1a) del RPo 1, se observa una reducción de $\sim 13\text{pb}$ (Tabla 12, Figura 28). Lo anterior genera un total de $\sim 100\text{pb}$ del RPo tipo 1 y $\sim 40\text{pb}$ del tipo 2 en presencia de $100\mu\text{M}$ de ppGpp; lo cual representa una reducción total de $\sim 20\text{pb}$ para el RPo 1. De la misma manera que el cambio de secuencia, la no-cooperatividad, medido por ΔL_c , aumenta de ~ 7 a 14pb (~ 2 veces) por efecto del ppGpp (Figura 30A y Tabla 12).

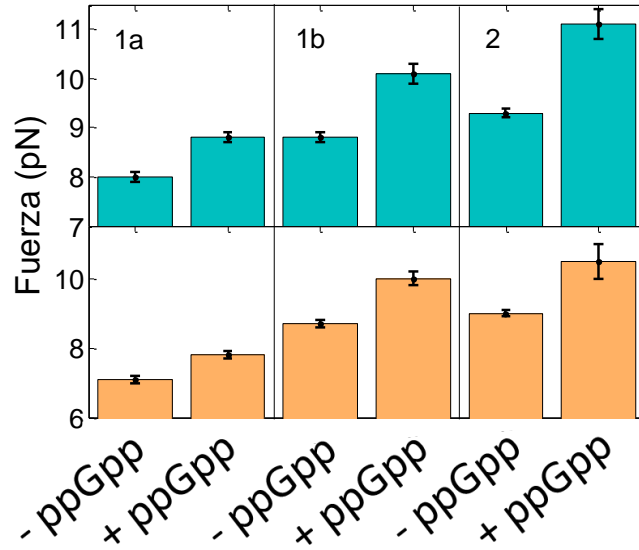


Figura 27: Comparación de la fuerza de desenrollamiento (verde) y enrollamiento (naranja) de los complejos enrollados, en ausencia y presencia de ppGpp (100 μ M). Como se observa, la fuerza aumenta para todos los tipos de transición.

Tabla 11: Resumen de los valores de fuerza de rips/zip, sin y con ppGpp

C	type	n%	$\langle F_r \rangle$ (pN)	SD_{F_r}	R^2 (r)	$\langle F_z \rangle$ (pN)	SD_{F_z}	R^2 (z)	N	T ⁺⁺⁺
---	1a	20	8.0 ± 0.1	0.5	0.94	7.1 ± 0.1	0.6	0.92	419	6
	1b		8.8 ± 0.1	0.4	0.93	8.7 ± 0.1	0.3	0.93	405	
	2	80	9.3 ± 0.1	0.6	0.96	9.0 ± 0.1	0.7	0.98	920	23
100 uM ppGpp	1a	50	8.8 ± 0.1	0.8	0.97	7.8 ± 0.1	0.9	0.98	467	6
	1b		10.1 ± 0.2	0.7	0.84	10.0 ± 0.2	0.7	0.91	454	
	2	50	12.0 ± 0.2	0.6	0.88	11.7 ± 0.7	1.3	0.68	143	6
		10.1 ± 0.4	0.7	9.8 ± 0.3		0.5				

* R-sq del ajuste de la distribución de cambio de extensión del rip (E_r).

** R-sq del ajuste de la distribución de cambio de extensión del zip (E_z).

*** N: número total de trazas obtenidas por cada tipo de transición y condición.

+ Condición estudiada.

++ % de complejo tipo 1 y 2 para cada condición estudiada.

+++ T: total de complejo RPo

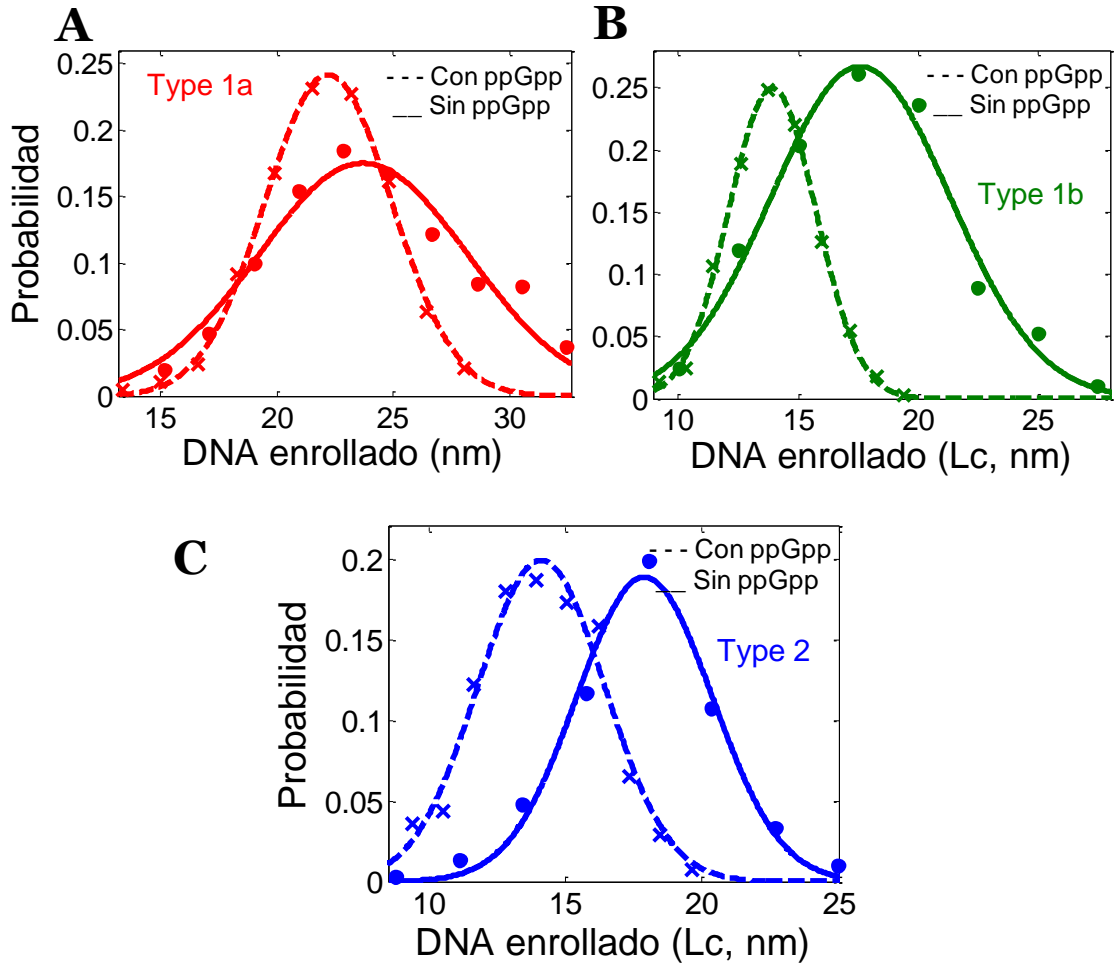


Figura 28: Reducción de la longitud de contorno del desenrollamiento, ΔL_c (rip), por efecto del ppGpp (nm), para las transiciones 1a (rojo, **A**), 1b (azul, **B**) y 2 (negro, **C**). Como se menciona en el texto, este efecto es directamente sobre el complejo enrollado RPo, ya que estos son seleccionados con heparina. **D**) Comparación de la no-cooperatividad por efecto de 100 μ M de ppGpp.

Tabla 12: Longitud de contorno del complejo RPo en ausencia y presencia de 100 μ M de ppGpp

ppGpp	type	ΔL_c (rip) *	$SD_{L_c(U)}$	ΔL_c (zip)*	$SD_{L_c(W)}$	$\Delta\Delta L_c^{**}$	p ⁺	N
---	1a	70.6 \pm 2.1	12.9	64.7 \pm 0.9	16.2	6.7 \pm 0.6	0.000	419
	1b	52.9 \pm 1.5	15.3	52.9 \pm 1.5	16.2	0	1.000	405
	2	52.9 \pm 0.9	10.9	52.9 \pm 0.6	10.6	0 \pm 1.4	1.000	920
100uM ppGpp	1a	64.7 \pm 0.4	11.3	51.5 \pm 0.4	10.1	13.2 \pm 0.6	0.000	467
	1b	41.2 \pm 0.3	7.6	41.2 \pm 0.8	8.2	0 \pm 0.9	1.000	454
	2	41.2 \pm 0.9	9.7	38.2 \pm 0.7	7.6	3 \pm 1.1	0.000	143

* Longitud de contorno (pb).

** Diferencia de longitud de contorno del rip y zip, $\Delta\Delta L_c = \Delta L_c(\text{rip}) - \Delta L_c(\text{zip})$, en pb.

+ p-value de la diferencia de medias $\Delta L_c(\text{rip})$ y $\Delta L_c(\text{zip})$, en pb.

En resumen, el ppGpp reduce la cantidad de DNA involucrado en la interacción DNA-proteína de los complejos enrollados de la iniciación. Para el RPo 1, la reducción es de ~20pb o 7nm, lo cual va acorde con los resultados experimentales mediante el microscopio de fuerza atómica (AFM).

VII.7.3 Efecto en las propiedades termodinámicas. Como se observa en la Figura 29 y Tabla 13, el ppGpp reduce la diferencia de energía entre el estado enrollado y desenrollado para las transiciones 1b y 2 ($Wb \rightarrow U$); mientras que la aumentan para la transición 1a ($Wab \rightarrow Wb$).

Para $Wb \rightarrow U$, la diferencia de energía libre a fuerza cero ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$) se reduce de ~97 y 92 pN.nm de la transición tipo 1b y 2 hacia ~71 y 82 pN.nm los cuales representan una reducción del ~27 y 11%, respectivamente. Sin embargo, para la transición $Wab \rightarrow Wb$, $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ aumenta de ~92 hacia 100 pN.nm, lo que equivale a un aumento del ~9%. Lo anterior genera un $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$, para el proceso $Wab \rightarrow Wb \rightarrow U$, de ~170 pN.nm en presencia de ppGpp,

donde se ha producido una reducción de ~ 20 pN.nm. Como se puede notar, este efecto es muy similar al aumento de la fuerza iónica de 50 a 300mM de KCl (Tabla 9 y Figura 24A). Además, al igual que el cambio de secuencia, el ppGpp aumenta el trabajo disipado del trabajo irreversible del enrollamiento ($W_{u \rightarrow w}^{dis}$), de ~ 11 hacia 24 pN.nm, lo cual corresponde a un aumento de ~ 2 veces.

Como se puede observar, el efecto de 100 μ M de ppGpp en la diferencia de energía libre a fuerza cero ($\Delta G_{u \rightarrow w}^0$), trabajo disipado ($W_{u \rightarrow w}^{dis}$) y longitud de contorno (L_c) del enrollamiento, es muy similar al efecto del aumento de fuerza iónica y por el cambio de secuencia. En otras palabras, el ppGpp modula la dinámica del complejo enrollado RPo, entre la RNAP- $\sigma 70$ de *E. coli* y el promotor λ PR, a nivel de la región *upstream*.

VII.7.4 Efecto en la energía por par de base. Como se mencionó, usando un modelo sencillo donde la contribución de cada par de base, en la interacción DNA-proteína, es uniforme; por lo tanto es posible estimar la energía por par de base (ΔG_{pb}), entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR, en presencia de ppGpp. Como se observa en la Figura 30C y Tabla 22; para la transición $Wb \rightarrow U$ (1b y 2) involucra una ΔG_{pb} de ~ 1.7 y 2.0 pN.nm por efecto del ppGpp, lo cual corresponde a una disminución del 6% y aumento del 13%, respectivamente. A diferencia de las otras condiciones estudiadas, el ppGpp no influye considerablemente en ΔG_{pb} .

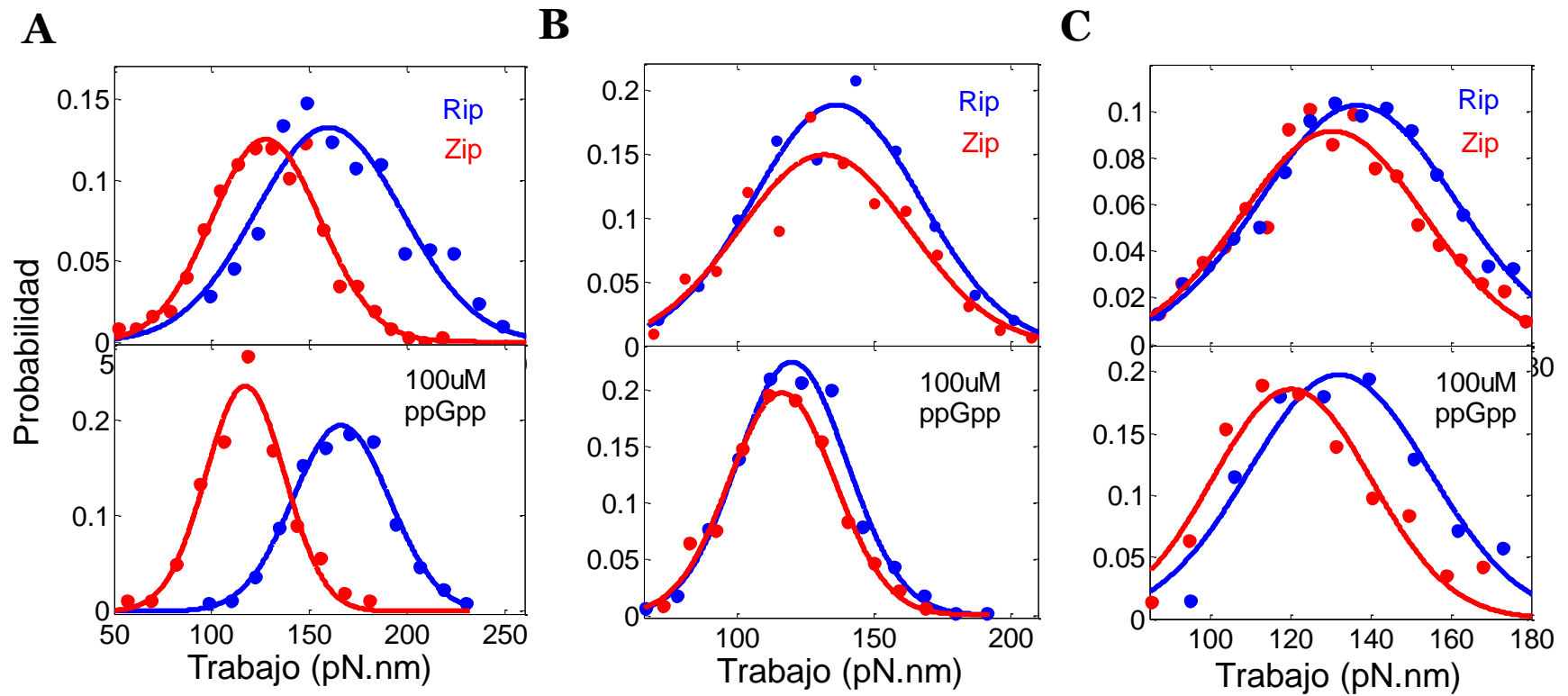


Figura 29: Distribuciones de trabajo irreversible del desenrollamiento ($W_{w \rightarrow u}$) y enrollamiento ($W_{u \rightarrow w}$), azul y rojo, respectivamente; para las transiciones 1a (A), 1b (B) y 2 (C), del complejo enrollado RPo tipo 1 y 2, respectivamente. Aquí se compara como el trabajo reversible ($\Delta G_{u \rightarrow w}$) cambia por efecto de la adición de 100 μM de ppGpp (abajo). Como se observa, el ppGpp disminuye el $\Delta G_{u \rightarrow w}$ de las transiciones 1b y 2.

Tabla 13: Comparación de parámetros termodinámicos del complejo RPo en ausencia y presencia de 100 μ M ppGpp

ppGpp	Type	$\langle W_{w \rightarrow u} \rangle^*$	$SD_{w \rightarrow u}^\diamond$	$\langle W_{u \rightarrow w} \rangle^*$	$SD_{u \rightarrow w}^\diamond$	$\Delta G_{u \rightarrow w}^{**}$	$\langle W_{w \rightarrow u}^{dis} \rangle^+$	$\langle W_{u \rightarrow w}^{dis} \rangle^+$	W_h^{++}	$\Delta G_{w \rightarrow u}^{0***}$	n^{++}
---	1a	159.9 ± 5.3	53.0	127.7 ± 2.5	39.3	139 ± 8.2	20.9 ± 6.8	11.29 ± 4.9	47.5	91.5 ± 8.2	419
	1b	135.8 ± 1.7	44.1	131.8 ± 3.9	45.6	134.2 ± 9.9	2.39 ± 7.1	2.4 ± 7.9	36.9	97.3 ± 9.9	405
	2	130.6 ± 1.0	34.3	130.6 ± 1.7	32.2	130 ± 10.5	0.59 ± 1.8	-0.6 ± 2.6	37.6	92.4 ± 10.5	920
100 μ M ppGpp	1a	166.2 ± 2.2	34.9	117.1 ± 2.9	28.5	141.0 ± 7.2	25.2 ± 7.5	23.9 ± 7.7	40.8	100.2 ± 7.2	467
	1b	120.3 ± 2.1	28.3	116.6 ± 1.7	27.2	118.4 ± 1.4	1.9 ± 2.5	1.8 ± 2.2	47.0	71.4 ± 1.4	454
	2	132.2 ± 4.6	31.8	120.4 ± 4.3	28.0	123.6 ± 1.3	8.6 ± 4.8	3.2 ± 4.5	41.3	82.3 ± 1.3	143

* $\langle W_{w \rightarrow u} \rangle$ y $\langle W_{u \rightarrow w} \rangle$ son el trabajo medio del desenrollamiento (Rip) y enrollamiento (Zip) de cada transición (pN.nm), respectivamente.

** Es el trabajo reversible (pN.nm) de cada transición, $\Delta G_{w \rightarrow u}$.

*** Es el trabajo reversible (pN.nm) de cada transición a fuerza cero (Liphardt *et al.*, 2001; Manosas & Ritort, 2005).

+ Trabajo medio disipado del desenrollamiento y enrollamiento, $\langle W_{w \rightarrow u}^{dis} \rangle = \langle W_{w \rightarrow u} \rangle - \Delta G_{w \rightarrow u}$ y $\langle W_{u \rightarrow w}^{dis} \rangle = \langle W_{u \rightarrow w} \rangle - \Delta G_{u \rightarrow w}$, respectivamente.

++ Costo entrópico del DNA que rodea al promotor λ PR y del complejo enrollado a las fuerza del rip/zip, W_h .

$\diamond SD_{w \rightarrow u}$ y $SD_{u \rightarrow w}$ desviación estándar de la distribución de trabajo del Rip y Zip, respectivamente.

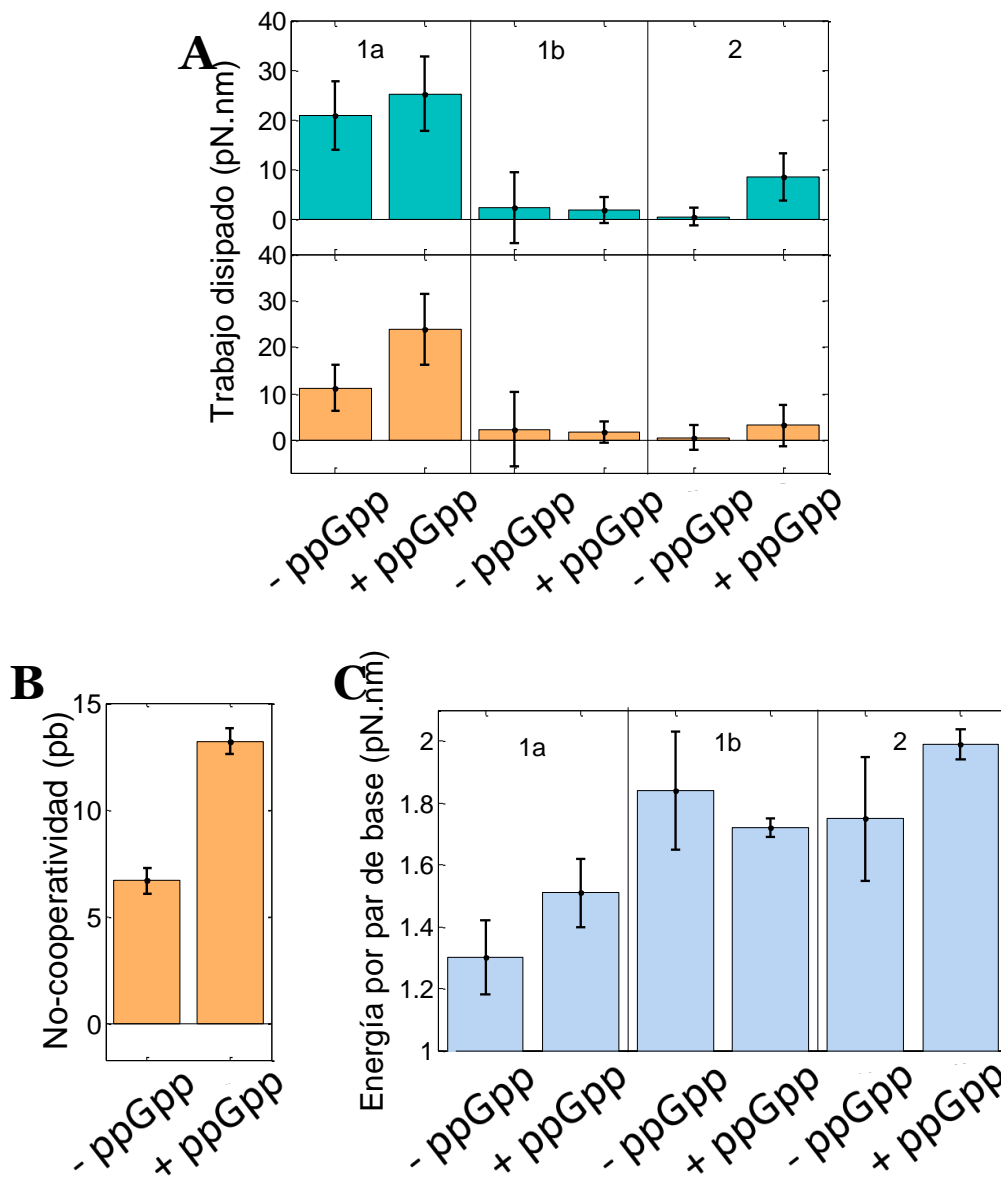


Figura 30: Diagramas que muestran el efecto del ppGpp en el trabajo disipado (A), no-cooperatividad (B) y energía por par de base (C). Como se observa, el ppGpp **A**) aumenta el trabajo disipado de la transición 1a del zip, de ~10 a 20pN.nm; **B**) aumenta la no-cooperatividad de ~7 a 14 pb (2X) para el proceso $Wb \rightarrow Wb'$ de la transición 1a, y **C**) aumenta la energía por par de base, para las transiciones 1a y 2, mientras que para 1b, reduce.

Tabla 14: Energía por par de base (ΔG_{bp}) del desenrollamiento en ausencia y presencia de 100 μ M de ppGpp

ppGpp	Type	L_{zip} (bp)*	ΔG^0 (pN.nm)**	ΔG_{bp} (pN.nm)***
---	1a	70.6 \pm 2.1	91.5 \pm 8.2	1.30 \pm 0.12
	1b	52.9 \pm 1.5	97.3 \pm 9.9	1.84 \pm 0.19
	2	52.9 \pm 0.9	92.4 \pm 10.5	1.75 \pm 0.20
100μM ppGpp	1a	64.7 \pm 0.4	100.2 \pm 7.2	1.51 \pm 0.11
	1b	41.2 \pm 0.3	71.4 \pm 1.4	1.72 \pm 0.03
	2	41.2 \pm 0.9	82.3 \pm 1.3	1.99 \pm 0.05

* Longitud de contorno del enrollamiento (zip) en pares de bases (pb).

** Diferencia de energía libre fuerza cero.

*** Diferencia de energía libre por par de base.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Importancia del complejo enrollado

La transcripción es un proceso fundamental de la vida ya que es el primer paso de la expresión de genes. En el inicio de la transcripción, la RNAP establece una interacción débil con el promotor, formando el complejo cerrado (RPC). Posteriormente, el dsDNA se abre para formar ssDNA, proceso conocido como isomerización, formándose un complejo inestable. Finalmente, ocurren reordenamientos en la RNAP para formar el complejo abierto estable (RPO). Como se observa, existen dos procesos muy importantes: i) la interacción inicial DNA-proteína y ii) la isomerización; los cuales se observan para muchos promotores como λ PR, *lacUV5*, *rrnB* P1, entre otros (Ruff *et al.*, 2015).

En los 90's se reportó, usando microscopía de fuerza atómica (AFM) y electrónica de transmisión (TEM), que el DNA del promotor λ PR y de adenovirus se enrollan alrededor de la RNAP de *E. coli* y Pol II de *S. cerevisiae*, respectivamente (Rivetti *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1997; Forget *et al.*, 1997). Más tarde y usando AFM, el fenómeno de enrollamiento se reportó para otros promotores como *hdeAB*, *rrnB* P1, P2, tRNA^{tyr} de *E. coli* (Dame *et al.*, 2002, Maurer & Travers, 2006, Shin *et al.*, 2005). A pesar que el complejo enrollado parece ser conservado en el inicio de la transcripción, no se le había dado mayor importancia debido a escepticismo en relación a su rol funcional. Sin embargo, Doniselli *et al.*, (2015) demostraron que reguladores

transcripcionales como el tetrafosfato de guanosa (ppGpp) y DksA afectan la cantidad de DNA involucrado en el enrollamiento para los promotores λ PR, *rrnB* P1 y P2, y gracias a esto los autores proponen que el fenómeno tiene un rol importante en la regulación de genes.

Aparentemente, el enrollamiento parece ser conservado e importante biológicamente ya que es blanco de reguladores transcripcionales. Gracias a lo anterior existen muchas interrogantes las cuales merecen ser respondidas, tales como ¿El proceso de enrollamiento tiene algún intermediario? ¿Es totalmente cooperativo? ¿Cuál es la diferencia de energía libre entre el estado enrollado y desenrollado? ¿Cómo dicha energía es modulada por el cambio de secuencia del promotor? ¿Cómo el reemplazo del anión cloro por el anión fisiológico glutamato y el aumento de la fuerza iónica del medio afectan la dinámica del enrollamiento? y, finalmente ¿Cómo este proceso es modulado por reguladores transcripcionales como ppGpp? Estas y muchas incógnitas son claves para entender cómo cambios de las condiciones ambientales (fuerza iónica, solutos), diferentes tipos de promotores y reguladores transcripcionales modulan el inicio de la transcripción por sus efectos en el complejo enrollado.

VIII.2 El complejo enrollado a nivel de moléculas individuales

La microscopía de pinzas ópticas ha sido muy útil para el estudio detallado del plegamiento de proteínas (Cecconi *et al.*, 2005; Elms *et al.*, 2012); estructuras secundarias de RNA y DNA tales con *hairpin* (Liphardt *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2007; Collin *et al.*, 2005); y la dinámica de la interacción DNA-proteína como el nucleosoma (Mihardja *et al.*, 2006). Gracias a ello, ha sido posible identificar de forma directa

intermediarios en la vía de plegamiento, perturbar con fuerza el diagrama de energía y estimar parámetros cinéticos y termodinámicos. Diversas metodologías se han usado para estudiar la dinámica DNA-proteína, sin embargo, en el presente estudio se usó una estrategia similar a Mihardja *et al.*, (2006) ya que: i) La interacción RNAP de *E. coli* y λP_R en el complejo de iniciación RPo tiene vida media de 6h (Łyzen *et al.*, 2009) y ii) permite realizar un análisis termodinámico gracias al desarrollo de métodos de cálculo de la diferencia de energía en el equilibrio con perturbaciones fuera del equilibrio (Collin *et al.*, 2005).

Para garantizar que las señales observadas (rip/zip) correspondían a la dinámica del complejo enrollado, se estiraron ~100 moléculas de DNA no incubado con RNAP y ~200 moléculas de DNA pre-incubado con heparina e incubado con RNAP; para ambos casos no se observó ningún rip/zip. Sin embargo, ya que estos controles son negativos, se procedió a:

- *Condición 1: Cambiar el tercer AT-rich de la región upstream del promotor λPR . Ya que este efecto es directo sobre la interacción en el promotor λPR y la RNAP- $\sigma 70$, la dinámica del rip/zip debería verse afectado. Además, de acuerdo a Mangiarotti *et al.*, 2009, dicha mutante λPR reduce el enrollamiento de 30 a 20nm, mediante el uso del AFM.*
- *Condición 2: Reemplazar el anión cloro Cl^- (50mM KCl) por el anión fisiológico glutamato Glu^- (100mM K Glu^-). De acuerdo a los estudios cinéticos de formación del RPo, este cambio aumenta considerablemente la constante de equilibrio de formación (~30 veces) y el tiempo de vida media del RPo de 6h a*

~1 día (Kontur *et al.*, 2010). Por lo tanto, se espera que la diferencia de energía libre en el equilibrio, entre el estado enrollado y desenrollado, aumente.

- *Condición 3: Aumento de la fuerza iónica del medio (de 50 a 300mM KCl).* Si el rip/zip involucra una interacción DNA-proteína, la energía libre en el equilibrio debe reducirse por este efecto; tal como se muestra en Roe & Record, 1985.

Como se mencionó en los resultados, las tres condiciones usadas confirman que el rip y zip corresponden al desenrollamiento y enrollamiento del complejo entre la RNAP- σ 70 de *E. coli* y el promotor λ PR.

A diferencia de los estudios con AFM, en el presente estudio, todos los complejos RPo entre fueron seleccionados con 200 μ g/ml heparina (ver Figura 11, carril III y IV; los complejos específicos no son afectados por el uso de cantidades mayores de heparina). Los RPo son complejos DNA-proteína resistentes a heparina, mientras que el R_{Pc} y el intermediario I_1 no lo son (Davis *et al.*, 2007; Saecker *et al.*, 2011; Kontur *et al.*, 2010). Además, a pesar que el intermediario I_2 es resistente a heparina, este es inestable relativo al RPo a temperaturas mayores a 15°C (Kontur *et al.*, 2008). De lo mencionado, a pesar que muchos estados intermediarios de la cinética de formación del RPo ($R_{Pc} \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow R_{Po}$) son posibles, el RPo es seleccionado por la adición de heparina y por la temperatura de trabajo del microscopio de pinzas ópticas (23°C).

Como se observa, se ha desarrollado un sistema experimental que permite el estudio de la interacción DNA-proteína del complejo RPo enrollado del inicio de la

transcripción. En el futuro, la misma aproximación puede usarse para el estudio del enrollamiento en otros promotores como el tRNA^{tyr}, *hdeAB* y *Bla*, y además se podrá evaluar el efecto del ppGpp, σ^{54} , DksA, antibióticos, entre otros.

VIII.3 Longitud de persistencia del DNA

La rigidez del ADN no es constante sino que depende fuertemente del medio en el que se encuentra. En nuestras condiciones experimentales (20mM Tris HCl, 40mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 8.0 y 23°C), se obtuvo una longitud de persistencia de $P \sim 20\text{nm}$. Desde los primeros artículos (Smith *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996), se ha observado un $P \sim 50\text{nm}$ para 10 mM Na⁺ y que este aumenta al disminuir la concentración de sodio, con valores de ~ 67 y 130 nm a 1 y 0.1 mM de Na⁺, respectivamente. Estudios más detallados muestran que el P depende del pH y cationes monovalentes y este, para todas las condiciones, es 40nm (Williams *et al.*, 2001; Wenner *et al.*, 2002). A pesar que el $P \sim 20\text{nm}$ para nuestros experimentos parece muy bajo, otro estudio reporta un $P \sim 30\text{nm}$ (Rodríguez P., Comunicación personal). Futuros experimentos mostraran la dependencia del P con la concentración de cationes divalente, DTT y temperatura (en el Anexo 5 se explica que no existe diferencia significativa si consideramos P desde 10 hasta 50nm).

VIII.4 Dos tipos de complejos RPo enrollados

Una de las ventajas del uso de moléculas individuales es que se pueden resolver poblaciones cuya señal se ve promediada en métodos *in multiplo* o *bulk* (geles, fluorescencia), ver Figura 31. Supongamos que la distribución de una medida (por

ejemplo longitud de contorno) es muy estrecha, entonces los estudios en bulk mostraría una señal promedio $\langle x \rangle$ la cual corresponde con el promedio real. Sin embargo, si la población real presenta una longitud de contorno amplia o bimodal, los estudios en *bulk* daría la misma señal $\langle x \rangle$; dando una falsa interpretación de resultados (Bustamante, 2008).

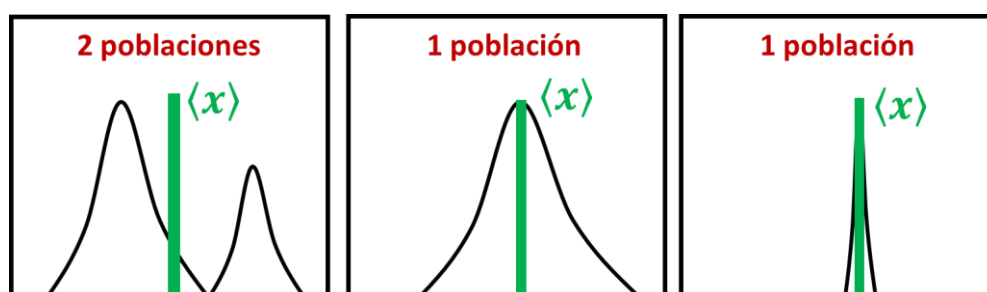


Figura 31: Comparación de resultados en *bulk* o *in multiplo* (verde) e *in singulo* o de moléculas individuales (negro).

En el presente estudio, sorprendentemente se observaron dos tipos de complejos enrollados RPo, llamados RPo 1 y 2, los cuales presentan transiciones 1a y 1b, y 2, respectivamente. Sin embargo, estos resultados no son tan extraños como parecen ya que estudios cinéticos de formación y de *footprinting* del RPo muestran al menos dos tipos de RPo; los cuales son dependientes de la presencia de Mg^{+2} y difieren en la cantidad de DNA *downstream* del promotor λ PR involucrado en interacción (Δ de ~ 25 pb) con los *downstream mobile elements* (DMEs) del *jaw* de la subunidad β' de la RNAP de *E. coli* (Suh *et al.*, 1993; Craig *et al.*, 1998; Drennan *et al.*, 2013). Usando la ecuación,

$$\langle O \rangle_{bulk} = \langle O_1 \rangle p_1 + \langle O_2 \rangle p_2$$

Donde $\langle O \rangle_{bulk}$ es un valor promedio teórico observado en experimentos en bulk; $\langle O_1 \rangle$ y $\langle O_2 \rangle$ son los valores promedios observados de cada población; y p_1 y p_2 son las probabilidades o frecuencia de observar la población 1 y 2 en experimentos de moléculas individuales, respectivamente. De acuerdo a esto, si nuestro observable es la longitud de contorno a fuerza cero, entonces tenemos que $\langle O_1 \rangle \sim 120$ (ΔL_c total del RPo 1, ~ 70 y ~ 50 pb de la transición 1a y 1b, respectivamente) y $\langle O_2 \rangle \sim 50$ pb (RPo 2); y $p_1 = 0.2$ y $p_2 = 0.8$ (Tabla 6 y 8), se obtiene un $\langle O \rangle_{bulk} \sim 64$ pb, lo cual va acorde a los resultados de *footprinting* y de AFM entre la RNAP- $\sigma 70$ de *E. coli* y el promotor λ PR (Craig *et al.*, 1998; Rivetti *et al.*, 1999; Doniselli *et al.*, 2015).

Como se observó en los resultados, el anión glutamato afecta principalmente a la transición 1a, a nivel de F_{rip} , F_{zip} y $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$, ver Figura 22 y Tabla 6, y Figura 23A y Tabla 9, respectivamente. De lo mencionado, podemos especular lo siguiente: i) la transición 1a ($Wab \rightarrow Wb$) del RPo 1 corresponde a la interacción entre la RNAP y la región *downstream* del promotor λ PR, y ii) que dicha interacción está ausente en el RPo 2. Lo anterior podría ser confirmado si se realizan experimentos con mutantes de RNAP del *jaw* (Δ JAW RNAP por ejemplo).

VIII.5 Dinámica del complejo RPo enrollado

El complejo RPo 1 y 2 presentan las transiciones 1a y 1b, y 2, respectivamente. Como se reporta en los resultados, la respuesta de 1b y 2 frente al cambio de secuencia,

glutamato y aumento de la fuerza iónica, son similares. Debido a lo anterior, podemos mencionar:

- *Enrollamiento del RPo 1.* Se produce en tres reacciones las cuales involucra pasar del estado totalmente desenrollado (U) a un intermediario (Wb) de forma 100% cooperativa ($U \rightarrow Wb$) donde se unen ~ 50 pb. Luego, Wb enrolla ~ 7 pb más de forma no cooperativa ($Wb \rightarrow Wb'$); y finalmente Wb' pasa al estado totalmente enrollado (Wab) de forma 100% cooperativa ($Wab \rightarrow Wb$), enrollando ~ 70 pb. De forma global, el proceso sigue $U \rightarrow Wb \rightarrow Wb' \rightarrow Wab$. Mientras que el desenrollamiento, sigue el proceso $Wab \rightarrow Wb \rightarrow U$, 100% cooperativo (Figura 14A y 33).
- *Enrollamiento del RPo 2.* Se produce en una reacción totalmente cooperativa ($U \rightarrow Wb$) y la inversa es el desenrollamiento; para ambos, ~ 50 pb están involucrados (Figura 14A y 33).

Como se mostró en los resultados, el proceso $U \rightarrow Wb$ (transición 1b o 2) y $Wb \rightarrow Wb'$ son principalmente afectados por la mutación *upstream*; el $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ aumenta en $\sim 40-60\%$ y el $\langle w^{dis} \rangle$ aumenta a $\sim 4 - 6$ veces, con respecto a la secuencia λ PR silvestre (Figura 23A, Figura 24 y Tabla 9). Lo anterior da soporte a la hipótesis de que el proceso $U \rightarrow Wb$ involucra la región *upstream* del promotor; y $Wb \rightarrow Wab$, el DNA *downstream*,

VIII.6 Cantidad de DNA involucrado en el enrollamiento

Como se muestra en la Tabla 8, el RPo tipos 1 y 2, formado entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR, involucran el enrollamiento de ~ 120 y 50 pb, respectivamente. Contrariamente a lo reportado en este estudio, usando la microscopía de fuerza atómica (AFM) se reporta que el DNA enrollado es ~ 90 pb y con una distribución unimodal (Rivetti *et al.*, 1999; Mangiarotti *et al.*, 2009; Maurer & Travers, 2006; Doniselli *et al.*, 2015); sin embargo, podemos considerar que las mediciones presentadas en esta tesis son más exactas, ya que las mediciones en pinzas ópticas salvan una serie de desventajas propias de los estudios por AFM, a saber:

- Los complejos DNA-proteína son depositados sobre una superficie saturada con cationes Mg^{+2} , y la formación de complejos coordinación Mg^{+2} -DNA. Aunque esto mostró no afectar significativamente la flexibilidad de constructos de ADN entre 300 y 1200 pb que mostraron un adecuado equilibrio de difusión en la superficie (Rivetti *et al.*, 1996), la interacción electrostática Mg^{+2} -RNAP podría modificar o competir con la asociación del DNA enrollado alrededor de la RNAP (Bustamante & Rivetti, 1996).
- Interacciones entre la sonda del microscopio (“tip”) y la muestra afectan la estructura de los complejos DNA-proteína, ya que las fuerzas electrostáticas y de van der Waals, originadas por la interacción solvente-tip-muestra en la superficie de la mica del AFM, pueden ejercer fuerzas en el rango de 10^2 - 10^4 pN (Bustamante & Rivetti, 1996).

- Dificultad de medición de cambios de extensión menores a 12nm debido a la baja resolución de las fotografías tomadas, que fue de 4 x 4nm/píxel (Cellai *et al.*, 2007; Doniselli *et al.*, 2015).
- No se puede asegurar que todos complejos DNA-proteína visualizados son RPo ya que la heparina no es adicionada durante la reacción de formación de los complejos enrollados, debido a que esta interferiría con la unión del DNA a la superficie de la mica del AFM (Rivetti *et al.*, 1999; Doniselli *et al.*, 2015).

Como se describe en la metodología, los datos de cambios de extensión y fuerza del rip/zip se usaron para estimar el cambios de extensión a fuerza cero o longitud de contorno (ΔL_c); para esto, se usó el modelo WLC (*worm like chain model*), ver Figura 17 y 18. Ya que la longitud de persistencia P del DNA es una propiedad del polímero, el DNA desenrollado/enrollado unido a la RNAP tiene como parámetro de medida de rigidez el mismo P , el cual es ~ 20 nm para nuestras condiciones experimentales (20mM Tris HCl, 40mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 8.0 y 23°C). Como se observa en la figura 17 y 18, la distribución de puntos, en relación a la extensión, es muy amplia y el modelo WLC parece que no se ajusta perfectamente; esto se puede deber a varias razones:

- *El DNA enrollado y desenrollado se estira a fuerzas del rip/zip en el régimen de polímero rígido.* El modelo WLC, se ajusta y predice muy bien el comportamiento de polímeros donde la longitud de contorno es mucho mayor al valor de su P ($\Delta L_c \gg P$), conocido como régimen de polímero flexible (Smith *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996). Cuando el

$\Delta L_c \sim P$ o $\Delta L_c < P$ nos encontramos en el régimen de polímero semirrígido y rígido, respectivamente (Waigh, 2007). En el presente estudio se observa el régimen $\Delta L_c \sim P$ ya que los $\Delta L_c \sim 15 - 24\text{nm}$, y $P \sim 20\text{nm}$, para todas las condiciones estudiadas (Tabla 8 y 12).

- *El enrollamiento no-cooperativo.* Medido como el $\Delta\Delta L_c$, este varía desde 2 a 6nm (Tabla 8 y 12) y la contribución a la medida de los cambios de extensión no es clara.
- *El desconocimiento de la estructura del complejo RPo enrollado.* Hasta la fecha no existe ninguna estructura cristalina o de cryo-EM del complejo. Debido a esto, es difícil comparar los valores de ΔL_c con una referencia estructural.

A pesar de las razones mencionadas de los problemas de la aplicación del modelo WLC a los datos de cambios de extensión vs fuerza, este modelo constituye la mejor aproximación hasta la fecha. Futuros estudios teóricos en estadística de polímeros aplicados al régimen semirrígido o rígido mejorarían la estimación de ΔL_c . Como se observa en la Tabla 7 y 8, las medidas de cambios de extensión y longitud de contorno son muy similares. Esto se debe a que estamos en el límite del régimen entrópico, que comprende de 0.01 a 10pN (Smith *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 1994) ya que la fuerza de ocurrencia del rip/zip es menor a 12pN para todas las condiciones estudiadas (Tabla 6).

VIII.7 Cooperatividad del enrollamiento

En los experimentos de moléculas individuales, la longitud de contorno del desplegamiento y plegamiento, $\Delta L_c(rip)$ y $\Delta L_c(zip)$ respectivamente, de moléculas de RNA y proteínas son similares, es decir se observa que $\Delta L_c(rip) - \Delta L_c(zip) = 0$ (Li *et al.*, 2006; Liphardt *et al.*, 2001; Cecconi *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2007; Elms *et al.*, 2012). Lo mencionado anteriormente, indica que se pliega la cantidad de polímero que se desplegó de forma súbita (rip/zip).

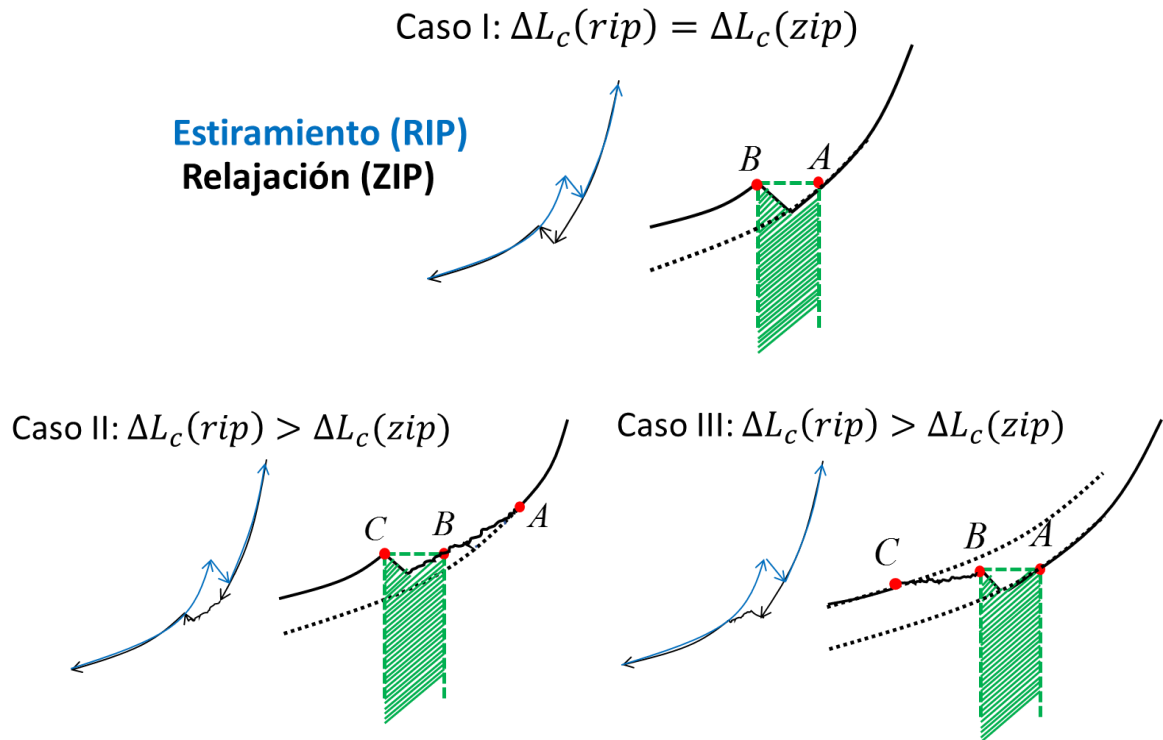


Figura 31: Diagrama donde se muestra los casos totalmente cooperativos (caso I) y no cooperativos (caso II y III). El caso I es cuando el enrollamiento (negro) ocurre tan cooperativamente como el desenrollamiento (azul), aquí el proceso sigue dos pasos $A \rightarrow B$; el caso II y III ocurren cuando el proceso no cooperativo ocurre antes y después del salto cooperativo $A \rightarrow B$ y $B \rightarrow C$, respectivamente.

En general podemos mencionar 3 casos:

- *Caso I*, $\Delta L_c(rip) = \Delta L_c(zip)$. Indica que el desenrollamiento y el enrollamiento son igualmente cooperativos (Figura 32). Aquí, el trabajo realizado es irreversible y se compone –energéticamente- de trabajo reversible -o en el equilibrio- y trabajo disipado. Este caso explica la reacción $Wb \leftrightarrow U$ (transición 2 o 1b).
- *Caso II y III*, $\Delta L_c(rip) > \Delta L_c(Wzip)$. Indica que parte del proceso de enrollamiento ocurre de forma no-cooperativa o lenta (saltos no abruptos); en otras palabras, de forma reversible (Figura 32). Este proceso no disipa trabajo y es <5 pN.nm para todas los experimentos. Este caso explica la reacción de enrollamiento de la Transición 1a: $Wb \xrightarrow{no-coop} Wb' \rightarrow Wab$.

La no-cooperatividad $Wb \xrightarrow{no-coop} Wb'$ para el complejo enrollado RPo 1 involucra tan solo ~ 6 pb (2nm), lo cual es muy difícil de medir en el microscopio de pinzas ópticas (ruido típico ~ 2 nm). Sin embargo, como se vio en los resultados (Tabla 8) el efecto del cambio de secuencia del promotor λ PR incrementa la no-cooperatividad hacia ~ 15 pb o 5nm (~ 2 veces), cantidad que si puede ser medida por las pinzas ópticas.

VIII.8 Termodinámica del enrollamiento

Como se observa, en la Figura 19, la distribución del trabajo de desenrollamiento $W_{w \rightarrow u}$ y enrollamiento $W_{u \rightarrow w}$ se intersectan. Gracias a esto, es posible aplicar el teorema de fluctuación de Crooks para estimar la diferencia de energía libre

en el equilibrio o trabajo reversible $\Delta G_{u \rightarrow w}$ a partir de nuestros experimentos fuera del equilibrio o irreversibles (Collin et al., 2005).

La transición 1a (del RPo 1) involucra la reacción de desenrollamiento $Wab \rightarrow Wb$ y enrollamiento $Wb \xrightarrow{no-coop} Wb' \rightarrow Wab$. Pero solo $Wab \rightarrow Wb$ y $Wb' \rightarrow Wab$ son procesos cooperativos y su trabajo irreversible es medible experimentalmente. Debido a esto y, hablando estrictamente, no sería posible aplicar el teorema de fluctuación de Crooks ya que estamos “violando” una de sus asunciones. El teorema de fluctuación asume que: i) El sistema estudiado está compuesto de dos estados 1 y 2; ii) Se conoce los valores del trabajo irreversible de $1 \rightarrow 2$ y de $2 \rightarrow 1$; y iii) propiedad markoviana para los saltos cíclicos de $1 \rightarrow 2$ y de $2 \rightarrow 1$ (Crooks, 1998; Crooks, 1999). De lo mencionado, estaríamos violando la asunción i y ii, ya que observamos tres estados distintos y los valores que medimos corresponden a $Wab \rightarrow Wb$ y $Wb' \rightarrow Wab$. Para evaluar la magnitud del error que se incurre, hacemos la siguiente aproximación,

Específicamente, el trabajo irreversible de desenrollamiento (rip) para la transición 1a ($W_{Wab \rightarrow Wb}$) es,

$$W_{Wab \rightarrow Wb} = \Delta G_{Wab \rightarrow Wb} + W_{Wab \rightarrow Wb}^{dis}$$

Donde $W_{Wab \rightarrow Wb}^{dis}$ es el trabajo disipado del rip 1a. Mientras que el trabajo irreversible (total) de enrollamiento (zip) para la transición 1a ($W_{Wb \rightarrow Wab}$), se compone de la parte no-cooperativa ($W_{Wb \xrightarrow{no coop} Wb'}$) y cooperativa ($W_{Wb' \rightarrow Wab}$),

$$W_{Wb \rightarrow Wab} = \Delta G_{Wb \xrightarrow{no coop} Wb'} - W_{Wb \xrightarrow{no coop} Wb'}^{dis} + \Delta G_{Wb' \rightarrow Wab} - W_{Wb' \rightarrow Wab}^{dis}$$

Donde $\Delta G_{Wb' \rightarrow Wab} - W_{Wb' \rightarrow Wab}^{dis} = W_{Wb' \rightarrow Wab}$ y $W_{Wb' \rightarrow Wab}$ es el trabajo irreversible de $Wb' \rightarrow Wab$. Además, $\Delta G_{Wb \xrightarrow{no\ coop} Wb'}$ es el trabajo reversible del proceso no-cooperativo $Wb \xrightarrow{no\ coop} Wb'$ y $W_{Wb \xrightarrow{no\ coop} Wb'}^{dis}$ es su trabajo disipado. Integrando el área de la curva Fuerza-Extensión correspondiente al desplazamiento del ADN que se aleja del modelo WLC, obtuvimos un valor aproximado del trabajo no-cooperativo, $\Delta G_{Wb \xrightarrow{no\ coop} Wb'} \leq 5\text{pN.nm}$. Como se mencionó, el proceso no cooperativo es lento, por lo que podemos considerarlo reversible ($W_{Wb \xrightarrow{no\ coop} Wb'}^{dis} \approx 0$), por lo tanto $W_{Wb \xrightarrow{no\ coop} Wb'} \approx \Delta G_{Wb \rightarrow Wb'}$. Reemplazando lo mencionado tenemos,

$$W_{Wb \rightarrow Wab} = 5\text{ pN.nm} + W_{Wb' \rightarrow Wab}$$

Específicamente, los valores del trabajo irreversible $W_{Wb' \rightarrow Wab}$ para nuestras condiciones de λPR silvestre, λPR mutante, el reemplazo del anión cloro por glutamato, el aumento de la fuerza iónica y el ppGpp son $\sim 125, 140, 170, 125$ y 115 pN.nm, respectivamente (tabla 9 y 13). Se observa que $W_{Wb' \rightarrow Wab} \gg W_{Wb \xrightarrow{no\ coop} Wb'}$ ($\Delta \leq 4\%$), entonces podemos mencionar,

$$W_{Wab \rightarrow Wb} \approx W_{Wb' \rightarrow Wab}$$

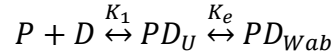
En otras palabras, el trabajo irreversible de $W_{Wab \rightarrow Wb}$ es aproximadamente igual al trabajo irreversible $W_{Wb' \rightarrow Wab}$ sin considerar el trabajo no-cooperativo. Además, ya que la diferencia de energía entre Wb y Wb' es pequeña, Wb' es energéticamente similar a Wb . Por lo tanto, es posible aplicar el teorema de fluctuación de Crooks a los procesos $Wab \rightarrow Wb$ y $Wb' \rightarrow Wab$.

Los cambios de energía calculados por manipulación mecánica pueden ser corregidos para estimar los valores que se obtendrían sin la influencia de la fuerza. Así, $\Delta G_{w \rightarrow u}$ es el trabajo reversible del rip/zip a una determinada fuerza; para estimar el $\Delta G_{u \rightarrow w}$ a fuerza cero ($\Delta G_{u \rightarrow w}^0$), se procedió a restar la contribución entrópica del DNA que rodea al promotor ($\sim 650\text{nm}$) y del DNA desenrollado a las fuerzas F_r (Liphardt *et al.*, 2001; Manosas & Ritort, 2005). De todo el análisis, se obtuvo:

- *Desenrollamiento del RPo 1.* La reacción $Wab \rightarrow Wb$ presenta con una diferencia de energía de $\Delta G_{Wab \rightarrow Wb}^0 \sim 100\text{pN.nm}$ y luego $Wb \rightarrow U$, involucra $\Delta G_{Wb \rightarrow U}^0 \sim 90\text{pN.nm}$ (Tabla 9). Sin embargo, para el enrollamiento de $Wb \rightarrow Wab$, Wb se enrolla de forma no cooperativa a Wb' , $Wb \rightarrow Wb'$ con $\Delta G_{Wb \rightarrow Wb'}^0 \sim 5\text{pN.nm}$ y luego $Wb' \rightarrow Wab$ de forma cooperativa.
- *Desenrollamiento del RPo 2.* Se produce la reacción $Wb \rightarrow U$ donde $\Delta G_{Wb \rightarrow U}^0 \sim 90\text{pN.nm}$.

Como este es el primer estudio de moléculas individuales que describe de forma detallada la termodinámica del enrollamiento del complejo RPo, es pertinente comparar los valores obtenidos con estudios anteriores. Midiendo la ocupancia del promotor λPR , con la RNAP, utilizando moléculas de DNA sobre una superficie de mica de AFM, Doniselli *et al.*, (2015) logró estimar un ΔG de $\sim 50\text{KJ/mol}$ que equivale a $\sim 80\text{pN.nm}$; y una constante de equilibrio de disociación (K_d) de $\sim 3.5\text{nM}$. Como se podrá notar, este ΔG corresponde a la diferencia de energía libre entre el complejo formado y las moléculas RNAP y λPR separados ya que K_a es de segundo orden. Es

claro que este ΔG no equivale a la diferencia de energía libre entre el estado enrollado y desenrollado. Si pensamos en el siguiente mecanismo,



Donde P es la proteína y D el DNA (RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR para nuestro caso) K_1 es la constante de equilibrio de formación del complejo DNA-proteína desenrollado, y K_e la constante de equilibrio del enrollamiento. Mientras que PD_U es el complejo DNA-proteína desenrollado y PD_{Wab} , el complejo enrollado. De acuerdo a esto, K_a es la constante de equilibrio de formación entre $P + D \xrightleftharpoons{K_a} PD_{Wab}$. Por lo tanto se cumple que $K_a = \frac{1}{K_d} = K_e K_1$. Si tomamos en consideración el RPo 1 que es el más abundante (80%), este tiene un $\Delta G_{w \rightarrow u}$ de ~ 90 pN.nm que corresponde a $K_e \sim 6 \times 10^9$. Reemplazando valores se obtiene, $K_1 \sim 0.5 \text{ M}^{-1}$ o una constante de disociación del complejo desenrollado $K_{-1} \sim 20 \times 10^9 \text{ nM}$; que corresponde con una energía de ~ 10 pN.nm. Como se observa, la estabilidad del complejo RPo enrollado es en gran parte debido al enrollamiento.

VIII.9 Efecto de la secuencia *upstream*

La expresión de promotores fuertes (λ PR, *LacUV5*, *rrnB* P1 y P2, *rrnD* P1, *merT*, *leuV*, *tRNA^{tyr}*, *hdeAB*, Pm del fago mu, etc.), comúnmente, presentan una o varias regiones *upstream* (UP) de la caja -35 (cortas secuencias *AT-rich*), las cuales interaccionan de forma inespecífica con el dominio C-terminal de la subunidad α (α CTD) y estimulan la transcripción en 90-300 veces en ausencia de factores

transcripcionales (Schickor *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1998, Ma & Howe, 2004; Cellai *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2004; Ross & Gourse, 2004).

Como se mencionó, el cambio de secuencia (*AT-rich* por una *random*) tuvo como objetivo saber si las señales observadas (*rip/zip*) correspondían a la interacción DNA-proteína del complejo RPo enrollado entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR. Se observó que, la fuerza de desenrollamiento F_r y enrollamiento F_z aumenta (~ 2 pN para cada transición) con respecto a los complejos RPo formados por el promotor λ PR silvestre (Tabla 6), lo que confirma que estas secuencias influyen en la interacción.

Según los estudios mediante AFM, el promotor mutante estudiado aquí reduce la cantidad de DNA enrollado en ~ 10 nm con respecto al λ PR silvestre (Mangiarotti *et al.*, 2009). Además otros autores proponen que una medida de estabilidad del RPo es la cantidad de DNA enrollado (Rivetti *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2005; Maurer *et al.*, 2006; Cellai *et al.*, 2007; Doniselli *et al.*, 2015). De forma contradictoria, aquí se reporta que la cantidad del DNA involucrado en el enrollamiento se mantiene en ~ 120 y 50pb para el RPo 1 y 2 para ambas secuencias (Tabla 8). Lo cual tiene sentido ya que la región *upstream* interacciona con el α CTD, porción de la subunidad alfa que es muy dinámica en movimiento gracias a la estructura del α -*linker*, que lo une a la porción N-terminal de la misma subunidad (α NTD) (Cellai *et al.*, 2007). Como se menciona más abajo, el principal cambio es en la cooperatividad y la diferencia de energía libre. Por lo tanto, podemos concluir que cambiar la cantidad de ADN enrollado, no es condición necesaria ni suficiente para cambiar la estabilidad de un complejo RPo.

Como se muestra en los resultados, la mutación *upstream* aumentó de la diferencia de energía libre ($\Delta G_{u \rightarrow w}^0$) en ~ 30 , 40 y 60% para las transiciones 1a, 1b y 2,

respectivamente (Tabla 9). Ya que el principal cambio ocurre en la transición 1b y 2 (reacción $Wb \rightarrow U$) podemos sugerir que dichas señales involucran la interacción del DNA *upstream* con la RNAP.

Davis *et al.*, (2004) mostró que, por el reemplazo de la secuencia *upstream* de -60 a -42 del λ PR, observó el aumento de la constante de velocidad de formación del primer intermediario I_1 (~36 y 7 veces a 17 y 37°C) y aumento de su constante de equilibrio (~2 veces); pero sin cambios en la disociación del complejo RPo. Además, el promotor trunco UT-47 λ PR aumenta la estabilidad del estado parcialmente enrollado I_{1E} y el proceso $RPc \rightarrow I_{1E}$ es cinéticamente más rápido (Ruff *et al.*, 2015). Lo mencionado va acorde con estudios similares con el promotor *lacUV5* (Ross & Gourse, 2004). Estructuras cristalinas, modelos computacionales y medidas experimentales mediante *Tethered Particle Motion* (TPM) muestran que secuencias *AT-rich* doblan el DNA entre 9-20° (MacDonald *et al.*, 2001; Stefl *et al.*, 2004; Brunet *et al.*, 2015). De acuerdo a lo mencionado, podemos sugerir que el grado de curvatura intrínseca (Davis *et al.*, 2004) o ausencia de curvatura (Ruff *et al.*, 2015) afecta el paso $RPc \rightarrow I_{1E}$ por su efecto directo sobre el I_{1E} : la estabilidad del I_{1E} se reduce por disminución del DNA “pre-doblado”. Por lo tanto, podemos describir dos escenarios,

- *La RNAP- $\sigma 70$ se une a una secuencia λ PR silvestre (-100/+30) pre-doblada:* la RNAP se une al promotor y no “paga” mucha cantidad de energía para doblar parcialmente el DNA y formar el I_{1E} (ver Figura 32).
- *La RNAP- $\sigma 70$ se une a una secuencia λ PR mutante (-75/+30) aleatoria:* A diferencia de la secuencia *AT-rich*, una secuencia *random* no “pre-dobla” el

DNA y, debido a esto, la RNAP tiene que “pagar” más energía para doblar la misma cantidad de DNA, que el promotor λ PR silvestre, para formar I_{1E} (Figura 32).

En 1995, Parvin *et al.*, (1995) demostraron que la caja TATA pre-doblada en el surco mayor o menor aumenta la constante de equilibrio de unión de la proteína a la caja TATA (TBP) entre ~ 100 -300 veces con respecto a un DNA lineal. Ahora, uno puede preguntarse, Si I_{1E} es menos estable por secuencias menos “pre-dobladas” o random (como la mutante $-75/+30$ λ PR estudiada aquí), ¿Como la secuencia del λ PR mutante genera complejos RPo enrollados con más $\Delta G_{u \rightarrow w}^0$? ¿No debería ser menor y en concordancia con Parvin *et al.*, (1995)? Una posible explicación, relacionada al mecanismo de formación del RPo, a estas interrogantes se mencionará más adelante (ver Figura 32)

La idea anterior, también propone una explicación de cómo el trabajo disipado aumenta de ~ 20 a 45 pN.nm y de ~ 11 a 40 pN.nm para la reacción $Wab \rightarrow Wb$ y $Wb \rightarrow Wab$, respectivamente, de la transición 1a del RPo 1; y de ~ 0.6 a 6 pN.nm y de 0.6 a 5 pN.nm para la reacción $Wb \rightarrow U$ y $U \rightarrow Wb$, respectivamente, de la transición 2 del RPo 2 (Tabla 9). Esto se explicaría porque al haber un cambio de configuración más pronunciado en el caso del ADN random, esto implicaría un mayor pasaje a través del solvente y cambios más drásticos de interacción con él y, por lo tanto, más trabajo disipado en la perturbación fuera del equilibrio.

Otro cambio importante es el aumento de la no-cooperatividad de ~ 6 a 14 pb (2 veces) del proceso $Wb \rightarrow Wb'$ (Tabla 8); el cual podría estar relacionado con la

interacción del DNA *downstream* y los DME del *jaw* de la subunidad β' de la RNAP. Sin embargo, si la transición 1b y 2 involucra la interacción del DNA *upstream* ¿Por qué afecta a la transición 1a que involucra la interacción con DNA *downstream*? Podemos pensar en una conexión alostérica entre el enrollamiento *upstream* y *downstream*; ya que, como mostró Davis *et al.*, (2004), mutaciones en la región -60 a -42 del DNA *upstream* del λ PR reducen la protección del DNA *downstream* en ensayos de *footprinting*.

VIII.10 Efecto de reemplazo del anión cloro por glutamato

En el caso del promotor λ PR, el reemplazo del anión cloro (Cl^-) por glutamato (Glu^-), a concentraciones de 230mM, aumenta la constante de asociación de segundo orden de formación del intermediario I_1 (k_a) en ~ 30 veces lo que aumenta la constante de equilibrio de formación de RPo en ~ 37 veces (Kontur *et al.*, 2010). En otras palabras, el glutamato incrementa la estabilidad de la interacción del complejo enrollado entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR. Lo anterior también se ha observado para las endonucleasas *EcoRI*, *AccI*, *AvaII*, *HphI*, *NdeI*, *SalI* y *SmaI* (Leirmo *et al.*, 1987). Los autores proponen que el Glu^- se une débilmente a la superficie de la RNAP, en relación al Cl^- , y por lo tanto su superficie se encuentra más hidratada, lo cual facilita la reorganización del *jaw* de β' y aumenta su unión al DNA *downstream* durante el proceso $I_2 \rightarrow \text{RPo}$ de la cinética del λ PR (Leirmo *et al.*, 1987; Kontur *et al.*, 2010). La interacción del β' y con el DNA *downstream* ha sido confirmado por uso de la mutante

Δ JAW RNAP; el cual reduce el k_a en ~ 50 veces y no protege el DNA *downstream* desde -5 a +20 del radical OH (Drennan *et al.*, 2013).

Acorde a los anterior, en el presente estudio se reporta que, a 100mM de KGlu, la diferencia de energía libre y energía por par de base aumenta en ~ 30 , 40 y 30%, y en 30, 20 y 20% para las transiciones 1a, 1b y 2, respectivamente. Ya que las transiciones 1b y 2 corresponden al enrollamiento del DNA *downstream* (también es apoyado el aumento de fuerza iónica); podemos mencionar, y de lo dicho anteriormente, que la transición 1a corresponde la interacción del DNA *downstream* y la RNAP. El aumento de la estabilidad entre el DNA *upstream* y la RNAP puede deberse a la conexión alostérica con el enrollamiento del DNA *downstream* (Davis *et al.*, 2004). Gracias a este experimento, y junto al efecto de la mutante, confirman que las señales observadas (rip/zip) corresponden al complejo RPo enrollado.

Cabe mencionar que una *mayor estabilidad del complejo RPo enrollado no indica mayor actividad transcripcional ya que la RNAP tendría que hacer más trabajo para escapar del promotor y pasar a elongación para formar el RNA*. Lo anterior va acorde con ensayos de *footprinting*, con DNasaI del promotor osmY con la RNAP- σ^S , que muestran una reducción de la protección *upstream*, permitiendo más facilidad de escape del promotor; y que la actividad el λ PR con RNAP- σ^{70} se debilita (Lee & Gralla, 2004). Debido a esto, los autores proponen que los promotores σ^{70} y σ^S responde de forma negativa y positiva (en actividad) frente a aumento osmótico del anión fisiológico glutamato.

VIII.11 Efecto del aumento de la fuerza iónica

La mayoría de las interacciones DNA-proteína son de tipo electrostáticas, ya que el DNA es un polielectrolito aniónico. Mediante estudios cinéticos, se ha demostrado que el aumento de la fuerza iónica (I) reduce la constante de equilibrio de formación del complejo RPo (K_a) (Roe & Record, 1985; Łoziński *et al.*, 2009a; Łoziński *et al.*, 2009b). Además, la constante de formación de oligolisinas (polielectrolito catiónica) al DNA se reduce por el aumento del I (Record *et al.*, 1998). De lo mencionado, queda claro que el principal componente que estabiliza la interacción entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR, en los complejos RPo enrollados, es de tipo electrostática gracias a aminoácidos positivos como Lys y Arg.

En concordancia con lo anterior, en este estudio (aumento de 50 a 300mM de KCl) se observa que para la transición 1b y 2, la diferencia de energía libre se reduce en ~15 y 20%, respectivamente. Sin embargo, este aumenta en 10% para 1a; lo cual da una reducción global de ~6.3pN.nm para el RPo 1 y ~18pN.nm para el RPo 2. Lo anterior confirma que:

- *La transición 1b y 2 (reacción $Wb \rightarrow U$) corresponden al desenrollamiento del DNA upstream. Ya que eso implicaría la interacción electrostática inespecífica entre los fosfatos del DNA upstream y los aminoácidos positivos del α CTD de la RNAP.*
- *La transición 1a (reacción $Wab \rightarrow Wb$) corresponde al desenrollamiento del DNA downstream. Ya que dicha interacción involucra el reordenamiento de*

dominios no estructurados (DME) del *jaw* de la subunidad β' ; en este proceso, estarían implicados aminoácidos apolares, polares y cargados.

También se observa que la cantidad de DNA involucrado se reduce en ~15 y 8pb para el RPo 1 y 2, respectivamente. Sorprendentemente, no se observaron cambios en la cooperatividad de la transición 1 a ($UW_1 \rightarrow UW_2$). Podemos concluir que, *el aumento de la fuerza iónica, reduce la estabilidad del complejo enrollado RPo y la cantidad de DNA involucrado.*

VIII.12 Efecto del ppGpp

En bacterias, la “respuesta estricta” (RE) es el principal mecanismo de adaptación frente a cambios y estrés ambiental; y es activado por el ppGpp o guanosina tetrafosfato (Traxler et al., 2008). En *E. coli*, el ppGpp se une a la RNA polimerasa (RNAP), factor de traducción IF2, lisina descarboxilasa, Obg GTPasa, exopolifosfatasa y DNA primasa (DnaG); pero el mayor impacto se produce sobre la RNAP (Kriel et al., 2013). La transcripción sufre el mayor impacto por el ppGpp ya que, en esta etapa, se produce el primer paso de la expresión del código genético. El ppGpp fue descubierto hace 45 años (Potrykus & Cashel 2008) y el paradigma de la modulación de la transcripción por ppGpp indica que, principalmente, actúa a nivel de la iniciación dependiente del tipo de promotor (Barker et al., 2001a; Barker et al., 2001b; Potrykus et al., 2002; Murray et al., 2003; Łyzen et al., 2009; Wagner, 2002; Paul et al., 2004).

A concentraciones saturantes de ppGpp ($100\mu\text{M}$) se ha observado que, mediante AFM, estimula el desenrollamiento de ~30 a 15nm y no modifica la diferencia de energía libre de la formación del complejo enrollado (Doniselli et al.,

2015). Contrariamente a lo anterior, aquí se ha observado que a $100\mu\text{M}$ de ppGpp, la cantidad de DNA en el complejo RPo 1 enrollado se reduce en ~ 10 y 15pb de las reacciones $Wab \rightarrow Wb$ (1a) y $Wb \rightarrow U$ (1b); mientras que para el RPo 2, se reduce en $\sim 13\text{pb}$ para $Wb \rightarrow U$ (Tabla 12). Lo anterior da un total de $\sim 25\text{pb}$ o 9nm , el cual es el 60% de lo reportado. Estas diferencias se pueden explicar por la baja resolución del AFM (10nm), el efecto del tip del AFM sobre el complejo DNA-proteína, la interacción mica- λPR -RNAP, y el desconocimiento si el complejo DNA-proteína con ppGpp pre-incubado es RPo (Bustamante & Rivetti, 1996; Cellai *et al.*, 2007; Doniselli *et al.*, 2015). Además, el ppGpp, de la misma manera que el cambio de secuencia, aumenta ~ 2.5 veces la no-cooperatividad $Wb \rightarrow Wb'$ (Tabla 12).

Otro efecto importante del ppGpp, es que reduce la diferencia de energía libre en 27 y 11% para la transición 1b y 2, respectivamente; pero la aumenta en $\sim 9\%$ para el tipo 1a. En otras palabras, el ppGpp aumenta la estabilidad de la interacción RNAP con el DNA *downstream* (1a, $Wab \rightarrow Wb$); y la reduce, para el DNA *upstream* (1b y 2, $Wb \rightarrow U$). Sin embargo, el efecto global es la reducción de la estabilidad del RPo. Como se mencionó anteriormente, si la RNAP se encuentra unida al promotor con más afinidad, le costaría escaparse de él para pasar a elongación. A favor de esta idea es que se ha reportado que, $250\mu\text{M}$ de ppGpp reduce la estabilidad del RPo del λPR en ~ 2 veces y dificulta el escape del promotor (Potrykus *et al.*, 2002). La reducción de estabilidad por ppGpp también se ha observado en los promotores como *rrnB* P1, *rrnD* P1, λPL , *LacUV5*, *argL*, *hisG* y *livJ* (Barker *et al.*, 2001). Podemos mencionar que, *el ppGpp aumenta la estabilidad de la interacción downstream lo cual dificulta el*

mecanismo de scrunching y, por lo tanto, el escape del promotor; pero este componente es apantallado por la reducción de la estabilidad de la interacción upstream.

En el promotor *rrnB* P2, se ha observado que el ppGpp favorece la formación de complejos R_{Pc} (81). Helnemann y Wagner (1997) proponen dicho modelo, el cual menciona que el ppGpp estabiliza los complejos R_{Pc}, el equilibrio entre R_{Po} y R_{Pc} se desplaza hacia R_{Pc} y la discriminación de los promotores regulados por ppGpp se produce en etapas tempranas de iniciación; lo cual va acorde que el enrollamiento ocurre en dichas etapas (Davis *et al.*, 2007).

El ppGpp afecta la vida media de los complejos R_{Po} de los promotores *rrn* P1 ya que estos presentan una vida media en un orden menor de los promotores no afectados por ppGpp; por ejemplo, promotores de genes para la síntesis de aminoácidos como *hisJ* o *argL* (Schneider *et al.*, 2003). Esto indica que la modulación positiva o negativa no se debe a una interacción diferencial del ppGpp con la RNAP, sino a la cinética de asociación promotor-RNAP (Barker *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2001b). Los promotores con larga vida no son inhibidos ya que estos escapan a la fase de elongación antes de que el complejo R_{Po} colapse en presencia de ppGpp (82). Este modelo es consistente con la observación de mutantes de *rrnB* P1 con alta vida que no son inhibidos por ppGpp (Barker *et al.*, 2001).

De lo todo lo mencionado proponemos que el ppGpp reduce la estabilidad global del R_{Po} de complejos muy estable y dificulta su escape del promotor por aumento de la estabilidad de la interacción DNA *downstream* con la RNAP. Por otro lado, como el enrollamiento ocurre tempranamente en la formación del R_{Po}, el ppGpp

podría estabilizar aún más el complejo enrollado, dependiendo del tipo de promotor, y dificultar pasos posteriores como la isomerización y formación del RPo, y de esta manera “congela” el proceso en el complejo cerrado (RPc). En el caso de promotores con baja estabilidad, el ppGpp reduce aún más su estabilidad, ocasionando que la RNAP se disocie del promotor hacia el solvente. *El balance entre la estabilidad del complejo RPo enrollado, el escape del promotor a elongación y la disociación hacia el solvente, podrían definir si el ppGpp estimula o reduce la fuerza de un promotor.*

VIII.13 Relación entre el trabajo disipado y la velocidad del proceso.

Como se observa en los resultados, ciertas condiciones aumentan, de forma considerable, el trabajo disipado pero ¿Cuál es su relación con el mecanismo de enrollamiento del RPo?, a continuación proponemos una explicación, la cual puede aplicarse al desplegamiento/plegamiento del RNA y proteínas.

Imaginemos que tenemos un proceso que se compone de dos estados 1 y 2, con una constante de velocidad $k_{1 \rightarrow 2}$ para el proceso $1 \rightarrow 2$ y $k_{2 \rightarrow 1}$ es para el proceso inverso; y que este es perturbado por una fuerza externa. Cuando la velocidad de la perturbación de $1 \rightarrow 2$ ($r_{1 \rightarrow 2}$) es mucho más rápido que $k_{1 \rightarrow 2}$ ($r_{1 \rightarrow 2} > k_{1 \rightarrow 2}$) se produce trabajo disipado ($W_{1 \rightarrow 2}^{dis} > 0$) debido a que nos encontramos en condiciones muy lejos del equilibrio o de forma irreversible; sin embargo, cuando $r_{1 \rightarrow 2} \approx k_{1 \rightarrow 2}$ la perturbación es en condiciones de equilibrio o reversibles ($W_{1 \rightarrow 2}^{dis} \approx 0$). Ahora, imaginemos que $k_{1 \rightarrow 2}$ se modifica por algún mecanismo (temperatura, pH, sales monovalentes, etc.), la cual llamaremos $k_{1 \rightarrow 2}^*$, pero el experimento se sigue realizando

a la misma velocidad $r_{1 \rightarrow 2}$, entonces es posible dos escenarios en condiciones de perturbación lejos del equilibrio,

- Cuando $k_{1 \rightarrow 2}^* > k_{1 \rightarrow 2}$, la velocidad del experimento es comparable al del proceso $1 \rightarrow 2$, es decir $k_{1 \rightarrow 2}^* \leq r_{1 \rightarrow 2}$; en otras palabras ahora el trabajo disipado es menor $W_{1 \rightarrow 2}^{dis*} < W_{1 \rightarrow 2}^{dis}$ o $W_{1 \rightarrow 2}^{dis*} \approx 0$.
- Cuando $k_{1 \rightarrow 2}^* \approx k_{1 \rightarrow 2}$, el trabajo disipado se mantiene $W_{1 \rightarrow 2}^{dis*} = W_{1 \rightarrow 2}^{dis}$ o $W_{1 \rightarrow 2}^{dis*} > 0$ ya que $k_{1 \rightarrow 2}^* < r_{1 \rightarrow 2}$.
- Cuando $k_{1 \rightarrow 2}^* < k_{1 \rightarrow 2}$, la velocidad del experimento se vuelve mucho más rápida relativo al proceso $1 \rightarrow 2$ o $k_{1 \rightarrow 2}^* \ll r_{1 \rightarrow 2}$ y, por lo tanto, se produce más trabajo disipado, $W_{1 \rightarrow 2}^{dis*} \ll W_{1 \rightarrow 2}^{dis}$ o $W_{1 \rightarrow 2}^{dis*} \gg 0$.

Ya que el trabajo disipado de $i \rightarrow j$ ($W_{i \rightarrow j}^{dis}$) se determina con el teorema de fluctuación de Crooks; ahora, podemos ir de forma inversa. Es decir, si la perturbación a una velocidad r genera un $W_{i \rightarrow j}^{dis}$ para la condición 1 y $W_{1 \rightarrow 2}^{dis*}$ para la condición 2 donde

- $W_{i \rightarrow j}^{dis} < W_{1 \rightarrow 2}^{dis*}$, podemos concluir que $k_{1 \rightarrow 2} > k_{1 \rightarrow 2}^*$.
- $W_{i \rightarrow j}^{dis} > W_{1 \rightarrow 2}^{dis*}$, podemos concluir que $k_{1 \rightarrow 2} < k_{1 \rightarrow 2}^*$.

VIII.14 El enrollamiento en el mecanismo de formación del RPo

A continuación resumiremos y mencionaremos los puntos más importantes a considerar para relacionar lo reportado en este estudio y la más reciente propuesta de

diagrama energético de la cinética de formación del RPo en el promotor λ PR (Ruff *et al.*, 2015).

1. El promotor λ PR mutante genera complejos RPo enrollados con mayor energía libre ($\Delta G_{u \rightarrow w}^0$) entre los estados enrollados y desenrollados en $\sim 50\%$ y cinéticamente más lento (trabajo disipado es $\sim 2 - 3$ veces en relación al promotor λ PR silvestre). Además, mencionamos que la mutación en la región *upstream* genera un DNA menos doblado y por lo tanto la RNAP hace más trabajo para enrollar el mismo DNA que la secuencia silvestre.
2. El reemplazo del anión cloro por glutamato incrementa $\Delta G_{u \rightarrow w}^0$ en $\sim 30\%$. De acuerdo a estudios cinéticos y de protección (*footprinting*) el glutamato facilita la interacción entre el β' Jaw y el DNA *downstream* en el paso $I_2 \rightarrow RPo$ para el promotor λ PR (Leirmo *et al.*, 1987; Kontur *et al.*, 2010).
3. El aumento de la fuerza iónica reduce el $\Delta G_{u \rightarrow w}^0$ en $\sim 20\%$. Ya que las interacciones entre la RNAP y el λ PR son principalmente electrostáticas (Roe & Record, 1985; Loziński *et al.*, 2009a; Łoziński *et al.*, 2009b), el principal efecto del aumento de la fuerza iónica es a nivel de los complejos donde el DNA se encuentre enrollado, los cuales sería el estado RPo , I_2 y I_{1L} de acuerdo a Ruff *et al.*, (2015).

De lo anterior proponemos que la mutante λ PR hace inestable el complejo I_{1E} ya que la RNAP tiene que hacer más trabajo para mantener el DNA doblado. La inestabilidad del I_{1E} ocasiona que el paso $RPC \leftrightarrow I_{1E}$ y $I_{1E} \leftrightarrow I_{1L}$ sean cinéticamente más lentos ya que la energía de activación aumenta, lo cual es explicado por el aumento

del trabajo disipado; y que la diferencia de energía libre ($\Delta G_{u \rightarrow w}^0$) entre el estado I_{1E} y el RPo , los cuales son representados por U y Wab para nuestro caso, aumenta (Figura 33, línea y flecha roja). En otras palabras el proceso $RPC \rightarrow I_{1E}$ abarca el doblar parcial del DNA de la región *upstream*. Esta idea es apoyada por el aumento de estabilidad de I_{1E} por efecto del promotor trunco *upstream* UT-47 λ PR (Ruff *et al.*, 2015); la RNAP no tiene que hacer trabajo para doblar el DNA ya que este ha sido eliminado (Figura 33, línea roja discontinua). El aumento de la fuerza iónica desestabilizaría, principalmente al estado I_{1L} , I_2 y RPo ya que el componente electrostático de superficie entre la región *upstream* y las α CTD es mucho mayor que en los estados desenrollados y parcialmente enrollados RPC y I_{1E} . Esta hipótesis explicaría la disminución del $\Delta G_{u \rightarrow w}^0$ entre el estado I_{1E} y el RPo (Figura 33, flecha ploma). Finalmente, el glutamato estabiliza el estado RPo , por favorecer el proceso $I_2 \rightarrow RPo$, y esto aumenta la $\Delta G_{u \rightarrow w}^0$ entre el I_{1E} y el RPo (Figura 33, flecha azul). Estructuralmente, ya que este proceso involucra la interacción entre el β' jaw y el DNA *downstream*, futuros estudios con la mutante ΔJAW RNAP ayudarán a corroborar dicha hipótesis.

Se mencionó que el ppGpp reduce el $\Delta G_{u \rightarrow w}^0$ (efecto similar al aumento de la fuerza iónica) y aumenta el trabajo disipado y la no-cooperatividad (similar al efecto de la secuencia *upstream* mutante del λ PR). Por lo tanto, postulamos que el ppGpp desestabiliza los estados I_{1E} , I_{1L} , I_2 y RPo donde el RPo sufre el mayor cambio de estabilidad; de esta manera i) el $\Delta G_{u \rightarrow w}^0$ es menor entre el I_{1E} y el RPo (U y Wab para nuestro caso), y ii) el proceso $RPC \rightarrow I_{1E}$ es cinéticamente más lento que en ausencia de ppGpp.

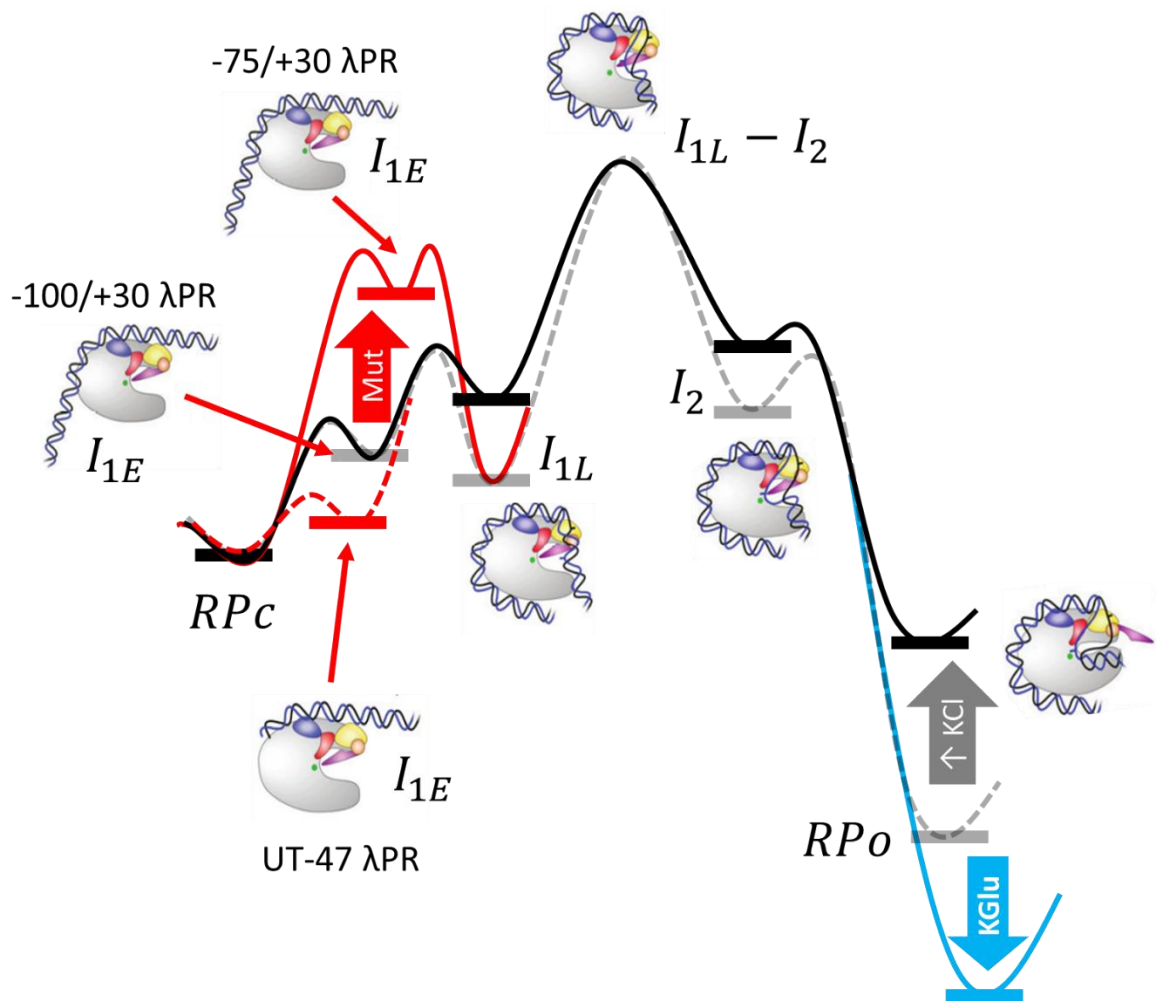


Figura 32: Paisaje energético de formación del complejo RPO en el promotor λ PR. Como se observa: i) el cambio de secuencia AT-rich por una random (-100/+30 por -75/+30 λ PR) en la región *upstream* reduce la estabilidad (flecha y curva roja) del estado I_{1E} y esto origina que el proceso $RPC \rightarrow I_{1E}$ sea más lento; ii) el anión glutamato estabiliza el estado RPO ya que favorece el proceso $I_2 \rightarrow RPO$ por efecto directo en los dominios no estructurados del β' jaw en interacción con el DNA *downstream* (flecha y curva azul); y iii) el aumento de la fuerza iónica desestabiliza los complejos I_{1L} , I_2 y RPO (flecha y curva negra). Además, el promotor trunco UT-47 λ PR estabiliza el estado I_{1E} . El diagrama energético de formación del RPO para el RPO a condiciones normales (50mM KCl y secuencia λ PR silvestre) se muestra en líneas punteadas. Imagen adaptada de Ruff *et al.*, (2015).

IX. CONCLUSIONES

1. Mediante la aplicación de fuerza mecánica sobre el DNA enrollado, la microscopía de pinzas óptica permitió perturbar el complejo RPo enrollado en condiciones fuera del equilibrio. Además, mediante la aplicación del teorema de fluctuación de Crooks, fue posible estimar el trabajo reversible o diferencia de energía libre en el equilibrio ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$) y trabajo disipado (W^{dis}) de los experimentos fuera del equilibrio o irreversibles.
2. El enrollamiento del DNA alrededor de la RNAP- $\sigma 70$, en el complejo RPo, es un proceso espontáneo que involucra un cambio importante de energía ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ entre ~ 20 y $40 K_B T$). Además, el $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ es principalmente afectado por el cambio de secuencia del promotor λPR , aumento de fuerza iónica, estabilizadores y el regulador transcripcional ppGpp.
3. Gracias a la aplicación del modelo de polímeros WLC (*worm like chain model*), se logró estimar la cantidad de DNA en interacción (ΔL_c entre ~ 50 y 120 pb) lo cual es apoyado por estudios previos estructurales con microscopía de fuerza atómica (AFM) y de protección del DNA por RNAP- $\sigma 70$ contra DNasaI y radical OH (*footprinting*). Además, se mostró que el cambio de secuencia del promotor λPR , aumento de fuerza iónica, estabilizadores y el regulador transcripcional ppGpp no afectan ΔL_c .

4. Anteriormente a este estudio, muchos autores proponen que la cantidad de DNA involucrado en la interacción DNA-proteína es una medida de la estabilidad. Es decir, a más DNA en interacción, el complejo es más estable. Sin embargo, como se ha demostrado en la presente tesis, la estabilidad de un complejo es medido por su trabajo reversible o $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$, el cual se compone la fuerza generada (F_r y F_z , fuerza del rip y zip, respectivamente) y el desplazamiento o ΔL_c .
5. Ya que se obtuvo la cantidad de DNA enrollado (ΔL_c) y la energía involucrada ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$), se logró estimar la energía por par de base del DNA enrollado alrededor de la RNAP- $\sigma 70$ de *Escherichia coli* ($\Delta G_{pb} \sim 0.32 K_B T$), valor que representa el $\sim 60\%$ del ΔG_{pb} del complejo nucleosoma. Además, ΔG_{pb} al igual que el $\Delta G_{w \rightarrow u}^0$, es principalmente afectado por el cambio de secuencia del promotor λPR , aumento de fuerza iónica, estabilizadores y el regulador transcripcional ppGpp.
6. Se lograron identificar dos tipos de complejos RPo enrollados
 - RPo tipo 1, presenta los estados $Wab \leftrightarrow Wb \leftrightarrow U$ donde se involucran ~ 23 y $22 K_B T$ y ~ 70 y 50 pb, respectivamente. La transición $Wb \leftrightarrow U$ es cooperativa y posiblemente involucra la interacción con el DNA *upstream*; mientras que el enrollamiento $Wb \rightarrow Wab$ presenta un intermediario Wb' , donde el proceso $Wb \rightarrow Wb'$ es no-cooperativo y $Wb' \rightarrow Wab$ cooperativo, y probablemente se enrolla el DNA *downstream*.

- RPo tipo 2, presenta los estados $Wb \leftrightarrow U$ donde, probablemente, solo se enrolla el DNA *upstream*.
7. El reemplazo de una secuencia rica en adenina y timina (*AT-rich*) por otra aleatoria, en la región *upstream* del promotor λ PR, modificó significativamente el trabajo disipado (W^{dis}) en los experimentos fuera del equilibrio del desenrollamiento y enrollamiento del RPo, entre ~ 2 y 3 veces. Lo anterior sugiere un posible efecto de las propiedades dinámicas del DNA (flexibilidad y curvatura) en el W^{dis} .
 8. El complejo RPo enrollado es desestabilizado por el aumento de la fuerza iónica ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ reduce en $\sim 20\%$) y estabilizado por el anión fisiológico glutamato ($\Delta G_{w \rightarrow u}^0$ aumenta en $\sim 30\%$) tal como muestran los estudios cinéticos en *bulk*. Lo anterior confirma que hemos monitoreado el desenrollamiento y enrollamiento del complejo RPo, en tiempo real y a nivel individual.
 9. El ppGpp reduce la estabilidad de la interacción entre el DNA *upstream* con la RNAP- $\sigma 70$ en $\sim 15\%$. Además, aumenta la no-cooperatividad del enrollamiento en ~ 2 veces.

X. RECOMEDACIONES

1. Realizar experimentos con la mutante Δ JAW RNAP (en subunidad β'), el cual reduce el k_a en ~ 50 veces y no protege el DNA *downstream* desde -5 a +20 del radical OH (Drennan *et al.*, 2013), el cual ayudarían a corroborar si la transición $Wb \rightarrow Wab$ involucra el enrollamiento del DNA *downstream*.
2. Reproducir los experimentos de Footprinting, de forma similar a Craig *et al.*, (1995), pero con el promotor λ PR desde la posición -100 a +30. El objetivo de este experimento ayuda a encontrar una porción de alta protección (porción central, cerca de las cajas -35 y -10) y otra región con baja protección (zonas lejanas, cerca de -100 y +30) para corroborar si el complejo RPo en solución se encuentra en dos formas de enrollamiento, donde uno de ellos tiene más DNA enrollado.

XI. REFERENCIAS

Bai, L., Santangelo, T. J., & Wang, M. D. (2006). Single-molecule analysis of RNA polymerase transcription. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35(2), 343–60.

Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. a, & Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 305(4), 673–88.

Brunet, A., Chevalier, S., Destainville, N., Manghi, M., Rousseau, P., Salhi, M., Salomé L., Tardin, C. (2015). Probing a label-free local bend in DNA by single molecule tethered particle motion. *Nucleic Acids Research*, 43(11), 1-9.

Bustamante, C. (2008). In singulo biochemistry: when less is more. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 45–50.

Bustamante, C., Cheng, W., Mejia, Y. X., & Mejia, Y. X. (2011). Revisiting the central dogma one molecule at a time. *Cell*, 144(4), 480–97.

Bustamante, C., & Rivetti, C. (1996). Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 25, 395–429.

Cecconi, C., Shank, E. A., Bustamante, C., & Marqusee, S. (2005). Direct Observation of the Three-State Folding of a Single Protein Molecule. *Science*, 4174(10), 2057–2060.

Cellai, S., Mangiarotti, L., Vannini, N., Naryshkin, N., Kortkhonjia, E., Ebright, R. H., & Rivetti, C. (2007). Upstream promoter sequences and α CTD mediate stable DNA wrapping within the RNA polymerase–promoter open complex. *EMBO reports*, 8(3), 2–9.

Chakraborty, A., Wang, D., Ebright, Y. W., Korlann, Y., Kortkhonjia, E., Kim, T., Chowdhury, S., Wigneshweraraj, S., Herbert, I., Jansen, R., Nixon, T., Knight, J., Weiss, S., Ebright, R. H. (2012). Opening and Closing of the Bacterial RNA Polymerase Clamp. *Science*, 337(6094), 591–595.

Leirmo, S., Harrison, C., Cayley, D. S., Burgess, R. R., & Record, M. T. (1987). Potassium Chloride by Potassium Glutamate Dramatically Enhances Protein-DNA Interactions *in Vitro*. *Biochemistry*, 1987(2), 2095–2101.

Collin, D., Ritort, F., Jarzynski, C., Smith, S. B., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2005). Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. *Nature*, 437(7056), 231–4.

Coulombe, B. (1999). DNA wrapping in transcription initiation by RNA polymerase II. *Biochemistry Cell Biology*, 77(04) 257–264.

Coulombe, B., & Burton, Z. F. (1999). DNA Bending and Wrapping around RNA Polymerase : a Revolutionary Model Describing Transcriptional Mechanisms DNA Bending and Wrapping around RNA Polymerase : a “Revolutionary” Model Describing Transcriptional Mechanisms. *Microbiology and Molecular biology Reviews*, 63(2), 457-478.

Craig, M. L., Suh, W., & Record, M. T. (1995). HO and DNase I Probing of RNA Polymerase- λ PR Promoter Open Complexes: Mg^{2+} Binding and Its Structural Consequences at the Transcription Start Site. *Biochemistry*, 34(8), 15624–15632.

Craig, M. L., Tsodikov, O. V, Mcquade, K. L., Schlax, P. E., Capp, M. W., Saecker, R. M., & Record, M. T. (1998). DNA Footprints of the Two Kinetically Significant Intermediates in Formation of an RNA Polymerase-Promoter Open Complex : Evidence that Interactions with Start Site and Downstream DNA Induce Sequential Conformational Changes in Polymerase and DNA. *Journal Molecular Biology*, 283, 741-756.

Crooks, G. E. (1998). Nonequilibrium Measurements of Free Energy Differences for Microscopically Reversible Markovian Systems. *Journal of Statistical Physics*, 90(12), 1481–1487.

Crooks, G. E. (2008). Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences. *Physical Review E*, 1(3), 1–7.

- Dame, R. T., Wyman, C., Wagner, R., Goosen, N., & Wurm, R. (2002). Estructural Basis for H-NS-mediated Trapping of RNA Polymerase in the Open Initiation Complex at the *rrnB* P1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2146–2150.
- Dangkulwanich, M., Ishibashi, T., Bintu, L., & Bustamante, C. (2014). Molecular Mechanisms of Transcription through Single-Molecule Experiments. *Chemical Reviews*, 114, 3203–3223
- Davis, C. a, Bingman, C. a, Landick, R., Record, M. T., & Saecker, R. M. (2007). Real-time footprinting of DNA in the first kinetically significant intermediate in open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 7833–7838.
- Davis, C. A., Capp, M. W., Record, M. T., & Saecker, R. M. (2004). The effects of upstream DNA on open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004(29), 31–34.
- Smith, S. B., Cui, Y., Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA molecules. *Science*, 271(2), 795-798.
- 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*, 27(4), 1–14.

Robert, F., Douziech, M., Forget, D., Egly, J. M., Greenblatt, J., Burton, Z. F., & Coulombe, B. (1998). Wrapping of Promoter DNA around the RNA Polymerase II Initiation Complex Induced by TFIIF. *Molecular Cell*, 2(9), 341–351.

Drennan, A., Kraemer, M., Capp, M., Gries, T., Ruff, E., Wigneshweraraj, S., Artsimovitch, I. & Record, T. (2013). Key Roles of the Downstream Mobile Jaw of Escherichia coli RNA Polymerase in Transcription Initiation. *Biochemistry*, 51(47), 9447–9459.

Steven, S., Cui, Y. & Bustamante, C (2003). Optical-Trap Force Transducer That Operates by Direct Measurement of Light Momentum. *Methods in enzymology*, 55, 134–162

Ebright, R. H. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *Journal of Molecular Biology*, 304(5), 687–98.

Elms, P. J., Chodera, J. D., Bustamante, C., & Marqusee, S. (2011). The molten globule state is unusually deformable under mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 1–8.

Gore, J., Ritort, F., & Bustamante, C. (2003). Bias and error in estimates of equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12564–9.

Gries, T. J., Kontur, W. S., Capp, M. W., Saecker, R. M., & Record, M. T. (2010). One-step DNA melting in the RNA polymerase cleft opens the initiation bubble to form an unstable open complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10418–10423.

Heller, I., Hoekstra, T. P., King, A. G., Peterman E. J. G., & Wuite G. J. L. (2014). Optical Tweezers Analysis of DNA–Protein Complexes. *Chemical Reviews*, 114, 3087

Kim, T. K., Lagrange, T., Wang Y. H., Griffith, J. D., Reinberg, D., Ebright R. H. (1997). Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 12268–12273.

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 *Escherichia coli* RNA polymerase- λ PR promoter complexes using salt and the physiological anion glutamate. *Biochemistry*, 49(20), 4361–4373.

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.

Kontur, W. S., Saecker, R. M., Davis, C. A., Capp, M. W., & Record, M. T. (2006). Solute Probes of Conformational Changes in Open Complex (RPo) Formation by *Escherichia coli* RNA Polymerase at the λ PR Promoter: Evidence for Unmasking of

the Active Site in the Isomerization Step and for Large-Scale Coupled Folding in the Subsequent Conversion to RPo. *Biochemistry*, 45, 2161-2177.

Kriel, A., Bittner, A., Kim, S. H., Liu, K., Tehranchi, A., Zou, W., Rendon, S., Chen, R., Tu, B. & Wang J. (2013). Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)ppGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance. *Molecular Cell*, 48 (2), 231–241.

Larson, M. H., Landick, R., & Block, S. M. (2011). Single-molecule studies of RNA polymerase: one singular sensation, every little step it takes. *Molecular Cell*, 41(3), 249–62.

Le, S., Chen, H., Cong, P., Lin, J., Dröge, P., & Yan, J. (2013). Mechanosensing of DNA bending in a single specific protein-DNA complex. *Scientific Reports*, 3, 3508.

Lee, S. J., & Gralla, J. D. (2004). Osmo-Regulation of Bacterial Transcription via Poised RNA Polymerase, *Molecular Cell*, 14(4), 153–162.

Liphardt, J., Onoa, B., Smith S. B., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2013). Reversible Unfolding of Single RNA Molecules by Mechanical Force. *Science*, 292(4), 733-737.

Loziński, T., Bolewska, K., & Wierchowski, K. L. (2009). Equivalence of Mg²⁺ and Na⁺ ions in salt dependence of the equilibrium binding and dissociation rate constants of Escherichia coli RNA polymerase open complex. *Biophysical chemistry*, 142, 65–75.

Łoziński, T., & Wierzchowski, K. L. (2009). Evaluation of mixed-salt effects on thermodynamic and kinetic parameters of RNA polymerase – promoter DNA complexes in terms of equivalent salt concentrations. General applicability to DNA complexes. *Acta Biochimica Polonica*, 56(4), 695–702.

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.

Ma, J., & Howe, M. M. (2004). Binding of the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase to the phage mu middle promoter. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 7858–64.

MacDonald, D., Herbert, K., Zhang, X., Polgruto, T., & Lu, P. (2001). Solution structure of an A-tract DNA bend. *Journal of Molecular Biology*, 306(5), 1081–1098.

Mangiarotti, L., Cellai, S., Ross, W., Bustamante, C., & Rivetti, C. (2009). Sequence-Dependent Upstream DNA – RNA Polymerase Interactions in the Open Complex with λ PR and λ PRM Promoters and Implications for the Mechanism of Promoter Interference. *Journal of Molecular Biology*, 385, 748–760.

Manosas, M., & Ritort, F. (2005). Thermodynamic and kinetic aspects of RNA pulling experiments. *Biophysical Journal*, 88(5), 3224–42.

Manosas, M., Wen, J., Li, P. T. X., Smith, S. B., Bustamante, C., Tinoco, I., & Ritort, F. (2007). Force Unfolding Kinetics of RNA using Optical Tweezers. II. Modeling Experiments. *Biophysical Journal* 92(5), 3010–3021.

Stellwagen, E., Peters, J. P., Maher L.M., & Stellwagen N. C. (2013), DNA A-tracts Are Not Curved in Solutions Containing High Concentrations of Monovalent Cations. *Biochemistry*, 52(24), 4138–4148.

Maurer, S., Fritz, J., Muskhelishvili, G., & Travers, A. (2006). RNA polymerase and an activator form discrete subcomplexes in a transcription initiation complex. *The EMBO Journal*, 25(16), 3784–90.

Methods, F., Li, P. T. X., Collin, D., Smith, S. B., Bustamante, C., & Jr, I. T. (2006). Probing the Mechanical Folding Kinetics of TAR RNA by Hopping, Force-Jump and Force-Ramp Methods. *Biophysical Journal*, 90(1), 250–260.

Mihardja, S., Spakowitz, A. J., Zhang, Y., & Bustamante, C. (2006). Effect of force on mononucleosomal dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 15871–6.

Murray, H. D., Schneider, D. A., Gourse, R. L., & Mall, H. (2003). Control of rRNA Expression by Small Molecules Is Dynamic and Nonredundant. *Molecular Cell*, 12(4), 125–134.

Nickerson, C. A., & Achberger, E. C. (1995). Role of Curved DNA in Binding of *Escherichia coli* RNA Polymerase to Promoters. *Journal of Bacteriology*, 177(20), 5756–5761.

Forget, D.L., Robert, F., Grondin, G., Burton, Z. F., Greenblatt, J., & Coulombe, B. (1997). RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 7150–7155.

Parvin, J. D., McCormick, R. J., Sharp, P. A., & Fisher, D. E. (1995). Pre-bending of a promoter sequence enhances affinity for the TATA-binding factor. *Nature*, 33(23), 724-727.

Paul, B. J., Ross, W., Gaal, T., & Gourse, R. L. (2004). rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 38, 749–70.

Potrykus, K., Wegrzyn, G., & Hernandez, V. J. (2002). Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the λ dap(R) promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 43785–43791.

Record, M. T., Zhang, W., & Anderson, C. F. (1998). Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, hofmeister effects, and osmotic effects of salts. *Advance in Protein Chemistry*, 51, 281–353.

- Revyakin, A., Ebright, R. H., & Strick, T. R. (2004). Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase : Detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14):4776-80.
- Rivetti, C., Codeluppi, S., Dieci, G., & Bustamante, C. (2003). Visualizing RNA Extrusion and DNA Wrapping in Transcription Elongation Complexes of Bacterial and Eukaryotic RNA Polymerases. *Journal Molecular Biology*, 2836(03), 1413–1426.
- Rivetti, C., Guthold, M., & Bustamante, C. (1999). Wrapping of DNA around the *E. coli* RNA polymerase open promoter complex. *EMBO Journal*, 18(16), 4464–4475.
- Rivetti, C., Guthold, M., & Bustamante, C. (1996). Scanning Force Microscopy of DNA Deposited onto Mica: Equilibration versus Kinetic Trapping Studied by Statistical Polymer Chain Analysis. *Journal Molecular Biology*, 919–932.
- Roe, J. H., & Record, T.M. (1985). Regulation of the kinetic of the interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the λ PR Promoter by salt concentration. *Biochemistry*, 24, 4721–4726.
- Ross, W., Aiyar, S. E., Salomon, J., & Gourse, R. L. (1998). *Escherichia coli* Promoters with UP Elements of Different Strengths: Modular Structure of Bacterial Promoters. *Journal of Bacteriology*, 180(20), 5375–5383.
- Ross, W., & Gourse, R. L. (2004). Sequence-independent upstream DNA- α CTD interactions strongly stimulate *Escherichia coli* RNA polymerase-lacUV5 promoter association. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(2), 291–296

Ruff, E. F., Record, M. T., & Artsimovitch, I. (2015). Initial Events in Bacterial Transcription Initiation. *Biomolecules*, 5, 1035–1062.

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.

Schickor, P., Metzger, W., Werel, W., Lederer, H., & Heumann, H. (1990). Topography of intermediates in transcription initiation of *E. coli*. *EMBO Journal*, 9(7), 2215–2220.

Schneider, D. a, Ross, W., & Gourse, R. L. (2003). Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 151–156.

Shin, M., Song, M., Rhee, J. H., Hong, Y., Kim, Y. J., Seok, Y. J., Ha, K. S., Jung, S. H., & Choy, H. E. (2005). DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of $\sigma 70$ as a cofactor for looping. *Genes Development*, 19(19), 2388–2398.

Smith, S.B., Finzi, L., & Bustamante, C., (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085), 1122-6.

Stefl, R., Wu, H., Ravindranathan, S., Sklenár, V., & Feigon, J. (2004). DNA A-tract bending in three dimensions: solving the dA4T4 vs. dT4A4 conundrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5), 1177–1183.

Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D., & Smith S. B., Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 265(5178):1599-600.

Traxler, M. F., Summers, S. M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V. M., Hightower, G. A., Smith, J. T., & Conway, T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 68(5), 1128–1148.

Wagner, R. (2002). Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(3), 331–340.

Wen, J. D., Manosas, M., Li, P. T. X., Smith, S. B., Bustamante, C., Ritort, F., & Tinoco, I. (2007). Force unfolding kinetics of RNA using optical tweezers. I. Effects of experimental variables on measured results. *Biophysical Journal*, 92(9), 2996–3009.

Wenner, J. R., Williams, M. C., Rouzina, I., & Bloomfield, V. A. (2002). Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophysical Journal*, 82(6), 3160–9.

Williams, M. C., Wenner, J. R., Rouzina, I., & Bloomfield, V. A. (2001). Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA melting. *Biophysical Journal*, 80(2), 874–81.

Wuite, G. J., Davenport, R. J., Rappaport, a, & Bustamante, C. (2000). An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules. *Biophysical Journal*, 79(2), 1155–67.

Darst, S.A., Kubalek, E.W., & Kornberg, R.D. (1989). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron crystallography. *Nature*, 340(6236), 730-2.

Murakami, K.S. (2013). X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase sigma-70 holoenzyme, *The Journal of Biological Chemistry*, 288(13):9126-34

Wilson, C.; & Dombroski, A.J. (1997). Region 1 of σ_{70} is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *The Journal of Molecular Biology*, 267(1), 60–74

Suh, W. C., Ross, W., Record, M. T. (1993). Two open complexes and a requirement for Mg^{2+} to open the lambda PR transcription start site. *Science*, 259(5093):358-61.

Waigh, T. A. (2007). Applied Biophysics A Molecular Approach for Physical Scientists. *Wiley*, Chapter 8, page 173, 2007

XII. ANEXOS

ANEXO 1. Calibración de la detección de fuerza:

La fuerza, el microscopio de pinzas ópticas, se estima del cambio de dirección del haz laser que atraviesa la cámara de experimentos; la cual es detectada por un fotodetector de tipo *Position Sensitive Detector* (PSD). Se procedió a realizar la calibración de la detección de fuerza mediante el método de Stokes (Smith *et al.*, 2003). Este método consiste en obtener datos de velocidad (V) y fuerza (F) del movimiento de una bolita de poliestireno (con diámetro conocido, $2.1 \mu\text{m}$). Del cociente entre ambos parámetros se obtiene el coeficiente de fricción $F/V = \xi = 6\pi nR$ y luego se obtiene el diámetro calculado de la bolita (R); donde n es el constante de viscosidad del medio. A continuación se muestra el protocolo.

Realizar un correcto alineamiento de las trampas antes de realizar el test. Verificar que la diferencia de Iris/SUM (con y sin bolita) sea < 0.010 . Corroborar que las desviaciones en el PSD sean iguales y opuestas.

1. Poner cero PSD (sin bolita de poliestireno).
2. Atrapar una bolita ($2 - 3 \mu\text{m}$ de diámetro) con una distribución de tamaño conocido.
3. Seleccionar Autoalign (ON).
4. Seleccionar nuevamente Autoalign (OFF).
5. Seleccionar "Stokes' test" (Tool/Stokes test). Tener cuidado en tener el Autoalign en ON. En la nueva ventana generada, observar tres *spot* que se

mueven arriba y abajo debido a fuerzas térmicas; Xforce=green, Yforce=yellow, Zforce=blue.

6. Seleccionar ZeroForce.
7. Seleccionar Move motors XYZ. Para mover la cámara de fluidos
8. Mover (~10 diámetros fuera de la pipeta) en el eje X, Y y Z (rueda del mouse).

Tener cuidado de no pegar la bolita en las paredes de la cámara.

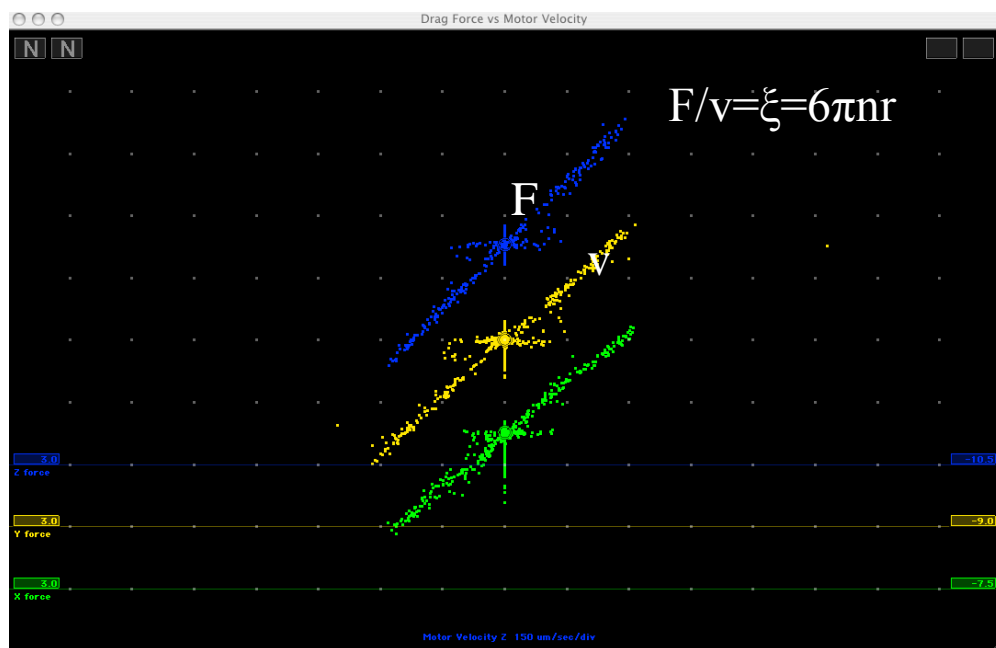


Figura 33. Ventana de la prueba de stokes; esta representan una gráfica de velocidad vs fuerza del movimiento de la bolita de poliestireno. Como se observa (ecuación) el cociente entre ambos valores genera una pendiente que equivale a $6\pi\eta R$. Al finalizar la prueba por cada bolita, la ventana nos expresa el diámetro de esta. El diámetro calculado por la ley de stokes (Figura 31) debe ser cercano al diámetro de la bolita comercial ($2.1\mu\text{m}$, para este caso).

9. Congelar la prueba Stokes pulsando la tecla “F” (Figura 33).
10. Girar los patrones horizontales X e Y con las teclas “E” y “Q”, respectivamente.

11. Pulsar la tecla “E” y se mostrará el diámetro de la bolita calculado, en la esquina inferior izquierda de la pantalla.
12. Repetir para varias bolitas (Decongelar la pantalla con “F”, borrar la data y apretar “_”, re-cero PSD y obtener una nueva bolita).
13. Estimar el diámetro de ~30 bolitas, estimar la distribución de frecuencia y calcular el promedio; el cual debe ser igual parecido a lo mencionado por el fabricante. Si la coincidencia es correcta, todo está bien. En caso contrario, considerar los factores de calibración: trapAForceSensitivity[x,y,z] y trapBForceSensitivity[x,y,z] deben ser cambiados.

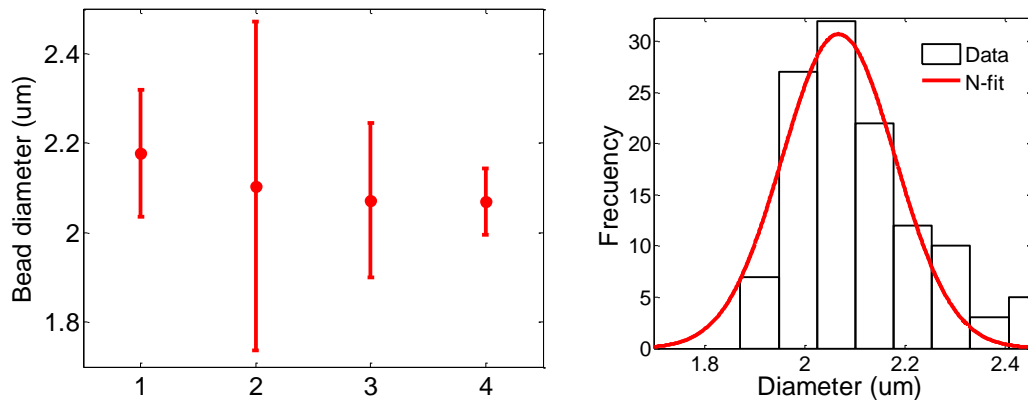


Figura 34. A) Valores medios con SD de diámetro de microesferas estimados a 4 potencias de fuente de poder del láser (1: 12000; 2: 10000; 3: 7000 y 4: 5000). B) Distribución de frecuencias del diámetro de la bolita. Se observa un ajuste normal ($R^2 = 0.94$), con un valor de $2.09 \pm 0.04 \mu\text{m}$ y $SD = 0.16 \mu\text{m}$. Este se encuentra muy cercano al valor del fabricante, $2.1 \mu\text{m}$.

Como se observa en la figura 34, el diámetro calculado mediante la ley de Stokes muestra un valor de $2.09 \pm 0.04 \mu\text{m}$ cercano al del fabricante ($2.1 \mu\text{m}$) y este es

independiente de la potencia del láser de las pinzas ópticas. Además, la distribución de frecuencias se ajusta a una gaussiana ($R^2 = 0.94$).

ANEXO 2. Calibración del movimiento de la trampa:

Las medidas de cambios de extensión (nm) estimados por la trampa óptica, se obtienen a partir del movimiento relativo del laser en la posición central y en una posición aleatoria en un fotodetector. Luego, este cambio de distancia en el fotodetector se convierte por un factor en nanómetros.

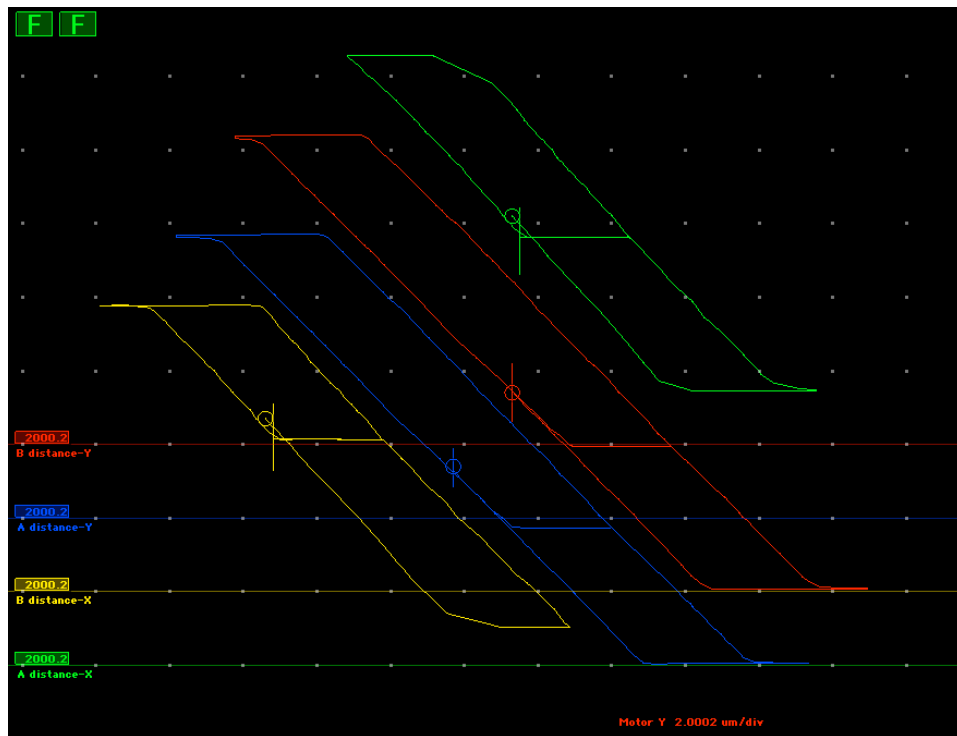


Figura 35: Test de calibración del movimiento de la trampas (light lever test). Como se observa la gráfica de motor-Y vs A-distance-Y debe dar una pendiente $\sim 45^\circ$.

Primero, realizar un correcto alineamiento de las trampas antes de realizar el test. Verificar que la diferencia de Iris/SUM (con y sin bolita) sea < 0.010 . Corroborar que las desviaciones en el PSD sean iguales y opuestas.

1. Abrir el archivo de grabado de canales del microscopio (Pref alias.txt). Cambiar de 0 a 1 los canales A-distance-Y, B-distance-Y, A-distance-X, B-distance-X y motors-Y, motor-X.
2. Crear una gráfica de A-distance-Y, B-distance-Y, A-distance-X y B-distance-X vs motors-Y y escalar a 2000nm/división y $2\mu\text{m}/\text{división}$, respectivamente.
3. Poner Centre-trap, atrapar una bolita (3 – 4 de diámetro) y succionarla con la pipeta.
4. Colocar la bead y el foco de laser de forma concéntrica.
5. Activar el modo Constant-Force en 10pN y mover la pipeta con las flechas del teclado a distancias menores a ~ 2 veces el diámetro de la bead. Observar el patrón correspondiente (Figura 35).
6. Observar si la pendiente es negativa y ~ 1 (por el ángulo de 45°). Si no es así, modifica el TrapAleverSensitivity[X,Y,Z] y TrapBleverSensitivity[X,Y,Z] para aproximar a 1.

Como se observa en la Figura 36, la pendiente generada entre i) el movimiento los motores de la cámara (*motors-Y*) y ii) el movimiento del laser que no pasa por la cámara de experimentos (*Light-lever*) en el eje Y para ambas trampas (A y B), es de ~ 0.96 que corresponde con un ángulo de $\sim 44^\circ$. En otras palabras, el error de medición inferido de la distancia real del desplazamiento del laser (nm) es menor al 4%. Todas

las mediciones observadas en los resultados se encuentran entre 15 y 20nm y, por lo tanto, tendrían un error de 0.6 y 0.8nm, respectivamente, los cuales son inferiores al ruido experimental ($\leq 2\text{nm}$).

Una vez que la estimación de fuerza, por movimiento de microesferas dentro de trampa óptica, y estimación de distancia, por movimiento del láser, son correctos, se procedió a realizar el cálculo de la constante de elasticidad de la trampa (*stiffness*).

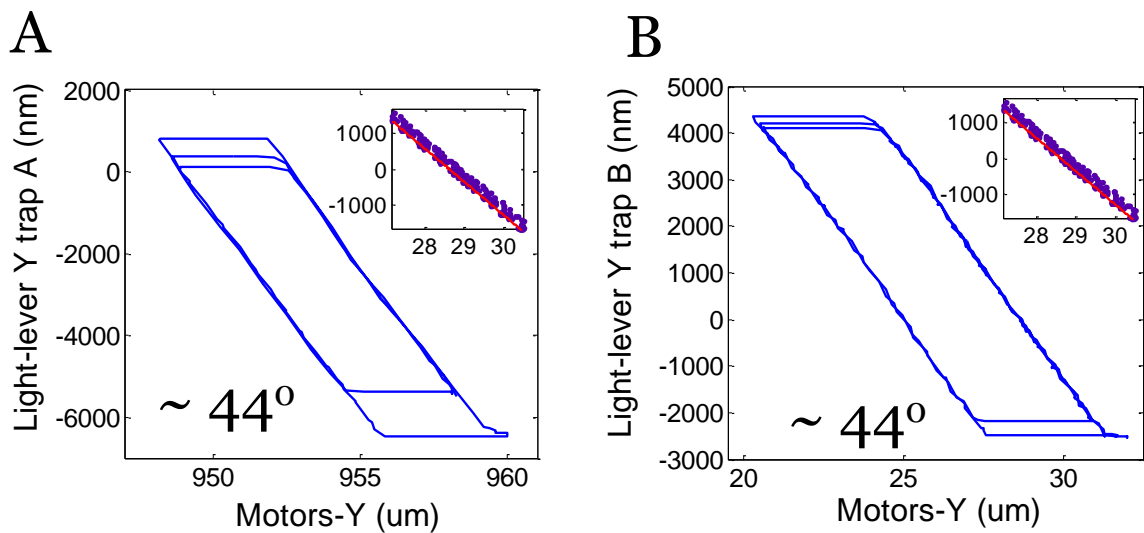


Figura 36: Gráficas representativas entre el Motors-Y y el Light-Lever del eje Y para las trampas A y B. Como se observa en ambos gráficos, se observa una pendiente de $\sim 44^\circ$. En los insertos se observa el ajuste lineal de la pendiente.

ANEXO 3. Determinación de constante de resorte de la trampa (Stiffness)

Como se mencionó en el texto, cuando estiramos un DNA, la señal recolectada en el PSD (*position sensitive detector*) es la posición de la trampa óptica y no del DNA.

Por lo tanto, antes de realizar el ajuste de una curva fuerza vs extensión de DNA al modelo WLC, debemos extraer la distancia por desplazamiento de la bead del centro de la trampa. Podemos aproximar la fuerza que experimenta la microesfera como $F = kx$, donde k es la constante del resorte de la trampa o *stiffness* (Manosas & Ritort, 2005). Como se observa la relación entre k y F es lineal.

Primero, realizar un correcto alineamiento de las trampas antes de realizar el test. Verificar que la diferencia de Iris/SUM (con y sin bolita) sea < 0.010 .

1. Abrir el archivo de grabado de canales del microscopio (Pref alias.txt). Cambiar de 0 a 1 los canales cycleCount/n, yForce, Tension, A_distY, B_distY and Status. Otras variables pueden ser grabadas pero no son necesarias.
2. Capturar una microesferas de digoxigenina con DNA y pescar un DNA único con la microesfera de estreptavidina unido a la pipeta.
3. Realizar el protocolo de *force-ramp* entre 4 y 20 pN de fuerza y crear una pantalla de yforce vs A_distY o B_distY y time vs A_distY o B_distY.
4. Apretar *Stiffness Test*. Observar que el protocolo de *Force-ramp* se detiene y el lighth-lever de ambas trampas se mueven en sentido contrario generando un ΔF de 1pN. Realizar entre 10 – 30 ciclos (Figura 37B), detener *Stiffness Test* y continuar con *Force-ramp*. Realizar esto a distintas fuerzas.

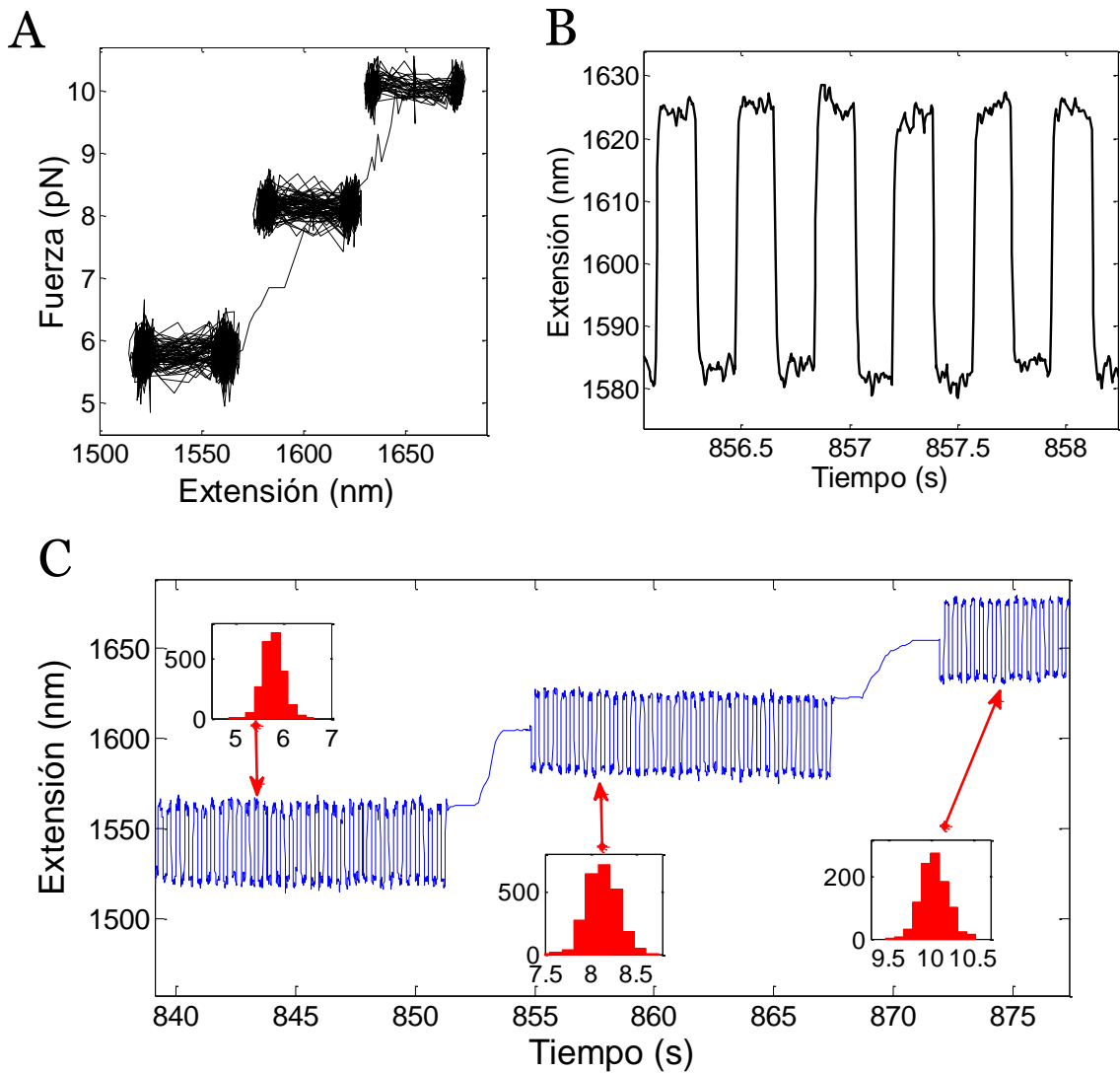


Figura 37: Esquema general del test de *stiffness*. **A)** Prueba a tres fuerzas distintas en una gráfica de *yforce* vs *A_distY*; **B)** Ejemplo de los movimientos cíclicos de la trampa óptica (*A_distY*) en el tiempo a la fuerza de 10pN; y **C)** Esquema global de los saltos cíclicos a tres fuerzas distintas, cada test de *stiffness* es una fuerza constante (histogramas rojos, $F = 5.9, 8.3$ y 10pN). Finalmente, la distancia de salto de la trampa vs la fuerza constante a la que se mantuvo serán graficados.

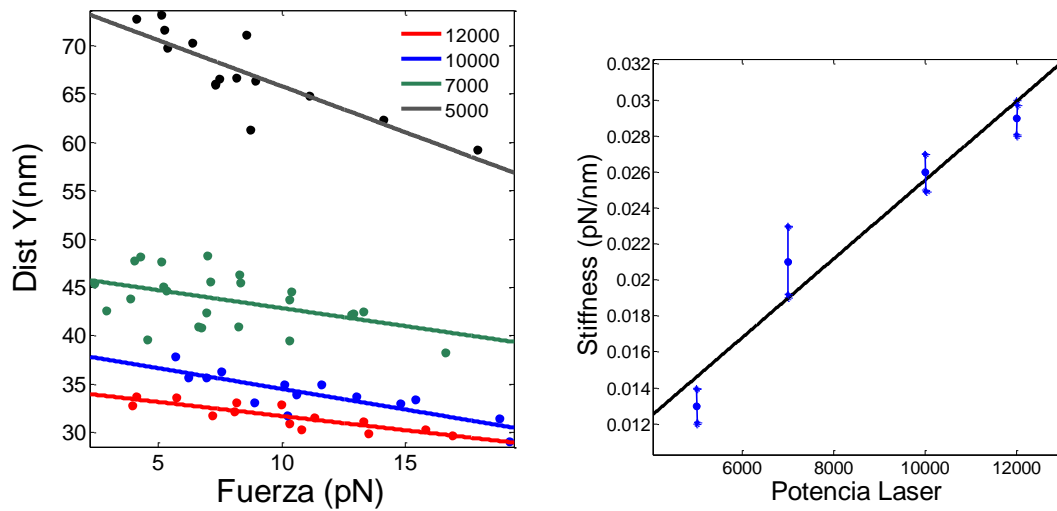


Figura 38: Análisis para el test de *stiffness* de una trampa óptica. A) Dependencia de la distancia de salto cíclico vs la fuerza a la que se hizo el experimento; esto se realizó a 4 potencias distintas (12000, negro; 10000, verde, 7000, azul; 5000, rojo); y B) Dependencia valores de *stiffness* y la potencia, como se observa la relación es lineal de la forma $y = -x.(2.19 \pm 1.57) \times 10^{-6} + (0.0036 \pm 0.0139)$, $R^2 = 0.94$.

5. Extraer los datos de *time*, *A_distY*, *B_distY* y *force*. En la gráfica *time* vs *A_distY*, *B_distY* observar los saltos a cada *stiffness test* a su determinada fuerza constante (Figura 37C). Usar el programa QuB para corregir el *drift* y estimar la distancia total del salto.
6. En una gráfica de *force* vs distancia de salto ajustar los datos a una regresión lineal: $y = -aF + b$, donde la distancia que se ha desplazado la microesfera del centro de la trampa es $d = -aF^2 + Fb$ donde el *stiffness* es equivalente a $1/b$.

Tal como se muestra en la Figura 38A, se observó una dependencia lineal entre la distancia de saltos cíclicos de cada light-lever (A_distY , B_distY) y el yforce a 4 potencias de laser distintas. Para nuestro caso, se utilizó siempre la máxima potencia (12000) lo cual corresponde con un valor de ~ 0.03 pN/nm (k). En el texto se mencionó que los experimentos de *force-ramp* se realizaron a 100nm/s (r), lo cual es la velocidad del movimiento del láser que incide sobre el PSD y no refleja la velocidad de perturbación del sistema DNA-proteína. Ya que la fuerza se propaga desde el extremo del DNA hasta el complejo enrollado entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λPR , lo recomendable es expresar la velocidad de *force-ramp* en pN/s como $v = rk$, lo cual da un valor de 3pN/s.

ANEXO 4: Estimación de la longitud de persistencia del DNA

En el texto se mencionó que para estimar la cantidad de DNA enrollado en los experimentos, necesitamos estimar la longitud de persistencia del DNA (P , nm) que se desenrolla. Ya que P es una propiedad del polímero, P puede ser estimada para nuestra molécula de DNA en ausencia de RNAP- $\sigma 70$.

A continuación escribimos el protocolo:

1. Se estiraron 12 DNA, se visualizaron en una gráfica de yforce vs A_distY y se corroboraron que estos sean DNA individuales, por ruptura única del DNA y caída a fuerza cero.

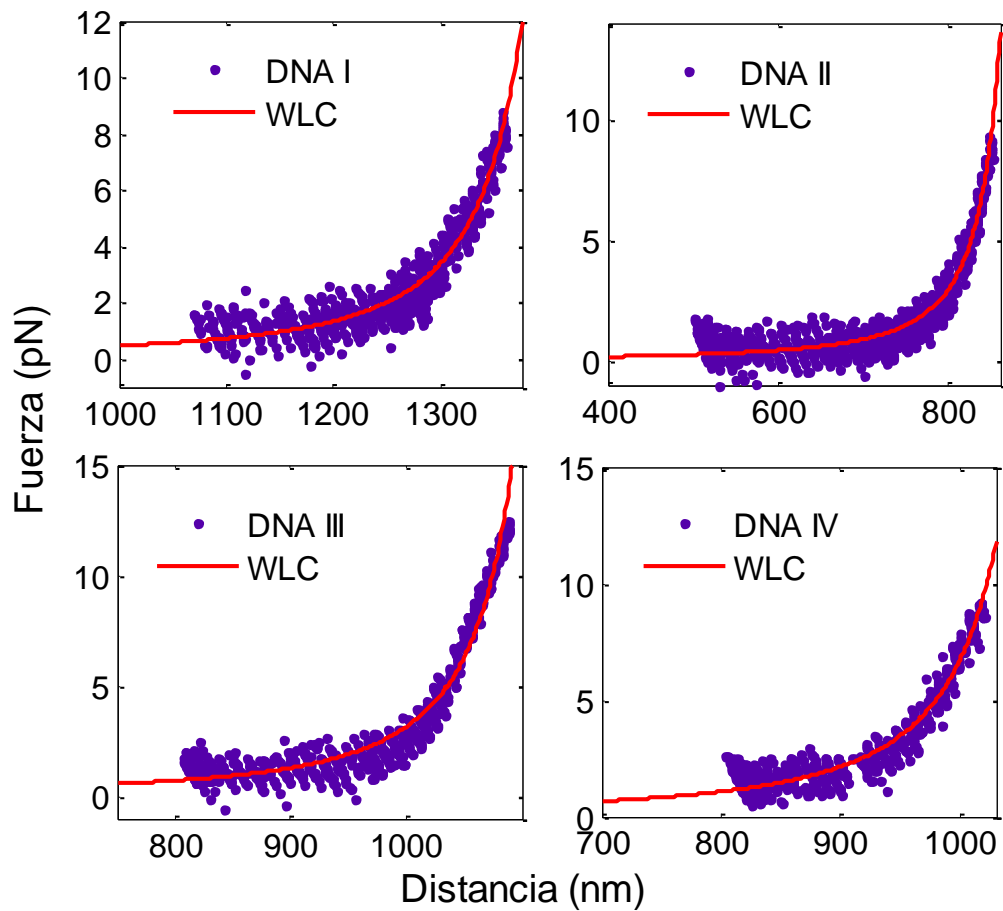


Figura 39: Ajuste de los datos de estiramiento de 4 moléculas de DNA individual (gráfico de fuerza vs distancia) al modelo WLC; donde se obtuvo una longitud de persistencia p de $25.8 \pm 0.4\text{nm}$ (DNA I), $23.4 \pm 0.4\text{nm}$ (DNA II), $16.9 \pm 0.8\text{nm}$ (DNA III) y $13.3 \pm 0.1\text{nm}$ (DNA IV). Lo cual corresponde con un P medio de $\sim 20\text{nm}$.

- Se extrajeron los datos de y_{force} y A_{distY} se procedió a corregir todos los valores de A_{distY} como:

$$A_{\text{distY_corr}} = A_{\text{distY}} + aF^2 - Fb$$

Donde a y b fueron estimados por el test de *stiffness*.

3. Se seleccionaron los datos corregidos como yforce vs A_distY_corr y solo para fuerzas menores a 12pN, estos se ajustaron al modelo WLC (Smith *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996),

$$\frac{FP}{K_B T} = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c}\right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c}$$

Donde L_c es la longitud de nuestro DNA (2024 pb). Sin embargo, este puede ser distinto ya que el DNA no necesariamente es capturado entre los extremos de las microesferas.

Como se observa en la Figura 39, se seleccionaron 4 moléculas de DNA a los cuales el WLC resulto el mejor ajuste. Los otros DNA no se ajustaron bien, posiblemente, debido a la geometría de captura del DNA entre las microesferas; cabe resaltar que el DNA es de ~684nm o 0.684 μ m y las microesferas tienen 2.1 y 3.4 μ m de diámetro. De las cuatro moléculas de DNA seleccionadas, se obtuvo 25.8 ± 0.4 nm (DNA I), 23.4 ± 0.4 nm (DNA II), 16.9 ± 0.8 nm (DNA III) y 13.3 ± 0.1 nm (DNA IV), los cuales dan como resultados un P medio de ~20nm.

ANEXO 5: Efecto de la estimación de ΔL_c a diferentes valores de P

Como se mencionó en el texto, se ha reportado un longitud de persistencia P ~50nm a 10mM de Na⁺ y este es depende del pH, concentración de cationes monovalentes y divalentes y varía entre 40 y 50nm (Smith *et al.*, 1992; Bustamante *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2001; Wenner *et al.*, 2002). Para nuestras condiciones experimentales de trabajo en el microscopio de pinzas ópticas (20mM Tris HCl, 40mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 8.0 y 23°C), se obtuvo un P ~20nm.

Este valor parece ser muy pequeño, entonces uno podría preguntarse ¿Cómo cambiaría la estimación de ΔL_c (rip o zip) si el P fuera más pequeño o semejante a lo reportado en la literatura? ¿Esta diferencia es significativa?

Como se observa en la Tabla 15 y Figura 40, solo se observa diferencia significativa con un P = 50 vs 20 y 10nm, y entre 40 vs 10 y 20nm. Además, ΔL_c varía entre 24.59 y 22.9nm lo cual da una diferencia de $\Delta\Delta L_c = 1.69\text{nm}$ entre 50 y 10nm de P; el cual es pequeño en relación al ruido experimental ($\sim 2\text{nm}$). Por lo tanto, para nuestras condiciones experimentales, el valor de P entre 10 y 50nm no afecta la estimación de ΔL_c .

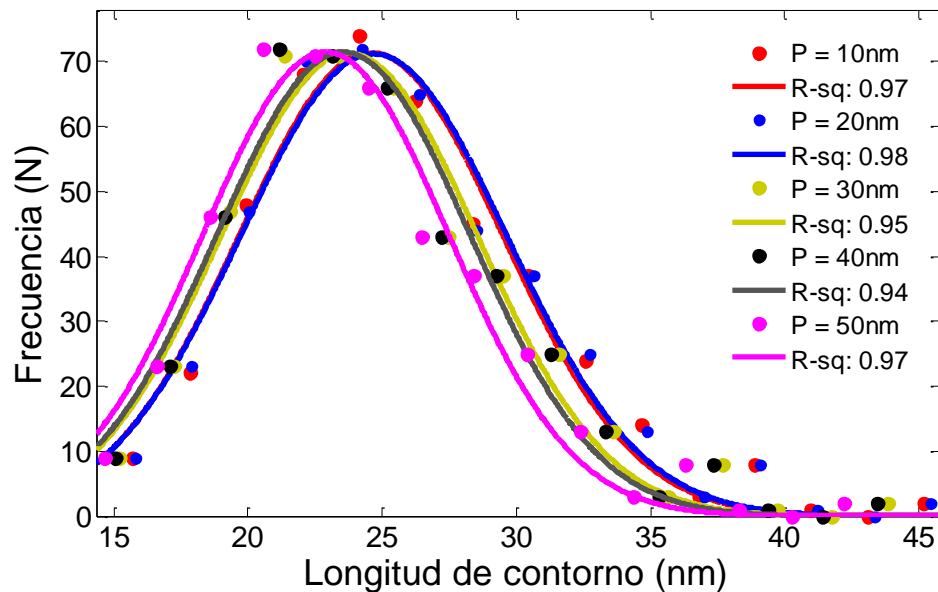


Figura 40: Distribución de frecuencia del ΔL_c del rip, de los complejos formados entre la RNAP- $\sigma 70$ y el promotor λ PR silvestre a 50mM de KCl, a diferentes P, entre 10 y 50nm. Como observa, no existe diferencia significativa.

Tabla 15: Comparación de valores de estimación de ΔL_c a distintos valores de P

	10	20	30	40	50	P (nm)
	24.6 ± 0.5	24.7 ± 0.5	23.8 ± 0.6	23.6 ± 0.6	22.9 ± 0.5	$\langle \Delta L_c \rangle$ (nm)
	6.9	7	6.7	6.7	6.5	SD
10	---	0.8388*	0.0925	0.0325	0.0004	
20	---	---	0.0607	0.0199	0.0002	
30	---	---	---	0.6425	0.0597	
40	---	---	---	---	0.1577	
50	---	---	---	---	---	

* Valores de p-value, los valores rojos indican diferencia significativa de comparación entre pares de medias.