



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL POR
CRISPRi DE GENES HOMÓLOGOS DE
BOMBAS DE EFLUJO DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN
EL MODELO DE *MYCOBACTERIUM*
SMEGMATIS Y SU EFECTO EN EL
EFLUJO DEL ÁCIDO PIRAZINOICO.

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

MAURA STEFANY QUIÑONES GARCIA

LIMA - PERÚ

2021

ASESOR DE TESIS

PhD. Mirko Zimic Peralta

CO-ASESOR

PhD. Patricia Sheen Cortavarria

JURADO DE TESIS

VANESSA KARINA ADAUI SICHERI, Ph.D.

PRESIDENTE

PABLO TSUKAYAMA CISNEROS, Ph.D.

VOCAL

TERESA VICTORIA BARRETO GAVIRIA, M.Sc.

SECRETARIA

Dedicatoria

Sin el apoyo de mis padres, hermana y mejores amigas, hubiera sido imposible terminar la tesis. Por lo que la dedico a la vida por ponerme a las personas correctas para poder seguir adelante a pesar de la adversidad.

Agradecimientos

A mis padres Maura y Rogelio, que, a pesar de sus diferencias, me han dado lo mejor de ellos para poder formarme como profesional y persona.

A mi hermana Carmen, mi mejor amiga, y compañera de vida.

A los doctores Patricia Sheen y Mirko Zimic, por darme una segunda familia, apoyándome incondicionalmente desde que decidí formar parte del laboratorio.

Al doctor Robert Gilman, por darme las infinitas oportunidades de crecer profesional y personalmente.

Al doctor Jeremy Rock, por tener la paciencia de guiarme y enseñarme respecto al tema de CRISPRi durante el proceso de mi tesis.

A mis mejores amigas Abigail, Nia y Valia, quienes nunca me han dejado caer y me han acompañado en las buenas y en las malas, durante todo este proceso. Así mismo, a mis amigos Enzo, Joubert, Walter, Carolina, Ruth, Yomara y Manuel C. que siempre han estado para mí.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular Marco, Roberto, Nancy, Elisa, Katherine, Sueline, Rudy, Hugo, Luis y Ricardo, quienes me enseñaron con paciencia desde que llegue al laboratorio. Y a Anuntxi, Segundo, Angela y Jose por ser mis amigos y compañeros incondicionales de trabajo.

A mis compañeros de la maestría con quienes compartí aulas y vivencias, en especial a Juan, Gabriela y Yudith.

Y a todos los profesores, compañeros y amigos que de alguna manera han aportado en mi crecimiento profesional.

Fuentes de Financiamiento

Laboratorio de Bioinformática, Biología Molecular y Desarrollos Tecnológicos.

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. <i>Enfermedad de tuberculosis.....</i>	5
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.3. <i>Tratamiento.....</i>	7
2.4. <i>Pirazinamida y mecanismo de acción.....</i>	8
2.5. <i>Mecanismo de resistencia</i>	10
2.6. <i>Bombas de eflujo.....</i>	12
2.7. <i>Modelo de estudio M. smegmatis.....</i>	15
2.8. <i>El sistema CRISPR-Cas</i>	15
2.9. <i>CRISPR de interferencia (CRISPRi).....</i>	18
2.10. <i>Sistema de CRISPRi para micobacterias.....</i>	19
III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	23
IV. ANTECEDENTES	24
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS.....	26
6.1. <i>Objetivo general.....</i>	26
6.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	26
VII. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	27

7.1.	<i>Tipo de estudio</i>	27
7.2.	<i>Diseño de estudio</i>	27
7.3.	<i>Área de estudio</i>	28
7.4.	<i>Material biológico</i>	28
7.5.	<i>Procedimiento experimental</i>	28
7.5.1.	<i>Identificación de genes codificantes de bombas de eflujo con importancia en la resistencia a pirazinamida o drogas de primera línea en M. tuberculosis</i>	28
7.5.2.	<i>Búsqueda de los genes homólogos de M. tuberculosis en M. smegmatis</i>	28
7.5.3.	<i>Diseño del ARN guía de los genes candidatos</i>	29
7.5.4.	<i>Hibridación de oligonucleótidos – diseño del ARN guía:</i>	32
7.5.5.	<i>Clonación del ARN guía en el plásmido de integración de CRISPRi – pLJR962</i>	32
7.5.6.	<i>Inducción del silenciamiento</i>	34
7.5.7.	<i>Ensayo fenotípico</i>	35
7.5.8.	<i>Cuantificación relativa de la abundancia del ARN mensajero</i>	35
7.5.9.	<i>Clonación múltiple de dos ARN guías en el plásmido pLJR962</i> ...	37
7.5.10.	<i>Velocidad de eflujo del POA</i>	42
7.5.11.	<i>Análisis</i>	43
VIII.	RESULTADOS	44
8.1.	<i>Alineamiento de secuencias y selección de los genes homólogos de M. tuberculosis en M. smegmatis</i>	44

8.2.	<i>Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de M. tuberculosis con sus homólogos en M. smegmatis</i>	45
8.3.	<i>Diseño de los ARN guías</i>	47
8.4.	<i>Clonación de un ARN guía en el plásmido pLJR962</i>	49
8.4.1.	<i>Digestión y purificación por gel del plásmido pLJR962</i>	49
8.4.2.	<i>Formación de los ARN guías</i>	49
8.4.3.	<i>Ligación del ARN guía en el plásmido pLJR962</i>	50
8.4.4.	<i>Verificación de las colonias transformadas con el plásmido recombinante que contiene el ARNg por secuenciación</i>	51
8.5.	<i>Transformación de M. smegmatis por electroporación con el plásmido recombinante conteniendo un ARNg clonado</i>	52
8.6.	<i>Ensayo fenotípico para determinar el efecto en el crecimiento bacteriano debido a los genes silenciados por CRISPRi</i>	52
8.7.	<i>Cuantificación relativa del ARNm de los genes seleccionados</i>	53
8.7.1.	<i>Integridad del ARN total extraído</i>	53
8.7.2.	<i>PCR en tiempo real para la cuantificación relativa</i>	54
8.7.3.	<i>Cuantificación relativa del ARNm de los genes silenciados por CRISPRi</i> 55	
8.8.	<i>Clonación múltiple de dos genes</i>	57
8.8.1.	<i>Linearización y purificación por gel del plásmido pLJR962 con un ARNg clonado</i>	57
8.8.2.	<i>Amplificación del plásmido pLJR962 con un ARN guía clonado</i> . 58	

8.9. Método Golden gate para clonar dos ARN guías en el plásmido pLJR962	58
8.10. Verificación de la clonación múltiple	59
8.10.1. Verificación de la clonación múltiple de dos genes por PCR colony y secuenciación	59
8.11. Transformación en <i>M. smegmatis</i> por electroporación con los plásmidos pLJR962 conteniendo dos ARN guías.....	61
8.12. Evaluación del silenciamiento de la expresión génica por dos ARN guías	61
8.13. Medición de la velocidad del eflujo del POA cuando <i>M. smegmatis</i> tiene activado el sistema CRISPRi.....	62
IX. DISCUSIÓN.....	66
X. CONCLUSIONES.....	73
XI. DIRECCIONES A FUTURO	74
XII. LIMITANTES	75
XIII.BIBLIOGRAFÍA	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias PAM para Sth1 dCas9. Se puede observar un total de 24 secuencias PAM, desde la que tiene el mayor grado de silenciamiento de 216.7 veces hasta la de menor de 2.7 veces (29).	20
Tabla 2: Secuencias PAM para dCas9sth1, ordenadas desde el mayor <i>fold</i> de represión (29).	30
Tabla 3: Resultados de la homología de los genes de bombas de eflujo de <i>M. tuberculosis</i> en <i>M. smegmatis</i> . Quedando como candidatas por mayor homología y cobertura los genes <i>MSMEI_4905</i> , <i>MSMEG_3815</i> , <i>MSMEG_0241</i> , <i>MSMEG_0410</i> , <i>MSMEG_5046</i> , <i>MSMEG_5782</i> , <i>MSMEG_6554</i> , <i>MSMEG_3496</i> y <i>MSMEG_0250</i>	45
Tabla 4: Alineamiento de las secuencias de MTB con los genes de <i>M. smegmatis</i> por Clustal, en el cual se obtiene una identidad mayor de 30% y una similitud mayor al 40%.....	47
Tabla 5: Oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de los genes de interés para formar los ARN guías del sistema de CRISPRi. Las letras rojas es el nucleótido del inicio del ARNg. Las letras moradas los nucleótidos necesarios para clonar los ARNg dentro del plásmido pLJR962.	48
Tabla 6: Cebadores de los genes candidatos para realizar PCR en tiempo real...	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mecanismo de acción de pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* (12). La PZA ingresa a la MTB y se convierte en POA, el cual es expulsado al medio extracelular ácido para protonarse y reingresar a la bacteria. 9
- Figura 2:** Sistema de CRISPR-Cas. (a) Locus CRISPR de la bacteria *wild type* que es sensible a la infección por un virus. (b) La misma bacteria mostrada en (a) integró en su locus CRISPR el espaciador del virus (S_0), por la acción de la proteína Cas, adquiriendo resistencia contra el virus (86). 16
- Figura 3:** Estructura de Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Se muestra la ubicación del PAM, el ARNg formada por la secuencia complementaria al ADN y el complejo crRNA: tracrRNA unido al Cas9 (79). 18
- Figura 4:** Represión transcripcional por CRISPRi. El dCas9 es guiado al ADN diana por la especificidad del ARNg. Si la secuencia de ADN diana corresponde a la región codificante, el complejo dCas9:ARNg:ADN bloquea el movimiento de la ARN polimerasa, lo que previene la elongación de la transcripción del gen de interés (96). 19
- Figura 5:** Plásmido pLJR962 para inducir el sistema de CRISPRi-Cas9 en *M. smegmatis* (29). 21
- Figura 6:** Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv1634* de *M. tuberculosis*, encontrando como homólogo el transportador de tipo MFS en *M. smegmatis* mc²1555 con 65.63% de identidad, 88% de cobertura y con el número de accesoión YP_888107.1. 44

Figura 7: Alineamiento por Clustal de la secuencia de aminoácidos de <i>Rv1634</i> de MTB H37Rv con la secuencia de su gen homólogo <i>MSMEG_3815</i> de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155, con una identidad de 63.2%.....	46
Figura 8: Electroforesis de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1X. (1) Plásmido pLJR962 sin digerir, (2) Plásmido linearizado con <i>SapI</i> , migra menos a comparación de la forma circular del carril 1 y (3) Marcador 1 kb plus DNA ladder.	49
Figura 9: Clonación de un ARN guía en el plásmido pLJR962. (A) Placa de colonias de <i>E. coli</i> nova blue con el inserto del ARNg del gen <i>MSMEG_5046</i> ligado en el plásmido, (B) Placa control, plásmido ligado sin inserto, en la cual solo se observa una colonia.....	50
Figura 10: Secuenciación de los plásmidos recombinantes que contienen el ARNg de los genes de interés.....	51
Figura 11: Transformación de <i>M. smegmatis</i> por electroporación con el plásmido pLJR962 con un ARN guía clonado. (A) Placa de colonias transformadas de <i>M. smegmatis</i> con el plásmido pLJR962 con el ARNg del gen <i>MSMEG_3815</i> en medio 7H10 con kanamicina, (B) Placa control de colonias de <i>M. smegmatis</i> sin plásmido en medio 7H10 con kanamicina.	52
Figura 12: Prueba fenotípica de la co-expresión de <i>dcas9_{sth1}</i> y el ARNg del gen <i>MSMEG_0250</i> , (A) se observa menor crecimiento de la bacteria en las placas tratadas con ATc, (B) placas sin ATc, por lo que se observa mayor crecimiento bacteriano a comparación de la placa A.....	53
Figura 13: Corrida electroforética de 1 µg de ARN total extraído de las cepas de <i>M. smegmatis</i> con el sistema de CRISPRi del gen <i>MSMEG_3815</i> , (1) Marcador	

100pb (Invitrogen) (2) Cepas tratadas con ATc, genes diana silenciados, (3) Cepas sin tratar con ATc, genes diana no silenciados, control. Además, se señalan los ARN ribosomales bacterianos 23S, 16S y 5S..... 54

Figura 14: Gráfica de la diferencia de la co-expresión de dCas9^{sth1} con los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* (ARNg 1 y ARNg2) y *MSMEG_0410* (ARNg1 y ARNg2) por medio de la cuantificación relativa del ARNm, se observa que la represión de la expresión de los genes es alta. 56

Figura 15: Gráfica de la diferencia de la co-expresión de dCas9^{sth1} con los genes *MSMEI_1258* (ARNg 1 y ARNg2), *MSMEG_3496*, *MSMEG_6554* y *MSMEG_5782* por medio de la cuantificación relativa del ARNm, se observa que la represión de la expresión de los genes es baja. 57

Figura 16: Corrida electroforética de los plásmidos pLJR962 con un ARNg clonado de los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815* y *MSMEG_0241* y linearizados. (1 y 3) Vectores digeridos, (2) 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) y (4) vector sin digerir..... 57

Figura 17: Corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%, (1, 2 y 3) productos PCR de los plásmidos pLJR962 con un ARNg clonado, amplificados con los primers 2433 y 2434, (4) control negativo y (5) marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). 58

Figura 18: Clonación de dos ARN guías dentro del plásmido pLJR962, (A) En la placa se observan más de 20 colonias que contienen el plásmido pLJR962 con dos ARN guías y (B) en la placa se observa solo una colonia del control plásmido autoligado..... 59

Figura 19: Verificación de la clonación múltiple. (1, 2, 3 y 4) Productos del PCR de las colonias transformadas con dos ARNg de diferentes genes en un plásmido pLJR962. (5 y 6) Colonias recombinantes con un ARNg en un plásmido pLJR962 (7) control negativo y (8) Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). 59

Figura 21: Comparación de las secuencias del plásmido pLJR962 sin inserto con el plásmido con los ARNg clonados del gen *MSMEG_3815/MSMEG_0410_1*; se observa el ARNg del gen *MSMEG_0410_1* en el software MEGA X. 60

Figura 20: Comparación de las secuencias del plásmido pLJR962 sin inserto con el plásmido con los ARNg clonados del gen *MSMEG_3815/MSMEG_0410_1*; se observa el ARNg del gen *MSMEG_3815* en el software MEGA X. 60

Figura 22: Transformación de *M. smegmatis* por electroporación con el plásmido pLJR962 con dos ARN guías clonados (A) Placa de colonias de *M. smegmatis* transformadas con el plásmido pLJR962 con los ARNg del gen *MSMEG_3815* y *MSMEG_0410* (ARNg1) y (B) Placa de *M. smegmatis* sin plásmido. 61

Figura 23: Medición de la velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* cuando un gen está silenciado con el sistema CRISPRi, inducido con ATc y sin silenciar, sin ATc. (A) Control 1, *M. smegmatis*, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo (P=0.166), (B) Control 2, *M. smegmatis* con el plásmido pLJR962, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo (P=0.166), (C) Gen *MSMEG_0250*, muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo, cuando el gen está silenciado y sin silenciar (P=0.000), (D) Gen *MSMEG_3815*, no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo (P=0.745), (E) Gen *MSMEG_5046* (ARNg 1), no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo (P=0.083), (F) Gen *MSMEG_5046* (ARNg 2), no muestra diferencia

significativa en la velocidad de eflujo (P=0.324), (G) Gen *MSMEG_0241*, no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo (P=0.082), (H) Gen *MSMEG_0410* (ARNg1), no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo (P=0.733) e (I) Gen *MSMEG_0410* (ARNg2), no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo (P=0.222). 63

Figura 24: Medición de la velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* cuando dos genes están silenciados al mismo tiempo con el sistema CRISPRi, inducido con ATc y sin silenciar, sin ATc. (A) Genes *MSMEG_3815/MSMEG_0250*, se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo (P=0.000), (B) Genes *MSMEG_3815/MSMEG_0410*, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo (P=0.109), (C) Genes *MSMEG_3815/MSMEG_0241*, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo (P=0.534). 65

Figura 25: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv0202c* de MTB en *M. smegmatis*. 6

Figura 26: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1183* de MTB en *M. smegmatis*. 7

Figura 27: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1250* de MTB en *M. smegmatis*. 8

Figura 28: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv0934* de MTB en *M. smegmatis* 9

Figura 29: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1348* de MTB en *M. smegmatis* 10

Figura 30: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv0507* de MTB en *M. smegmatis* 11

Figura 31: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1258c* de MTB en *M. smegmatis* 11

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Flujograma de trabajo	27
Esquema 2: Diseño de dos ARNg para el gen <i>MSMEG_0410</i> . Los nucleótidos resaltados en amarillo son las secuencias complementarias de las secuencias PAM ubicadas en el gen codificante <i>MSMEG_0410</i> y los nucleótidos resaltados en rojo son los ARNg elegidos a partir de las secuencias PAM.	31
Esquema 3: Análisis del secuenciamiento de la clonación múltiple de dos genes.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

M. smegmatis: *Mycobacterium smegmatis*

POA: Ácido pirazinoico

HPOA: Ácido pirazinoico protonado

PZAsa: Pirazinamidasa

PZA: Pirazinamida

TB: Tuberculosis

MDR: Multidrogo resistente

XDR: Extremadamente resistente a drogas

OADC: Suplemento de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600nm

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

dCas9_{Stt1}: dCas9 de *Streptococcus thermophilus*

BSA: Bovine Serum Albumin

Buffer TE: Buffer Tris - EDTA

Pb: Pares de bases

ARNg: ARN guía

CRISPRi: CRISPR de interferencia

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. El tratamiento recomendado para combatir la TB en adultos se basa en el uso de drogas de primera línea, como la pirazinamida (PZA). La PZA es usada también en el tratamiento de TB multidrogo resistente (MDR-TB) debido a que su función principal es la erradicación de cepas en estado de latencia. En la actualidad aún no se conoce del todo el mecanismo de acción de la forma activa de la PZA, el ácido pirazinoico (POA). La principal causa de resistencia a PZA son las mutaciones en el gen *pncA*; gen que codifica a la pirazinamidasa y convierte la PZA en POA; sin embargo, existen cepas resistentes a PZA que son independientes de esta condición, por lo que se cree que existen otros mecanismos que pueden explicar la resistencia como mutaciones en las bombas de eflujo. El objetivo del estudio fue silenciar mediante CRISPR de interferencia a genes que codifican a bombas de eflujo relacionadas al eflujo de ácidos débiles y evaluar la velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* mediante la prueba de Wayne cuantitativo. Se seleccionaron genes que codifican a las proteínas relacionadas con la función de bombas de eflujo homólogas en *M. tuberculosis*. Los genes fueron silenciados en forma simple (*MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* y *MSMEG_0410*) y en combinación de 2 (*MSMEG_3815/MSMEG_0410*, *MSMEG_3815/MSMEG_0250* y *MSMEG_3815/MSMEG_0241*). El silenciamiento del gen *MSMEG_0250* fue el único que cambió la velocidad del eflujo del POA significativamente (P=0.0006).

Palabras claves: Bombas de eflujo, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, ácido pirazinoico

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. The recommended treatment for TB in adults is based on the use of first-line drugs, such as pyrazinamide (PZA). PZA is also used in the treatment of multidrug-resistant TB (MDR-TB) because its main function is the eradication of latent strains. At present, the mechanism of action of the active form of PZA, pyrazinoic acid (POA), is not yet fully understood. The main cause of resistance to PZA is mutations in the *pncA* gene, a gene that encodes pyrazinamidase and converts PZA to POA; however, there are strains that are independent of this condition, so it is believed that there are other mechanisms that may explain resistance such as mutations in efflux pumps. The aim of the study was to silence by CRISPR interference genes encoding efflux pumps related to weak acid efflux and to evaluate the kinetics of POA efflux in *M. smegmatis* using the quantitative Wayne test. In addition, genes encoding proteins related to the function of homologous efflux pumps in *M. tuberculosis* were selected. The genes were silenced singly (*MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* and *MSMEG_0410*) and in combination of 2 (*MSMEG_3815/ MSMEG_0410*, *MSMEG_3815/ MSMEG_0250* and *MSMEG_3815/ MSMEG_0241*). Silencing of the *MSMEG_0250* gene was the only one that changed the POA efflux significantly (P=0.0006).

Key Word: Efflux pump, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, pyrazinoic acid.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa ocasionada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial (1). En el 2018 se reportaron 7 millones de nuevos casos de personas que desarrollaron la enfermedad con un estimado de 1 500 000 muertes. Además, el Perú alberga el 14% de casos de TB de la región de las Américas, en el cual se notificaron 32 642 nuevos casos de tuberculosis con una alta tasa de mortalidad de 8.3 por 100 000 habitantes (2).

La infección de TB pulmonar se transmite cuando un paciente con TB activa habla, tose o estornuda, expulsando pequeñas partículas en forma de aerosoles de 1 – 5µm de diámetro (gotas de Flügge) que contienen MTB, que penetran fácilmente por las vías respiratorias (3,4).

El tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para combatir la TB es el uso de drogas de primera línea (rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol), el tratamiento tiene dos fases: los dos primeros meses con rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol y cuatro meses siguientes con rifampicina e isoniazida (5).

Sin embargo, uno de los principales problemas para combatir la TB en humanos, es la TB multidrogo resistente (MDR-TB), en el cual el bacilo es resistente a los principales medicamentos utilizados para erradicar la enfermedad (1). Para el 2018 se reportaron medio millón de nuevos casos de pacientes resistentes a medicamentos a nivel mundial, en el cual el 78% de ellos representaban a las cepas MDR-TB y el 8.5% del medio millón a cepas extremadamente resistentes a drogas

(XDR-TB) (2,6–8). Así mismo, el Perú anualmente desarrolla como mínimo 1000 nuevos casos de MDR-TB (1).

La pirazinamida (PZA), es una importante prodroga de primera línea usada para el tratamiento de TB y la erradicación de cepas en estado de latencia (9,10). Cuando la PZA ingresa por difusión pasiva a MTB, es hidrolizada a su forma activa por la enzima pirazinamidasa (PZAsa), codificada por el gen *pncA*, a ácido pirazinoico (POA). Debido a un mecanismo de eflujo, POA es liberado al medio extracelular, en donde es protonado (HPOA), para luego reingresar a la bacteria por difusión pasiva, en donde libera un protón (H^+) acidificando al citoplasma, lo cual es letal para la micobacteria (11–13). Sin embargo, el mecanismo de acción de la PZA en MTB no está del todo claro, porque no se conocen con certeza los blancos de unión del POA en el medio intracelular de la bacteria y las bombas de eflujo encargadas de transportar al POA (9,14).

Durante las últimas décadas se ha identificado que una de las principales causas de resistencia a PZA son las mutaciones en el gen *pncA*, que codifica a la PZAsa de MTB (15–17). Sin embargo, se ha comprobado que existen cepas resistentes a PZA que no pierden completamente la actividad de PZAsa, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos complementarios como las mutaciones en genes codificantes de proteínas candidatas a blancos de unión del POA o mutaciones en genes codificantes de las bombas de eflujo que transportan al POA (16,18–20).

Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras de moléculas a través de la membrana celular, que regulan o impiden la entrada de fármacos al medio intracelular (21,22). La bomba de eflujo que se encarga de transportar al POA en MTB hasta el momento no ha sido identificada. Existen un gran número de

secuencias anotadas de bombas de eflujo en MTB que podrían ser transportadores de POA u otras drogas (13,20).

Existen diferentes mecanismos moleculares responsables de la resistencia a drogas (antibióticos) en micobacterias, tales como la permeabilidad celular, producción de enzimas inactivadoras de fármacos o mutaciones en los genes codificantes de bombas de eflujo (20,23,24). Además, en MTB se ha observado que la sobreexpresión de los genes codificantes de las bombas de eflujo en condiciones de estrés, aumenta la resistencia a antibióticos, porque las bacterias tienen una mayor probabilidad de adquirir y acumular mutaciones, confiriendo niveles más altos de resistencias a fármacos o múltiples fármacos (20,25).

Estudios previos en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular demostraron un incremento o disminución en la cinética del POA en cepas de MTB que tenían genes codificantes de bombas de eflujo delecionados (*knock out*) por recombinación homóloga; sin embargo, en ninguna se observó un cambio de la cinética total a comparación de una cepa de tipo wild type, por lo que se plantea que más de una bomba de eflujo está involucrada en el transporte del POA en la micobacteria (datos aún no publicados).

Mycobacterium smegmatis es una bacteria que se usa como modelo de investigación de MTB, porque se duplica rápidamente, además para su manejo se necesita de un laboratorio de bioseguridad de tipo I. Además, el mecanismo de acción de la PZA a su forma activa, POA, en MTB y *M. smegmatis* es el mismo pero la velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* es más rápida a comparación de MTB por lo que es resistente natural a PZA (26,27).

CRISPR de interferencia (CRISPRi) es una técnica basada en CRISPR Cas9 en la cual se edita el material genético por medio de la represión de la expresión genética a través del complejo ARN guía (ARNg) con la proteína dCas9, que es una proteína Cas9 modificada, enzima endonucleasa de ADN que no puede cortar el ADN, sino que reprime la expresión de un determinado gen (28). Este método ha sido optimizado para silenciar uno o más genes al mismo tiempo en *Mycobacterium* usando la dCas9_{sth1} y el plásmido pLJR962 (29).

En el presente trabajo se evaluó el cambio de la cinética del eflujo del POA en *M. smegmatis* luego que los genes homólogos de MTB, *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_0410* y *MSMEG_5046* fueron silenciados mediante CRISPRi. La velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* con el gen *MSMEG_0250* silenciado fue diferente con respecto a la cepa de referencia (P=0.0006). Además, la velocidad del flujo del POA en *M. smegmatis* con dos genes silenciados en simultáneo (*MSMEG_3815/ MSMEG_0410*, *MSMEG_3815/ MSMEG_0250* y *MSMEG_3815/ MSMEG_0241*) fue similar con respecto a la cepa de referencia y a las cepas con genes silenciados en forma individual.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedad de tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa generalmente asociada al sistema respiratorio, que ha afectado a los humanos desde hace 70 millones de años. Desde mediados del siglo XIX se observó un incremento significativo de personas contagiadas (30,31). En el año 1865 el cirujano Jean-Antonie Villein descubrió que TB es transmitida a través del aire, cuando un paciente en estado infeccioso tosía, escupía o hablaba, expulsando pequeñas partículas en forma de aerosoles que contienen a la bacteria (6). Así, el 24 de marzo de 1882 el científico Robert Koch descubrió que la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, causaba la enfermedad de tuberculosis, por la que es conocida comúnmente como bacilo de Koch (6,32).

Las cifras muestran que, a finales del siglo XIX, TB fue una de las principales causantes de muertes a nivel mundial, tanto en países en desarrollo como en los de bajo potencial económico. A partir del siglo XX, gracias al descubrimiento de fármacos antituberculosos, se redujo el número de muertes asociadas a TB en un 10% por año (6).

A pesar de que es una enfermedad tratable, aún no se ha podido erradicar por completo; reportándose al menos 10 millones de personas contagiadas en el año 2018 y por lo que aún es considerada como una de las diez principales causantes de muertes en el mundo (2,6). Asimismo, la resistencia a drogas todavía es un problema en la salud pública, cada año se reporta medio millón de nuevos casos de pacientes MDR-TB de los cuales solo el 56% responden al tratamiento con éxito (2).

2.2.Mycobacterium tuberculosis

La TB es comúnmente causado por las *sub especies* del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) como MTB que causa TB en humanos, *M. africanum* que solo causa TB en humanos en ciertas regiones del África, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* que causan TB en mamíferos domesticados y silvestres, y *M. microti* que causa TB en roedores (31,33,34).

MTB evolucionó y emergió como patógeno infeccioso en los humanos a partir de cepas ambientales del África, que hasta ahora se pueden encontrar en ciertos pacientes (31). Estas cepas fueron distribuyéndose alrededor del mundo gracias a la migración y al incremento de la civilización urbana, lo que llevó a la selección de cepas de MTB más virulentas con alto nivel de transmisión, causando epidemias y alto nivel mortalidad en el mundo (6,31,33).

MTB es una bacteria con una compleja pared celular, con alta permeabilidad y múltiples bombas de eflujo, las cuales expulsan compuestos y medicamentos nocivos para la bacteria, aumentando su virulencia (35,36). La pared tiene una estructura de tres capas internas que están unidas por enlaces covalentes, la más externa está compuesta por un gran número de ácidos micólicos, la cual es altamente hidrofóbica, representando el mayor porcentaje de la pared, y están localizadas perpendicularmente a la superficie celular; la segunda está compuesta por arabinogalactanos seguida por una capa de peptidoglicano que se extiende en la membrana celular, ambas evitan el acceso de moléculas hidrofóbicas al medio intracelular, que pasaron a través de las capa de ácidos micólicos (37–39).

2.3.Tratamiento

La tasa de mortalidad previa a la introducción de antibióticos para el tratamiento de TB era muy alta, aproximadamente 70% (6,40). El tratamiento contra TB empezó a desarrollarse con éxito a partir de las décadas de 1940-1960, siendo la estreptomicina la primera droga usada con éxito; sin embargo, el constante uso de la droga por largos periodos de tiempo provocó que en 1980 se reportaran los primeros casos de pacientes MDR-TB, por lo que se comenzó a administrar diferentes combinaciones de drogas hasta que se agregó la pirazinamida (PZA) a los esquema terapéuticos, logrando reducir el tiempo de tratamiento a solo 6 meses (9,40).

Actualmente, el tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) consiste en el uso de drogas de primera línea, isoniazida (INH), etambutol (EMB), rifampicina (RIF) y PZA por un periodo de 6 meses. Durante los dos primeros meses se trata al paciente con rifampicina, isoniazida y pirazinamida, seguido por cuatro meses con isoniazida y rifampicina (6,40,41).

Por otro lado, el primer tratamiento recomendado en los años 50's para eliminar TB latente fue la terapia con INH por 6 meses en países con alta y baja incidencia de TB; no obstante, en 1969 en el hospital de Nueva York se reportó que el tratamiento con INH elevaba las transaminasas en la sangre produciendo hepatitis (42). Actualmente la RIF es la principal droga para el tratamiento de TB latente, por su gran actividad bactericida, además de que presenta bajo grado de toxicidad; sin embargo, no es aconsejable para pacientes con VIH porque los retrovirales que se usan para el tratamiento de esta, pueden inhibir la acción de la RIF (42). Asimismo, PZA tiene alta actividad antituberculosa y acorta el tiempo de tratamiento tanto en

TB activa e inactiva; además de que se recomienda para el tratamiento de TB latente MDR-TB y XDR-TB. (42,43).

A pesar de que existe un tratamiento efectivo contra TB, en el 2017 se reportaron aproximadamente 558 000 nuevos casos de pacientes positivos a TB con cepas clínicas resistentes a drogas, tanto de primera como de segunda y tercera línea, de los cuales el 82% representaban a cepas de MDR-TB y el 8.5% a cepas XDR-TB (6).

2.4. Pirazinamida y mecanismo de acción

La PZA fue sintetizada por primera vez por Halla y Sperri en 1936, aunque no fue usada como agente microbiano hasta 1949 por Yeager et al. (44). En 1945 Chorine descubrió que la nicotinamida presenta efecto inhibitorio contra MTB, lo mismo fue comprobado por McKenzie et al. A partir de ello, en 1948 los laboratorios de Merck sintetizaron fármacos análogos a la nicotinamida probándolos en modelos de ratones, en los cuales la PZA demostró actividad antituberculosa en 1952 con una alta eficacia en un modelo *in vivo* e inmediatamente después fue testeado en humanos obteniéndose el mismo resultado (9).

Asimismo, la PZA, análoga de nicotinamida, es una importante droga de primera línea en el tratamiento contra la TB por disminuir la administración de los medicamentos de 12 meses a 6 meses (9). Además de que es usada para el tratamiento de cepas MDR-TB, por su alto poder bactericida que puede matar cepas de MTB que no son eliminadas por otros medicamentos. Por otro lado, uno de los factores más importantes para que la PZA pueda convertirse a su forma activa, el ácido pirazinoico (POA), es que el medio celular esté en un pH ácido de 5.5, inclusive su actividad enzimática no se pierde en pH más ácidos como 4.8 - 5 por

lo que también se sustenta su poder bactericida en bacilos tuberculosos en estado latente (9,12).

A pesar de que la PZA es importante en el tratamiento contra la TB, su mecanismo de acción aún no está del todo claro (9). PZA es una prodroga que se convierte a su forma activa, POA, cuando ingresa por difusión pasiva al MTB, esta es hidrolizada a POA⁻ por la enzima pirazinamidasa (PZAsa), la cual es codificada por el gen *pncA*. Luego el POA⁻ es expulsado al medio extracelular ácido (pH 5.5) por un mecanismo de eflujo y difusión pasiva, en el cual es protonado (HPOA), reingresando a la bacteria y liberando el proton (H⁺) en el medio intracelular (Figura 1) (9,13,45).

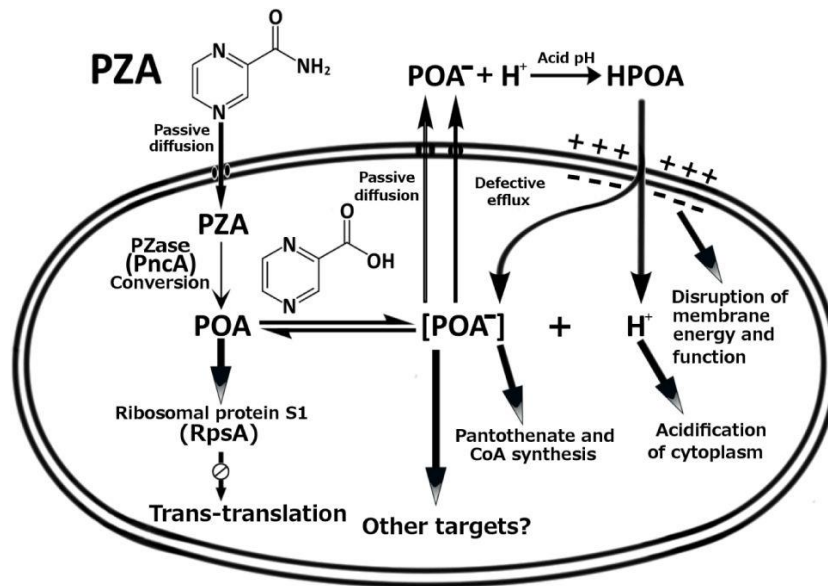


Figura 1: Mecanismo de acción de pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* (12). La PZA ingresa a la MTB y se convierte en POA, el cual es expulsado al medio extracelular ácido para protonarse y reingresar a la bacteria.

El mecanismo de acción del POA, inicia cuando el HPOA ingresa al medio intracelular de la micobacteria, en el cual el H⁺ se une a los protones del medio

celular, causando la acidificación citoplasmática, además de la perturbación del potencial de la membrana afectando el transporte transmembrana (12,13).

Además, se han identificado posibles blancos de unión tanto para la PZA como para el POA dentro de MTB (13). En el caso de la PZA, uno de los posibles blancos de unión es el ácido graso sintasa I (FasI), la cual sintetiza junto con FasII los ácidos micólicos de la pared celular de la micobacteria. Asimismo, los candidatos de blancos de unión para el POA acumulado en el medio intracelular son PanD y la proteína ribosomal S1 (Rpsa). PanD, es un aspartato decarboxilasa responsable de la formación de la b-alanina importante para la biosíntesis de la vitamina B5 y coenzima A de MTB, la cual se demostró a través de cristalización que se unía al POA (46,47). Así mismo, por cromatografía por afinidad se planteó que el POA se unía al RpsA, esta proteína inhibe el proceso de trans-traducción y recupera a los ribosomas secuestrados por complejos de traducción defectuosos (48,49). No obstante, a través de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), se postuló que el RpsA no está necesariamente implicado en el mecanismo de acción de la PZA (50).

2.5.Mecanismo de resistencia

La aparición de cepas resistentes a medicamentos se produjo en la década de 1980, por las constantes y largas dosis que se administraban de un mismo fármaco, lo que conllevó a la selección de cepas con mutaciones en MTB favoreciendo la aparición de cepas MDR-TB. Además, en la actualidad se suma el mal diagnóstico de la enfermedad, como la obtención de resultados falsos negativos por baciloscopía o la interrupción del régimen de tratamiento por los mismos pacientes con TB (6,40,51).

La resistencia a PZA está explicada mayormente cuando cepas de MTB presentan mutaciones en el gen *pncA*, el cual codifica a la enzima PZAsa que cataliza la conversión de PZA a POA dentro de la bacteria (12). La resistencia a drogas por mutaciones en el gen *pncA* se puede demostrar a través del cambio de la actividad enzimática de la PZAsa en un 27.3%, las regiones más comunes que presentan cambios comprenden a los aminoácidos 3-17, 61-85 o 132-142 de la PZAsa. Asimismo, se puede observar la reducción completa de la actividad enzimática cuando se presentan mutaciones en el sitio catalítico, en los posibles sitios de unión del hierro o cerca al sitio activo de la PZAsa (15,52–54).

Sin embargo, hay un 3-30% de resistencia a PZA que no está asociada a las mutaciones en *pncA* (53). Y que pueden ser explicados por mutaciones en los genes codificantes de blancos de unión al POA o en los genes codificantes de las bombas de eflujo que transportan al POA.

La proteína RpsA, codificada por el gen *Rv1630*, fue reportada en el 2011 como posible blanco de unión del POA. A través de una cromatografía de afinidad, en una columna con resina de sepharosa se unió covalentemente 5-hidroxi-POA, por la cual se pasó un lisado celular de MTB de la cepa H37Rv, quedando adheridas a la columna las proteínas codificadas por los genes *Rv2783c*, *Rv1630*, *Rv2731* y *Rv3169* (48). Así mismo, se ha reportado que la cepa de MTB DHM444, resistente a la PZA, presenta una mutación *RpsA Δ Ala438*, por lo que se expresó y purificó el *RpsA wild type* de MTB H37Rv y *RpsA Δ Ala438*, y a través de ITC se midió la capacidad de unión al POA observándose la interacción *RpsA-POA wild type* y no *RpsA Δ Ala438-POA*; por lo que, se postuló al *RpsA* como blanco de unión al POA hasta que Dillon *et al* 2017, sustentaron que no observaron interacción de afinidad

del POA con RpsA *wild type* por ITC, cuando se normalizaron las concentraciones del POA, pH, RpsA. Hasta el momento se siguen haciendo más estudios al respecto, por el hallazgo de nuevas mutaciones en *Rv1630* relacionada con resistencia a PZA (18,48–50,55).

Igualmente, el gen *Rv3601c*, que codifica al aspartato 1-descarboxilasa (PanD) encargada de la síntesis de β -alanina, es un posible blanco de unión al POA, porque se han encontrado mutaciones en cepas clínicas de MTB en el gen PanD, involucradas en la resistencia a PZA; además, la actividad enzimática de PanD es inhibida cuando se enfrenta al POA en concentraciones terapéuticas (47,56,57). Asimismo por ITC se ha demostrado que el POA se une al PanD a través de su sitio activo, degradándola en presencia de ClpC1-ClpP, inhibiendo la biosíntesis de coenzima A (47,58).

A través de un experimento *in vitro* e *in vivo* en cepas de MTB resistentes a PZA, el gen *Rv3596c*, que codifica a la chaperona ClpC1, presentó mutaciones en la región codificante, la mayoría ubicadas en el dominio N-terminal, que es una región conservada indispensable para la unión de la ClpC1 a su sustrato para su actividad enzimática (59). Además, se ha observado que el nivel de resistencia de ClpC1 y PanD es el mismo, por la cual ambas se relacionan, sugiriendo que PanD funciona como sustrato de la ClpC1, por lo que se sugiere que el oligómero ClpC1/P1 que regula la degradación de proteínas está implicado en la degradación de la PanD (56,58–63).

2.6. Bombas de eflujo

Uno de los principales mecanismos para explicar la resistencia a drogas en las bacterias son las bombas de eflujo que se localizan en la membrana celular (64). La

primera bomba de eflujo reportada fue a finales de la década de 1970 para el antibiótico tetraciclina. A partir de este descubrimiento se han identificado múltiples bombas de eflujos en distintos organismos procariotas, las que fueron clasificadas en 6 familias: casete de unión a ATP (ABC), la superfamilia facilitadora principal (MFS), extrusión de múltiples fármacos y toxinas (MATE), pequeña resistencia a múltiples fármacos (SMR), resistencia, nodulación, división celular (RND) y eflujo de compuesto antimicrobiano proteobacteriano (PACE) (24,65).

La familia ABC, es la principal transportadora dependiente de la energía de la hidrólisis del ATP y codifica el 2.5% de las bombas de eflujo del genoma de MTB. Principalmente exportan solutos o funcionan como moduladores de canales iónicos, además son responsables del transporte de algunos fármacos, por lo que la interacción, competencia, entre las drogas altera el sistema de la otra, inhibiendo su eficacia (19,20). En la familia MFS, al menos 16 proteínas putativas han sido identificadas en MTB, la P55 es una de las más importantes porque está relacionada a la resistencia a tetraciclina y estreptomicina. Asimismo, en la familia RND se encuentran 15 genes putativos, la mayoría de ellos pertenecen al grupo de proteínas de membrana de micobacteria (mmpl) y se ha demostrado que la proteína mmpl7 otorga resistencia a MTB para isoniazida. Un menor número de bombas de eflujo pertenecen a la familia SMR y MATE (19,24).

A lo largo de los años se han identificado cepas de MTB que están relacionadas con la resistencia a drogas como la PZA, que presentan mutaciones en los genes codificantes de bombas de eflujo y no en el gen *pncA* o blancos de unión al POA (20,66). A pesar de que la pared celular de MTB puede repeler el paso de algunos

fármacos por la presencia de los ácidos micólicos, no es suficiente para explicar la resistencia a las drogas antituberculosas (20,67). Por lo que se plantea que las bombas de eflujo cuando presenta mutaciones en sus genes contribuyen a la resistencia bacteriana, mediante la expulsión de los medicamentos al medio extracelular, lo que contribuye a la disminución de las concentraciones de fármacos en el medio intracelular, evitando la eliminación de MTB (20,68,69).

Así mismo, en aislados clínicos de cepas de MTB se ha observado que cepas resistentes a PZA, tienen una baja tasa de salida del POA en la bacteria lo que sugiere que la velocidad del eflujo del POA, podría ser un mecanismo de estudio para predecir genes relacionados a la resistencia a PZA (27). Además, se han reportado que la sobre expresión de las bombas de eflujo *Rv0191*, *Rv3756c*, *Rv3008*, y *Rv1667c* en MTB H37Ra generan resistencia a PZA y POA; igualmente se han encontrado que estos genes presentan mutaciones en cepas clínicas (70). De igual modo, se demostró *in vitro* que las mutaciones D23V, V219A, y S292L en el gen *Rv1258c* en cepas de aislados clínicos de MTB, están relacionadas a la resistencia a PZA, INH y estreptomycin (66). Así mismo, las bombas *Rv1634*, *Rv1250* al ser sobre expresadas en *M. smegmatis* disminuyen la susceptibilidad a antibióticos (71,72). Además existen genes que están relacionados a la resistencia a drogas de primera línea como el gen *Rv0507* a rifampicina (RIF) e isoniacida (INH), *Rv1634* a INH y *Rv0934* a RIF, o los genes *Rv0202C*, *Rv0206c* y *Rv1348*, transportadoras de la proteína hemo y sideróforos (73–76).

El gen *Rv0206c*, *mmpl3*, perteneciente a la superfamilia RND, transportador de ácidos micólicos en la forma de monomicolato de trehalosa, es una de las bombas de eflujo que ha sido cristalizada en forma de complejo con drogas, en el cual los

inhibidores SQ109, AU1235 e ICA38 se unieron en un mismo dominio del *mmp13*, por lo que se sugiere que además de ser transportador, puede tener la función de blanco de unión a fármacos o estar relacionada a la resistencia a PZA (77–79).

2.7. Modelo de estudio *M. smegmatis*

El género *Mycobacterium* está compuesto por especies saprófitas y patogénicas, las patogénicas mayormente son las que causan TB y lepra; sin embargo, son de difícil manipulación en el ámbito de la investigación, porque se necesitan laboratorios con bioseguridad de tipo 3, son de difícil manejo como la *M. leprae* que no crece en condiciones *in vitro* o son de lento crecimiento como MTB que tienen un tiempo de generación de 24 horas lo que demora 3 – 4 semanas para producir colonias en placas Petri (80,81).

Actualmente para entender la virulencia de MTB se utilizan como modelos *in vivo* a *M. smegmatis*, *M. bovis* y *M. marinum*, este último causa granulomas en el pez cebra así como MTB en humanos, por lo que es un buen modelo *in vivo* (82). *M. smegmatis* es una especie saprófita, que no genera patogenicidad, el tiempo de crecimiento celular es de 3 - 4 horas así que se pueden observar colonias en condiciones *in vitro* en 3 – 5 días; además, comparte regiones genómicas conservadas, genes constitutivos factores sigmas encargados de la especificidad del inicio de la transcripción y algunos sistemas metabólicos con MTB, por lo que es un buen modelo de estudio para manipulación genética y ha sido usado sobre todo en estudios de biología molecular (81,83–85).

2.8. El sistema CRISPR-Cas

La tecnología de CRISPR-Cas está basada en repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas de secuencias de ADN de virus o plásmidos dentro del genoma de

bacterias o arqueas (86,87). Estas secuencias fueron descubiertas en 1987 en el genoma de *E. coli*. No fue hasta el siglo XXI que se observó que el locus CRISPR estaba asociado a genes *cas* codificantes de proteínas Cas con dominios de nucleasas y helicasas; en el 2007 se demostró en *Streptococcus thermophilus* que el sistema de CRISPR-Cas está asociado a la inmunidad adaptativa de las bacterias y arqueas (87).

Por lo general cuando una bacteria es infectada por un virus (bacteriófago), ésta pierde el control en sí misma. En cambio, aquellas que tienen el mecanismo del complejo CRISPR-Cas degradan e inactivan el virus, tomando una parte del ADN viral, espaciador del virus (S_0), para modificarlo e integrarlo al locus CRISPR de la bacteria adquiriendo la inmunidad adaptativa para sí misma y para sus futuras generaciones (Figura 2) (86,88).

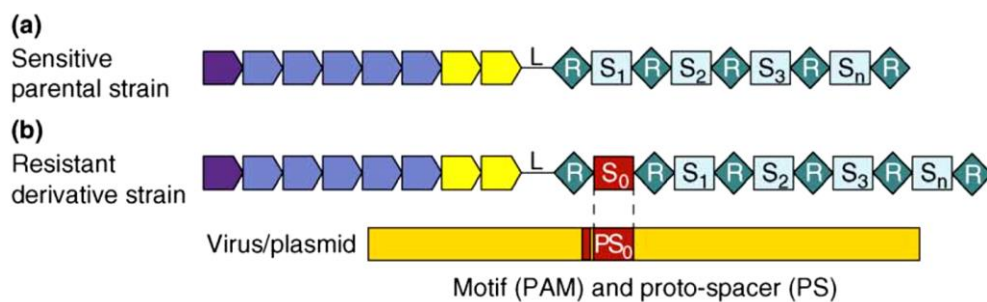


Figura 2: Sistema de CRISPR-Cas. (a) Locus CRISPR de la bacteria *wild type* que es sensible a la infección por un virus. (b) La misma bacteria mostrada en (a) integró en su locus CRISPR el espaciador del virus (S_0), por la acción de la proteína Cas, adquiriendo resistencia contra el virus (86).

El mecanismo de acción de los sistemas de CRISPR-Cas mayormente se basa en tres etapas: Adaptación, expresión e interferencia (86,89). En la etapa de

adaptación, las bacterias obtienen nuevos espaciadores (proto-espaciadores) de fragmentos de plásmidos o virus al insertarlos en el locus CRISPR por acción de las proteínas Cas, lo que les otorga memoria genética. En la etapa de expresión se transcribe el locus de CRISPR para formar el complejo de defensa seguido por la etapa de interferencia donde el ADN foráneo complementario a los espaciadores del CRISPR es reconocido y cortado por el sistema CRISPR-Cas (86,89).

Existen 6 tipos de sistemas de CRISPR-Cas, que se clasifican según su complejo de Cas único (88). El sistema de CRISPR tipo II es el más común y simple que se demostró en *Streptococcus pyogenes* (Spy) en el 2012, en el cual el locus CRISPR está asociado a una proteína Cas9 y a un ARNg. El ARNg está conformado mayormente por 20 nucleótidos (crRNA) complementarios al ADN diana y un ARN trans activador de CRISPR (tracrRNA) que sirve como bucle de unión a la proteína Cas9 formando el complejo crRNA: -tracrRNA (ARNg): Cas9 para poder cortar al ADN foráneo (88,90–92).

La especificidad del direccionamiento se determina según la complementariedad entre el ARNg del CRISPR-Cas9 y el ADN diana, además de una secuencia corta de 2 a 6 pb denominada “motivo adyacente del proto-espaciador” (PAM), que varía según el tipo de CRISPR y el organismo, este es un componente del virus o plásmido que no forma parte del locus CRISPR bacteriano (Fig. 3), lo que permite a Cas9 distinguir entre el ADN foráneo y el ADN propio (87,90,91,93).

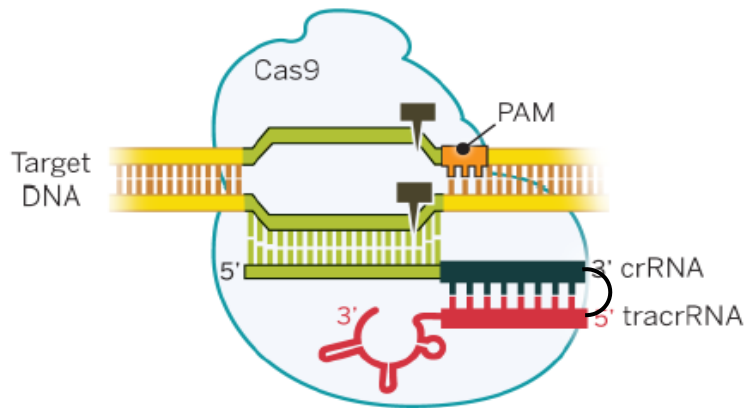


Figura 3: Estructura de Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Se muestra la ubicación del PAM, el ARNg formada por la secuencia complementaria al ADN y el complejo crRNA: tracrRNA unido al Cas9 (79).

2.9. CRISPR de interferencia (CRISPRi)

Recientemente, el sistema de CRISPR ha sido modificado, llamándose CRISPR de interferencia (CRISPRi) gracias al uso de una endonucleasa deficiente, dCas9. El enzima dCas9 es una versión de Cas9 inactivada catalíticamente por las mutaciones D10A y H840A en los dominios de nucleasa, interfiere con la transcripción del ADN, sin cortar el ADN, reprimiendo la expresión de genes por su deficiente actividad nucleolítica (90,91,94). A comparación del CRISPR nativo que modifica la secuencia del genoma por mutagénesis, deleción o inserción, el CRISPRi no altera la secuencia del ADN blanco, sino que reprime la transcripción de este, regulando la expresión genética de manera eficiente con al menos 1000 veces de represión, además de ser un método reversible (Fig. 4) (28,95).

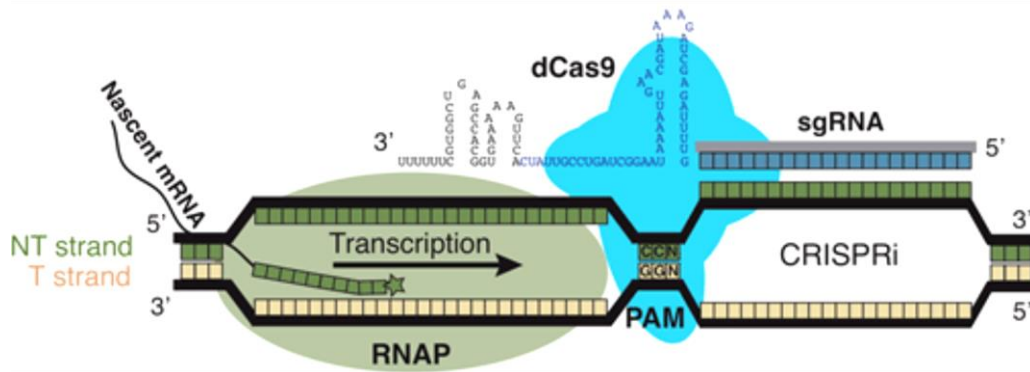


Figura 4: Represión transcripcional por CRISPRi. El dCas9 es guiado al ADN diana por la especificidad del ARNg. Si la secuencia de ADN diana corresponde a la región codificante, el complejo dCas9:ARNg:ADN bloquea el movimiento de la ARN polimerasa, lo que previene la elongación de la transcripción del gen de interés (96).

Asimismo, típicamente el CRISPRi ha sido caracterizado en *E. coli* y *Bacillus subtilis*, por lo que se ha buscado desarrollar esta técnica en otros organismos como en micobacterias. Se reportó que dCas9 de *S. pyogenes* (dCas9_{spy}), sistema comúnmente usado, es letal para *M. smegmatis* y tiene baja eficiencia de represión de la transcripción en micobacterias por lo que, Rock *et al* 2017 evaluaron 11 dCas9 de diferentes organismos, reportando que el dCas9 de *Streptococcus thermophilus* (dCas9_{Sth1}) producía un robusto y consistente silenciamiento de genes en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, gracias a la regulación del promotor por la proteína represora Tet (TetR) (29,94).

2.10. Sistema de CRISPRi para micobacterias

El sistema CRISPRi para *Mycobacterium* se afianzó a través de la construcción de un consenso, 5'-NNAGAAW-3', de secuencia PAM para Sth1 dCas9. Las variantes

de las secuencias PAM fueron probadas en un ARNg idéntico empleando el modelo in vivo *Renilla*, en estas variantes se cambió los nucleótidos de las posiciones 3, 4 o 7, obteniendo un total de 24 diferentes PAM que silenciaban al gen diana de prueba de prueba desde 2.7 hasta 216.7 veces; además, los PAM ≥ 25 veces de silenciamiento aumentan su probabilidad de funcionalidad (Tabla 1) (29).

Tabla 1: Secuencias PAM para Sth1 dCas9. Se puede observar un total de 24 secuencias PAM, desde la que tiene el mayor grado de silenciamiento de 216.7 veces hasta la de menor de 2.7 veces (29).

PAM	Fold repression	SD
5'-NNAGAAG-3'	216.7	10.0
5'-NNAGAAT-3'	216.2	10.4
5'-NNAGAAA-3'	158.1	22.8
5'-NNGGAAG-3'	145.2	5.3
5'-NNAGAAC-3'	120.5	7.9
5'-NNGGAAA-3'	110.5	26.4
5'-NNAGCAT-3'	84.6	5.2
5'-NNAGGAG-3'	82.2	9.2
5'-NNAGGAT-3'	64.7	8.7
5'-NNAGCAA-3'	53.4	9.9
5'-NNGGAAC-3'	51.5	6.2
5'-NNGGAAT-3'	47.3	3.3
5'-NNAGCAG-3'	42.2	7.0
5'-NNAGGAA-3'	38.5	5.2
5'-NNAGGAC-3'	25.5	0.8
5'-NNGGGAG-3'	24.7	1.9
5'-NNGGGAT-3'	24.2	3.4
5'-NNGGGAA-3'	12.3	0.8
5'-NNAGCAC-3'	11.9	1.2
5'-NNGGGAC-3'	7.9	1.0
5'-NNGGCAT-3'	6.7	0.9
5'-NNGGCAG-3'	4.0	0.3
5'-NNGGCAA-3'	3.3	0.3
5'-NNGGCAC-3'	2.7	0.3
ctrl sgRNA	1.3	0.1

Además, se sintetizó el vector pLJR962 (<https://benchling.com/s/seq-W7P2rtjHQkdXniXUdkcq>) para *M. smegmatis* el cual contiene el elemento dCas9 con codones optimizados para micobacterias, un “scaffold” del ARNg, denominado tracrRNA, que une el crRNA del ARNg de Sth1, dos sitios de corte para la enzima *BsmBI* en su extremo 5' permitiendo la fusión con el ARNg específico de la secuencia de interés, el represor Tet (TetR) inducido por la presencia de

anhidrotetraciclina (ATc), una copia de la integrina L5, el sitio de origen de replicación pBR322 derivado de *E. coli*, un “cassette” de resistencia a kanamicina, y dos sitios de restricción para la enzima *SapI* ubicados en la región “downstream” del tracrRNA para clonar múltiples secuencias de ARNg por el método “Golden gate” (Fig.5) (29).

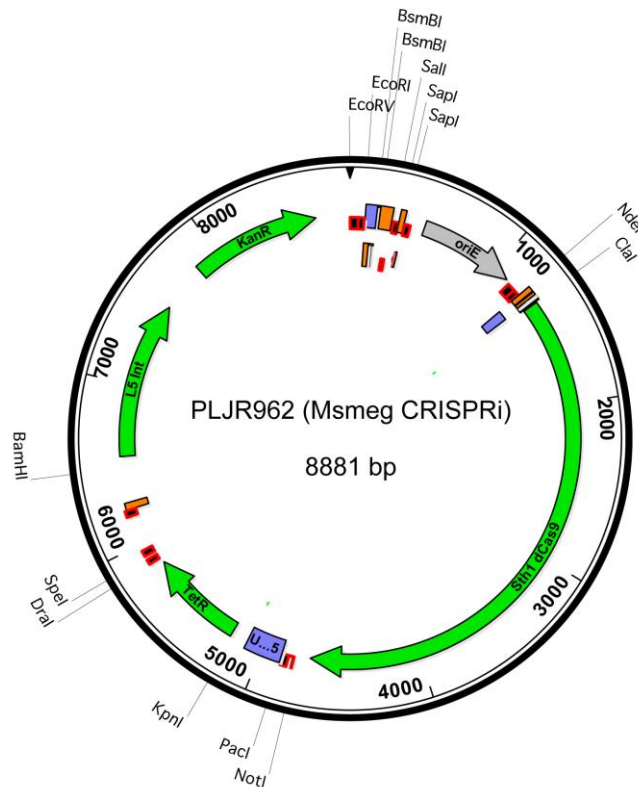


Figura 5: Plásmido pLJR962 para inducir el sistema de CRISPRi-Cas9 en *M. smegmatis* (29).

Así mismo, el sistema de CRISPRi se activa mediante la adición de ATc, gracias a la presencia del TetR (97). En sistemas procariontas como *E. coli*, el TetR regula la expresión de los genes de resistencia a la familia de tetraciclina (Tc). En ausencia de Tc, el TetR se une al operador tet (*tetO*) que se encuentra dentro del promotor del gen *tetA* y suprime la transcripción de *tetA*, inhibiendo la expresión de los genes

subsecuentes. En presencia de anhidrotetraciclina, ésta se une al TetR que cambia de forma al unirse el ATc, lo que impide al TetR unirse a tetO con ello se activa la expresión de genes, tanto de *tetA* como *tetR*, estado denominado “Tet-ON” (98–100). El gen *tetA* codifica una proteína transportadora (TetA) que expulsa el antibiótico ATc fuera de la bacteria. Este sistema ha sido adaptado en *Mycobacterium* a través de un plásmido de integración y es regulado con ATc, que no inhibe el crecimiento de las bacterias, no es tóxica y a pesar de que *Mycobacterium* es resistente natural a la Tc, no afecta el uso de la ATc, cruzando fácilmente la membrana bacteriana y uniéndose a la región Tn10 del TetR, lo que permite controlar el sistema de expresión bacteriana (97,99).

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La PZA es una de las principales drogas para la erradicación de la TB porque acorta el tratamiento convencional a solo 6 meses, también se usa para el tratamiento de cepas MDR-TB y TB-latente. Sin embargo, aproximadamente el 66% de los casos MDR-TB presentan resistencia a PZA, lo cual hace más difícil el tratamiento, por lo que es recomendable diseñar regímenes individuales para cada persona (7,101).

El 70-97% de casos de resistencia a PZA se debe a mutaciones en el gen *pncA* que codifica la PZAsa. Existe un 3-30% que aún no es explicado. Por lo tanto, se plantea que pueden existir otras mutaciones que estén implicadas en la resistencia al fármaco, como en los blancos de unión al POA, o en las bombas de eflujo que transportan el POA a través de la pared celular de las micobacterias (12,57,102,103).

Acorde al mecanismo de la PZA para convertirse en HPOA en MTB, el POA liberado al medio extracelular puede ser cuantificado mediante la técnica de Wayne, lo cual ha permitido encontrar en la medición de la cinética del eflujo una acumulación del POA extracelular en cepas clínicas que presentan mutaciones en genes codificantes de las bombas de eflujo, lo cual sugiere que una o más bombas pueden ser las responsables de la resistencia a PZA (104).

Por lo que el objetivo del presente proyecto es conocer cuál es el gen o genes que codifican la bomba de eflujo que se encarga de transportar al POA en la bacteria, a través del cambio de la cinética del POA, cuando un gen o genes candidatos sean silenciados con la técnica de CRISPRi.

IV. ANTECEDENTES

Los métodos de delección, represión de la expresión de genes en MTB han sido ampliamente desarrollados a través de los años (29,94,105). En el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular del LID-UPCH se han usado principalmente las técnicas de *homologous recombination-base gene replacement* (comúnmente denominada *gene knock-out*) y CRISPRi para identificar bombas de eflujo que estén relacionadas a la resistencia a drogas de primera línea contra TB. Así mismo se ha estandarizado y acoplado la técnica de Wayne de bajo costo para medir la velocidad del eflujo del POA en micobacterias con especificidad de 100% y sensibilidad de 80%, y predecir fácilmente cepas resistentes a PZA (15,104).

En nuestro grupo de estudio los genes que codifican a las bombas de eflujo han sido inactivados por *knock-out* a través de recombinación homóloga. Mediante la delección del gen *MSMEG_5046* en *M. smegmatis* se demostró que la proteína respectiva actúa como una bomba de influjo y que tiene un efecto en la resistencia a INH (106). Igualmente, se ha delecionado genes asociados a la resistencia a PZA, *MSMEG_5670*, *MSMEG_1250*, *MSMEG_2686*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_1145*, *MSMEG_0410* y *MSMEG_0250* en *M. smegmatis*, para posteriormente evaluar el efecto en la velocidad de eflujo del POA (datos aún no publicados).

Al no tener éxito en el *knock-out* de genes que codifican proteínas en MTB, se obtuvo donaciones de cepas *pncA knock-out* (*pncA-KO*) de Boshoff *et al.*, y cepas con genes *knock-out* que codifican bombas de eflujo por BEI Resources (105). Mediante una prueba de Wayne se comprobó que la actividad de la PZAsa fue nula en las cepas *pncA-KO*, por lo que a partir de estas cepas se pudo estandarizar un método de complementación genética de la cepa *pncA-KO* con el gen *pncA WT*

para corroborar que las mutaciones presentes en la PZAsa realmente confieren resistencia a PZA (107).

En las cepas con los genes codificantes de bombas de eflujo deletados/inactivados por *knock-out* se observó un aumento o una disminución en la velocidad del eflujo del POA. Los resultados obtenidos no han sido reproducibles, por lo que se optó por probar la técnica de CRISPRi en este estudio para silenciar genes que codifican bombas de eflujo en micobacterias y evaluar su efecto en la velocidad del eflujo del POA.

V. HIPÓTESIS

La represión transcripcional de uno o dos genes que codifican bombas de eflujo cambia la velocidad del eflujo del ácido pirazinoico en *Mycobacterium smegmatis*.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de la represión transcripcional por CRISPRi en *Mycobacterium smegmatis* de genes homólogos de bombas de eflujo de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la velocidad del eflujo del ácido pirazinoico.

6.2. Objetivos específicos

- Seleccionar genes codificantes de bombas de eflujo en *Mycobacterium tuberculosis*.
- Seleccionar genes codificantes bombas de eflujo en *Mycobacterium smegmatis* homólogos en *Mycobacterium tuberculosis*.
- Silenciar genes codificantes de bombas de eflujo de manera individual en *Mycobacterium smegmatis*.
- Silenciar dos genes codificantes de bombas de eflujo simultáneamente en *Mycobacterium smegmatis*.
- Medir la velocidad de eflujo del ácido pirazinoico en *Mycobacterium smegmatis* cuando los genes codificantes de bombas de eflujo están silenciados por CRISPRi.

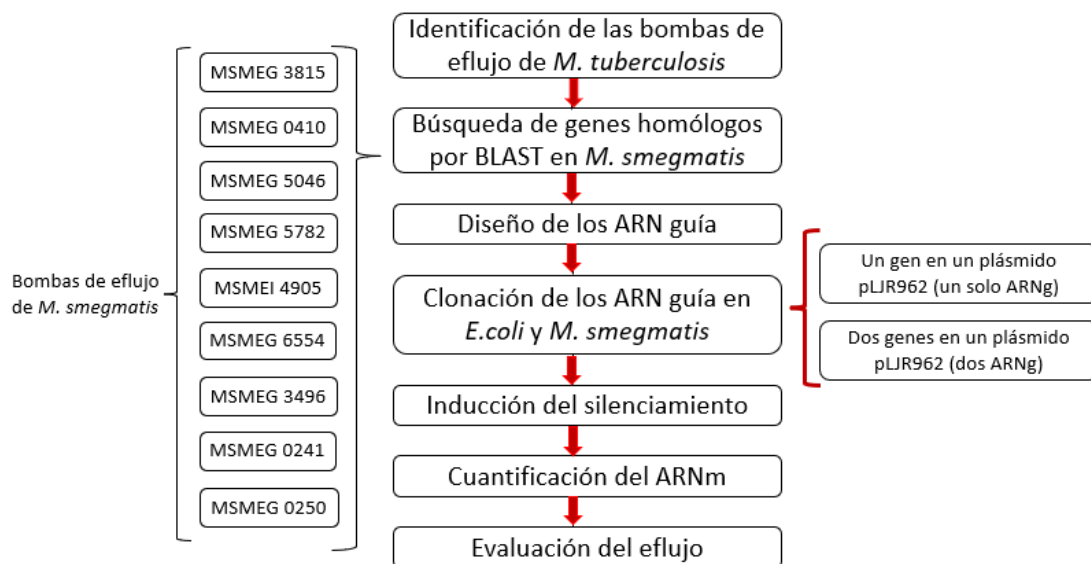
VII. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

7.1. Tipo de estudio

Estudio experimental y analítico

7.2. Diseño de estudio

Los genes que codifican a las bombas de eflujo en MTB fueron identificados a través de la base de datos *Mycobrowser* (<https://mycobrowser.epfl.ch/>). Se seleccionaron nueve genes homólogos en *M. smegmatis* para reprimir su transcripción en forma individual y conjunta mediante el sistema de CRISPRi. Y se evaluó el efecto del silenciamiento a través de la medición de la velocidad del eflujo del POA por medio del método de Wayne (Esquema 1).



Esquema 1: Flujograma de trabajo

7.3.Área de estudio

Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

7.4.Material biológico

Las cepas de *M. smegmatis* mc²155 y *E. coli* Nova blue fueron tomadas del banco de cepas del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

7.5.Procedimiento experimental

7.5.1. Identificación de genes codificantes de bombas de eflujo con importancia en la resistencia a pirazinamida o drogas de primera línea en *M. tuberculosis*

Estudios previos en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, en cepas de MTB con genes *knock-out* demostraron un cambio no reproducible en la velocidad del eflujo del POA (datos no publicados). Estos resultados se tomaron como guía para la selección de los genes del presente estudio, *Rv1258c*, *Rv1634*, *Rv0202c*, *Rv1183*, *Rv1250*, *Rv0934*, *Rv1348*, *Rv0507* y *Rv0206c*.

7.5.2. Búsqueda de los genes homólogos de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*

Los genes homólogos de MTB en el modelo *in vivo* de *M. smegmatis* fueron elegidos con una identidad mayor a 30% y una cobertura mayor a 50% de secuencias de aminoácidos con el uso del software Blast (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI).

Además, para confirmar la identidad mayor de 30% de las secuencias de aminoácidos se realizó un alineamiento simple global de las secuencias de los genes que codifican a las bombas de eflujo de MTB con las secuencias homólogas de *M. smegmatis*.

7.5.3. Diseño del ARN guía de los genes candidatos

El ARNg se diseñó siguiendo el protocolo de Rock *et al.* 2017 (29). Primero se descargaron las secuencias de todos los genes candidatos en el software NCBI, luego se identificó la cadena no molde del gen codificante a reprimir, en la cual se buscó el reverso complementario de la mejor secuencia PAM (Tabla 2), luego se contó dos nucleótidos hacia el 3' y a partir de ellos se eligió entre 20-25 nucleótidos hasta encontrar una citosina o timina, siendo así el ARNg la secuencia reversa complementaria de estos ~20 nucleótidos.

Una vez reconocida la secuencia del ARNg se diseñó los cebadores para realizar la formación de esta y poder clonarla en el vector. En el caso del cebador *forward* se le agregó en el sitio 5' los nucleótidos GGGA a la secuencia del ARNg (5'→3') y para el cebador *reverse* se le agregó al reverso complementario del ARNg en el sitio 5' los nucleótidos AAAC.

Tabla 2: Secuencias PAM para dCas9sth1, ordenadas desde el mayor *fold* de represión (29).

PAM	Fold repression	Standard deviation
NNAGAAG	216.7	10.0
NNAGAAT	216.2	10.4
NNAGAAA	158.1	22.8
NNGGAAG	145.2	5.3
NNAGAAC	120.5	7.9
NNGGAAA	110.5	26.4
NNAGCAT	84.6	5.2
NNAGGAG	82.2	9.2
NNAGGAT	64.7	8.7
NNAGCAA	53.4	9.9
NNGGAAC	51.5	6.2
NNGGAAT	47.3	3.3
NNAGCAG	42.2	7.0
NNAGGAA	38.5	5.2
NNAGGAC	25.5	0.8
NNGGGAG	24.7	1.9
NNGGGAT	24.2	3.4
NNGGGAA	12.3	0.8
NNAGCAC	11.9	1.2
NNGGGAC	7.9	1.0
NNGGCAT	6.7	0.9
NNGGCAG	4.0	0.3
NNGGCAA	3.3	0.3
NNGGCAC	2.7	0.3
ctrl sgRNA	1.3	0.1

Por ejemplo, en la secuencia del gen *MSMEG_0410*, se ubicaron dos secuencias del reverso complementario de la primera secuencia PAM de la tabla 1 (5'-NNAGAAG-3'), a partir de estas en dirección 3' se eligieron 20 nucleótidos, que conforman el ARNg, para la primera secuencia PAM el ARNg comprende la secuencia hasta encontrar una citosina y en la segunda secuencia hasta una timina. A ambos ARNg se les añadió en el extremo 5' los nucleótidos GGGA para la síntesis de los oligonucleótidos y la clonación posterior (Tabla 2) (Esquema 2).

>NC_008596.1:c5145528-5143822 Mycobacterium smegmatis str. MC2 155
 ATGCCTTCATCGCTGAACGCCCGCATCGCGGGCCTGCTCCCCAGCCGAGT
 GGGTGCACCTGCGCCCGCAGGACGGTACGGGGAATCCGTGGAATGCGCTGT
 GGGCCATGATGTTCTGGGTTCTTCATGATCCTGGTTCGACGCGACGATCGTCT
 CGGTTCGCGAACCCGACGATCATGGTGGAACTCGGTGCCGACTACGACGGC
 GTGATCTGGGTGACCAGCGCGTATCTGCTGGCATAACGCGGTACCGCTGCT
 CGTCACGGGCCGGCTCGGGGACATGTACGGGCCCAAGAACCTCTACCTGC
 TGGGTCTGGGTGTCTTACC CGCGGCCTCGCTGTGGTGCGGTCTGGCGGGC
 AGCATCGAGATGCTGATCGCCGCGCGCTCGTGCAGGGCATCGGCGCGGC
 GCTGCTGACGCCGACGACGCTGTCGGCGATCACGCGCAT **CTTCC**CGGCGA
ACCGGCGCGGTGTCTCGGATGAGCGTGTGGGGAGCCACC CGCGGGCGTTCGC
 GACTCGTGGGCCCGCTGGCCGGCGGTGTGCTGGTGGGCGGACTGGGCT
 GGCAGTGGAT **CTTCT**TCGTCAACGTCCCCGTGGCATCGTGGGCATCGCG
 CTCGCGGTATGGCTGGTGCCGACGCTGCCGACCACGCGGCACCACTTCGA
 CATCCCGGGCATCGTGCTGTCCGCGGTTCGGCATGTTCTGATCGTGTTCGC
 GCTGCAGGAGGGGCAGTCGAAGGACTGGGCGCCGTGGGTGTGGGGCACC
 GCGACGCTTGGTGTTCGGGGTCATGGCCGCGTTCTTCTTCTGGCAGTTCGGT
 AACACGCGAGAACCGCTCATCCCGCTGCGGGTCTTCGCCGACC GCGACTT
 CACGCTCGCCAACATCGGCGTTCGCCGTCATCGGGTTCGCGGTCACCGCGA
 TGATCCTGCCGCTGATGTTCTATTTGCAGACCGTGTGCGGTCTGTGCCCA
 TCCGGTTCGGCGTTGGTACCCGCGCCGACC GCGATCGCAAGCGGCGTGCTG
 GCACCGTTCGTTCGGGCGCATCGTTCGACCGCGTGCACCCCATGCCGGT
 GATCGGCTTCGGGTTCTCGGCCATGGCGATCGGGTTGACCTGGCTGTGATCG
 AGATGGCGCCACGACGCCGATCTGGCGGCTGCTGCTGCCGCAACTGCTC
 ATGGGCATCGGCATGGCGTTCATCTGGTACCCGCTTGC GGCCACGGCCAC
 GCGGCACCTGCCGCCCGATCTGGCCGGCGCCGGATCGGGCGTCTACAACA
 CGACGCGGCAGGTTCGGCTCGGTGCTGGGCAGTGC GGGGATCGCGGCGTTC
 ATGACGTGGCGCATCACCGACGAGGTTCTGGCATGCAGGACGCGGCACC
 CGCGGGCGAATCGGGGGCGCGGTTCGAGCAGCTGCCCGAGTTCCTGCGTG
 AACCGTTCCTCGGCCGCGATGTTCGACAGGCCATGCTGCTGCCTGCGTTCATCG
 CGCTGTTCTGGTGTGGTGGCCGCGCTGTTCTGCTGGGCTTCGGCAGCAACC
 GCGCGGCGGGGCATCCCGAACCGGAGCACGCGGGCGACTATCCCGACGA
 CGATGAGTACGTTCGAGATCATCCTGAGCAGCGACCCGCCCGAGGATCCGC
 CCACCGATCCCGCAGGACGACCGGTGGCAGCACATCCTCGACCGGTTGATG
 CAGGACGCGCCCGGAGGATCCGTTGCCCGGTTCGCGGTCCGCAGCGCCG
 GTGA

Esquema 2: Diseño de dos ARNg para el gen *MSMEG_0410*. Los nucleótidos resaltados en amarillo son las secuencias complementarias de las secuencias PAM ubicadas en el gen codificante *MSMEG_0410* y los nucleótidos resaltados en rojo son los ARNg elegidos a partir de las secuencias PAM.

7.5.4. Hibridación de oligonucleótidos – diseño del ARN guía:

A la secuencia del ARNg se le agregó la secuencia diana de corte de la enzima de restricción *BsmBI* en el extremo 5' (oligonucleótido forward) y 3' (oligonucleótido reverse) para su posterior inserción en el plásmido pLJR962, por lo que se unieron ambos oligonucleótidos a través de una hibridación a fin de obtener un ADN de doble hebra.

Se homogenizó 4 µl de cada cebador diseñado (100µM) con 42 µl de buffer *annealing* (50mM Tris pH7.5, 50mM NaCl y 1mM EDTA) en un volumen final de 50 µl, luego se realizó el *annealing* en el termociclador benchmark a 95 °C por 2 min, disminuyendo la temperatura hasta 25°C a una tasa de 0.1°C/ segundo.

7.5.5. Clonación del ARN guía en el plásmido de integración de CRISPRi – pLJR962

7.5.5.1. Digestión enzimática del plásmido pLJR962 con la enzima de restricción *BsmBI*:

La inserción del ARNg al plásmido de CRISPRi, pLJR962 para *M. smegmatis* se realizó a través de una digestión enzimática con 2.5 µg del vector con 40 U de la enzima *BsmBI* (NEB: 10U/µl), 1X del Buffer 3.1 (NEB: 10X) completado con agua grado PCR en un volumen final de 50 µl y fue incubado a 55°C por toda la noche (18 – 20 horas). Luego se incubó con fosfatasa alcalina (rSAP) (1U/µl) a 37°C por 30 minutos, para disminuir el número de plásmidos autoligados. Se comprobó que el plásmido fue completamente linealizado por una electroforesis de agarosa a 96V durante una hora en un gel al 0.8% con 1X de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen). A partir de ello se realizó la purificación del plásmido para eliminar residuos que pueden inhibir la reacción de ligación; se utilizó el Zymo clean™ Gel

DNA Recovery kit (Zymo Research), luego se midió la concentración final del ADN plásmidico en el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

7.5.5.2. Ligación:

En un microtubo de 500 μ l se homogenizó el plásmido pLJR962 linearizado y purificado con los oligómeros hibridados del ARNg a 16°C durante toda la noche (17). 9 ng de plásmido digerido, 0.5 μ l de oligonucleótidos (ARN guía), 40U de T4 ADN ligasa (NEB: 10,000 Unidades/ml), 0.5 μ l de 10x buffer T4 ADN ligasa y agua PCR hasta completar los 5 μ l de volumen final. Además, se agregó un control de autoligados, el mix sin oligonucleótidos a las mismas condiciones. Luego los 5 μ l de las reacciones fueron transformadas por shock térmico en 50 μ l de células competentes *E. coli* nova blue (Anexo 1 y 2). Las colonias recombinantes fueron seleccionadas con el antibiótico kanamicina (40 μ g/ μ l).

A partir de los cultivos, los plásmidos recombinantes fueron extraídos y purificados con el kit ZymoPure™ plasmid miniprep (Zymo research). Los plásmidos con los insertos fueron secuenciados con el cebador 1834 (5'-TTC CTG TGA AGA GCC ATT GAT AAT G-3') por el método de SANGER (MACROGEN, USA). Los resultados fueron analizados con el software MEGA (análisis genético evolutivo molecular).

7.5.5.3. Transformación por electroporación en *M. smegmatis*:

Una vez que se confirmó que los ARNg de los genes de interés estaban en el plásmido pLJR962, estos fueron extraídos y recuperados con el kit ZymoPure™ plasmid miniprep. Las bacterias *M. smegmatis* fueron transformadas por electroporación con 0.5 – 5 μ g de plásmidos recombinantes, proceso en el que también las clonas fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico kanamicina

(20 µg/µl) en medio de cultivo agar 7H10 suplementado con 10% de OADC (Ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa), 0.2% de glicerol durante 3 – 5 días. Así mismo, solo se usó 20 µg/µl de kanamicina porque es la concentración ideal para evaluar resistencia en micobacterias transformadas, porque existe menos probabilidad de contaminación en el medio 7H10 a comparación del medio LB agar. Además, las condiciones de electroporación están mencionadas en el anexo 3 y 4.

7.5.6. Inducción del silenciamiento

Las clonas seleccionadas por resistencia a Kanamicina de *M. smegmatis* transformadas con los plásmidos pLJR962 con los ARNg clonados fueron sembradas en 10 mL de caldo 7H9 base suplementado con 10% de OADC (Ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa), 0.2% de glicerol y 0.05% Tween 80, para evitar la formación de grumos y se logre el crecimiento homogéneo de las micobacterias en el medio líquido, además se agregó kanamicina (20µg/µl) y carbenicilina (50µg/ml, *M. smegmatis* es resistente natural a este antibiótico, por lo que se agrega para aumentar una barrera de protección contra bacterias contaminantes) a 37°C a 300 rpm durante 3 - 5 días. A partir de este cultivo se inoculó en un nuevo caldo 7H9 – T con kanamicina (20 µg/µl) y carbenicilina (50 µg/ml) a 37°C a 300 rpm durante 18 horas, hasta llegar a su fase logarítmica, OD_{600nm}: 0.5 - 0.8, luego se diluyó con medio 7H9 – T hasta ajustar su OD_{600nm} a 0.1 – 0.2, para iniciar la inducción del silenciamiento con 100ng/ml anhidrotetraciclina (ATc, disuelto en etanol) durante 14-24 horas (108).

7.5.7. Ensayo fenotípico

Se sembró 100 µl de cultivo en placas de medio 7H10 con kanamicina (20 µg/µl), carbenicilina (50 µg/ml) y con 100ng/ml de ATc a 37°C durante 3 – 5 días. Asimismo, también se usaron placas control con medio 7H10 con kanamicina (20 µg/µl), carbenicilina (50 µg/ml) y sin ATc (etanol al 5% diluido con agua MQ, porque es la concentración final de etanol en que se diluyo la ATc).

7.5.8. Cuantificación relativa de la abundancia del ARN mensajero

A partir de los cultivos diluidos OD_{600nm}: 0.1 - 0.2 en 10ml de medio líquido 7H9-T con kanamicina (20µg/µl) y carbenicilina (50 µg/ml), se indujo el silenciamiento con 100 ng/ml de ATc, el cual se dejó incubando durante 14 – 24 horas a 37°C, 300 rpm hasta llegar a un OD_{600nm} mayor a 1. Además, se contó con un control, cultivo de *M. smegmatis* sin ATc.

7.5.8.1. Extracción de ARN

Las bacterias inducidas y no inducidas fueron centrifugadas en un tubo de 15 ml libre de RNasa a 3000 g durante 20 min a 4°C, luego el pellet fue lavado con buffer TE pH 8 a 3000 g durante 20 min a 4°C, después el pellet fue resuspendido en 1ml de TRI Reagent (Zymo Research) en un tubo de tapa rosca con beads de zirconio de 0.1 mm. Las células fueron lisadas a 6.5m/s durante 30 segundos, dos veces, con un intervalo de tres minutos por cada ciclo en el equipo Fast Prep (MP Biomedicals).

Los cultivos lisados fueron centrifugados a 12000 g durante 15 min a 4°C, se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml, agregándole 200 µl de cloroformo, luego las muestras fueron agitadas vigorosamente por 15 seg, y se incubó durante 5 min en hielo. La mezcla fue centrifugada a 12000 g durante 15 min a 4°C, luego se

separó la fase acuosa, el sobrenadante, a un nuevo tubo, en el cual se añadió el mismo volumen de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión durante 4 veces, traspasando todo el volumen a la columna de purificación Directzol RNA kit (Zymo Research), en el cual se incubó durante 10 min en hielo, para luego ser centrifugado a 16000 g durante 1min a temperatura ambiente en la micro centrífuga, se descartó el líquido del tubo colector y se realizó el lavado a la columna con 400 µl de Directzol RNA Pre-wash (Zymo Research) a 16000g durante 30 seg, luego se realizó otro lavado con 700µl de RNA Wash buffer (Zymo Research) a 16000g durante 2 min a 4°C, se descartó todo rezago de wash, con una centrifugación al vacío a 16000g durante 1 min a temperatura ambiente. El ARN fue eluido de la columna con 20µl de agua libre de RNAasas (DEPC), luego fue cuantificado en nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó su integridad en una corrida electroforética de agarosa al 1.5% con buffer Tris Borato EDTA (TBE1X) a 90V durante 1 hora.

7.5.8.2. Retrotranscripción

El ARN extraído (1000ng/µl) fue tratado con Ambion DNaseI (Thermo Fisher Scientific) para eliminar restos de ADN, se realizó un mix con 4 µg de ARN, 2 µl de DNaseI y agua DEPC en un volumen total de 20 µl, se incubo la reacción a 37°C durante 30 min y para inactiva la enzima se incubo a 75°C durante 5 min.

A partir del ARN tratado con DNaseI se formó una hebra de ADN con el kit de retro transcriptasa SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific) en dos fases, la primera fase, la hibridación del cebador con el molde de RNA y una segunda fase, preparación de reacción de la retro transcriptasa (Anexo 6).

7.5.8.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

El ADNc formado por la retrotranscripción se usó para la amplificación y cuantificación relativa de los niveles de ARNm de los genes de interés con SYBR Green (Takara) y con cebadores específicos para cada uno de ellos; así mismo, los cebadores se diseñaron en el software primer-blast del NCBI, los cuales se ubicaron a después de la región flanqueante del lado 3' de las secuencias complementarias de los ARNg de cada gen.

El master mix se realizó con 0.3 μ M del cebador forward, 0.3 μ M del cebador reverse, 2.5 μ l de SYBR Green, 4.5 μ l de H₂O PCR y 1 μ l de ADNc en un volumen total de 10 μ l. Por cada gen se tuvieron tres replicas técnicas empleando el mismo ADNc para cada condición y se realizó el qPCR en las condiciones: 95°C de denaturación inicial a 10 min, 40 ciclos de 95°C a 10 seg, 61°C a 20 seg, 72°C a 10 seg, y la curva de melting a 95°C a 5 seg, 65°C a 1 min y 97°C continuo en el termociclador LightCycler Nano (Roche). Además, se evaluó la eficiencia de amplificación para cada par de cebadores con diluciones de ADNc, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:1000 y 1:10000 por triplicado. La cuantificación relativa de la abundancia del ARNm de los genes se evaluó en base al método del Livak, con el gen constitutivo *MSMEG_2758*, que se usó para normalizar los niveles de expresión relativa entre cada las muestras tratadas y sin tratar con ATc (29,109).

7.5.9. Clonación múltiple de dos ARN guías en el plásmido pLJR962.

Una vez que se corroboró el silenciamiento de los genes de interés por CRISPRi, con el ARNg diseñado correctamente se pasó a realizar la clonación múltiple.

En la clonación múltiple se usaron principalmente dos plásmidos recombinantes con diferentes ARNg clonados. Al primer plásmido con un ARNg de un gen se le

realizo un PCR, al segundo plásmido que contenía otro ARNg de un gen diferente se linearizo con la enzima de restricción *SapI* (NEB: 10U/ μ l).

El primer plásmido recombinante con un ARNg clonado fue usado como blanco para un PCR con los cebadores 2433 (5'-AAT ATG CTC TTC AGG ATC TGA CCA GGG AAA ATA GCC-3') y 2434 (5'-TTT ATG CTC TTC ACT GAA AAA AAA AAC ACC CTG CCA TAA AAT GAC-3'), los cuales tienen insertado la secuencia de la enzima de restricción *SapI* (5'... GCTCTTC(N)₁...3', 3'...CGAGAAG (N)₄...5'). LA PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l con la polimerasa 2x Phusion High Fidelity (Thermo Fisher), 0.5 μ M de cebadores, 10 ng de plásmido y el volumen se completó con agua PCR, siguiendo las siguientes condiciones: 2 min de denaturación a 98°C; 27 ciclos de 45 seg a 98°C de denaturación, 30 seg a 62°C de hibridación y 10 seg a 72°C de extensión.

Los productos PCR fueron verificados en un gel de agarosa al 1% a una corrida electroforética de 95 V durante 45 min, en el cual se usó el marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Luego los productos PCR fueron purificados de productos que puedan inhibir la reacción de digestión con las columnas de purificación PCR (ROCHE).

A los productos amplificados y purificados se les realizó la digestión con 10 U de la enzima *SapI* (NEB: 10U/ μ l), 1X del buffer CutSmart (NEB: 10X), 1-2 μ g del producto PCR en un volumen final de 20 μ l completado con agua PCR, se incubó toda la noche a 37°C, luego para inactivar la enzima, comprobar y purificar la digestión de los productos PCR se efectuó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con 1X de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) a 96V durante 45 min, se purificó el producto PCR digerido a través de un gel de agarosa al 0.8% con el

kit Zymo clean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research) y se midió la concentración final del producto en el nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

7.5.9.1. Digestión de los plásmidos recombinantes

El segundo plásmido recombinante con un ARNg diferente fue linearizado con la enzima *SapI* (NEB: 10 U/μl). Se mezcló 2 μg – 5 μg del plásmido linearizado con 10 U de la enzima *SapI* (NEB: 10U/μl), 1X del buffer CutSmart (NEB: 10X), la enzima rSAP (1U/μl) y se completó con agua PCR en un volumen de 40μl, se incubó a 37°C durante 18 horas. Se comprobó que el plásmido fue linearizado por una electroforesis de agarosa a 96 V por una hora en un gel al 0.8% con 1X de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen), a partir de ello se realizó la purificación del plásmido para eliminar residuos que pueden inhibir la reacción de ligación con Zymo clean™ Gel DNA Recovery kit (Zymo Research) y se midió la concentración del plásmido digerido en el nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

7.5.9.2. Clonación múltiple por el método de *Golden Gate*:

La clonación múltiple se realizó a través del método Golden Gate con el plásmido y el producto PCR digeridos con la enzima *SapI* (NEB: 10U/μl) y purificados por gel de agarosa. Las enzimas de restricción IIs (*BsmBI* y *SapI*) tiene la capacidad de cortar el ADN plasmídico, 4 nucleótidos fuera del sitio de reconocimiento, los cuales servirán para ensamblar y clonar múltiples secuencias en un solo paso de manera eficiente y fácil (110,111).

A 75 ng de plásmido digerido se le agregó 75 ng de producto PCR, 2.5μl de Buffer T4 ADN ligasa (NEB: 10X), 2.5 unidades de T4 ADN ligasa (NEB: 10 U/μl) y agua PCR en 25μl. La mezcla se incubó siguiendo el protocolo de New England Biolabs, (5 min a 37°C y 5 min a 16°C) 30 veces, seguido por 5 min a 60°C, luego

toda la noche a 4°C y repetir finalmente 5 min a 60°C y el constructo fue transformado por shock térmico en células competentes de *E. coli* Nova blue (Anexo 1 y 2).

7.5.9.3. Verificación de la clonación múltiple por PCR de colonia

Las colonias de clonación múltiple fueron verificadas por PCR de colonia con los cebadores 2436 (5'-TGC GGC GCT TTT TTT TTT GAA TTC-3') y 2438 (5'-CTG CGT TAT CCC CTG ATT CTG-3'), que flanquean el sitio de clonación múltiple con sitios de restricción de tipo IIs con un producto de 506pb. Asimismo, se usó un control negativo, que fue el plásmido con un solo ARNg que amplificó 355pb. Para amplificar los productos PCR se tomó una asada de las colonias resuspendiéndolas en 100 µl de Buffer TE, luego se homogenizó con el vortex durante 3 min y se hirvió a 95°C durante 5 min, se tomó 1µl del sobrenadante para hacer el máster mix. El PCR de colonia se realizó con 1X de ADN polimerasa 2X Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific), 1µl de ADN extraído, 0.5µM de cebadores forward y reverse en un volumen final de 20µl. El ciclaje fue como sigue: 30 seg de desnaturalización inicial a 98°C; 27 ciclos de 10 seg de desnaturalización a 98°C, 30 seg de hibridación a 61°C, 11seg de extensión a 72°C y 2 min de extensión final a 72°C.

El tamaño de los productos PCR fueron verificados en un gel de agarosa al 1% a 96 V durante 50 min. Luego se verificó la secuencia de los ARNg por secuenciación de Sanger (MACROGEN, USA) con los cebadores forward (5'-GGC TCC CTC ACG ATA TCA ATA AACG-3') y reverse (5'-CAC CTC TGA CTT GAG CGT CGAT-3') y análisis en el software MEGA.

7.5.9.4. Verificación de la clonación múltiple por secuenciación

En el análisis del secuenciamiento primero se localizó las secuencias completas o parte de ellas, dependiendo del ruido, baja calidad del cromatograma, a los primers 2436 y 2438.

El ARNg 1 se localizó a partir de los nucleótidos de los primers 2433 (5'-TCT GAC CAG GGA AAA TAG CC-3') y 2434 (5'-AAA AAA AAA ACA CCC TGC CAT AAA ATG AC-3'), subrayado, en el interior se ubicaron una parte de los sitios de corte de la enzima de restricción *BsmBI*, (5'-GGGA-3') en el cual inmediatamente inicio el ARNg del gen, ARNg de *MSMEG_3815*, color rojo (5'-GCA CGG TGG TCG CGG CGA CC-3') (Esquema 3).

El ARNg 2 se ubicó según un fragmento del sitio de corte de la enzima de restricción *SapI* (5'-GGA-3'), seguidas por las secuencias de los primers 2433 y 2434 (5'-GGA TCT GAC CAG GGA AAA TAG CC-3') y (5'-CTG AAA AAA AAA ACA CCC

TGC CAT AAA ATG AC-3') respectivamente, luego se encontraron los sitios de corte de *BsmBI* seguido por el ARNg 2, *MSMEG_0410* (5'-GCCCATCTTGGCGAAACTCA-3') (Esquema 3).

```
AATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTATCTGTTGTTTG
AAAAAAAAAAGCGCCGCAACTGCGGCGCTTTTTTTTTTTGAATTCTCTGACC
AGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGCGATCCCTATCAGTGATAGAT
ATAATCTGGGAGCACGGTGGTCGCGGCGACC GTTTTTGTACTCGAAAGAAG
CTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAG
GGTGTTTTTTTTTTTGTCGACTTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTTT
GGATCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGCGATCCCTATC
AGTGATAGATATAATCTGGGAGCCCATCTTGGCGAAACTCA GTTTTGTACT
CGAAAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATT
TTATGGCAGGGTGTTTTTTTTTTTTCAGGAAGCTTAAAAAAAAAAGCCCCGCGAT
TGCGGGGCTTTTTTTTTTTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC
AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
```

Esquema 3: Análisis del secuenciamiento de la clonación múltiple de dos genes.

7.5.10. Velocidad de eflujo del POA

Las cepas con los genes silenciados se cultivaron hasta llegar a fase logarítmica y luego se diluyó a un OD_{600nm} de 0.1 a 0.2 en 17ml de 7H9 - T para inducir el silenciamiento con ATc (100 ng/μl) y sin ATc (control) a 37°C por 14 – 24 horas.

Los cultivos fueron centrifugados a 12500 rpm durante 20 min a 4°C, el pellet fue resuspendido con 12 mL de buffer citrato 10mM pH7 hasta ajustar sus OD_{600nm} por igual. Posteriormente se prepararon alícuotas de 900 μl de la suspensión en tubos de 1.5 mL y se incubó durante 20 min a 37°C, luego se incubó con 100 μl de 10 mM de PZA (Sigma Aldrich) a 37°C en diferentes intervalos de tiempo 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min, la reacción se detuvo por centrifugación a 14800 rpm por 2 min, de los cuales se guardó 500 μl del sobrenadante, fracción extracelular, para la reacción de Wayne. Así mismo, al tubo control, tubo 0, con 900 μl de cultivo, no se incubó con PZA, se centrifugó y se tomó solamente 450 μl del sobrenadante, al cual se le agregó 50 μl de 10mM PZA y el pellet se resuspendió con 500 μl de 10 mM de buffer citrato a pH 7, luego fue hervido a 100°C por 20 min, centrifugado a 10000 rpm durante 10 min y el sobrenadante, la fracción intracelular, se usó para la cuantificación por Bradford.

7.5.10.1.Reacción de Wayne:

El POA, expulsado por la bacteria, fue cuantificado mediante la reacción de Wayne. La reacción de Wayne detecta el POA debido a que se une con el sulfato de amonio ferroso formando un complejo de color rojo que es detectado a 450 nm (112,113). Se adicionó 10ul de 20% de sulfato de amonio ferroso a 500 μl de la fracción extracelular, se mezcló con el vortex y se incubó 5 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min, se tomó 100 μl de sobrenadante y

se puso en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar) y se realizó la lectura en el espectrofotómetro (Spectra mMax 190) a 450 nm. La cuantificación se realizó mediante una curva estándar de POA con concentraciones de POA 0.4, 2, 4, 8, 12 y 16 mM en 10 mM de buffer citrato pH 7.

7.5.10.2. Bradford

La técnica de Bradford es un método sensible y rápido para la cuantificación de proteínas a través de colorimetría utilización la luz visible (114). El objetivo de cuantificar las proteínas de la fracción intracelular es de obtener un número aproximado de bacterias y así poder normalizar la concentración de POA con el número de células (POA mg/ proteínas). Las absorbancias obtenidas por el método de Wayne en los diferentes tiempos, 0, 5, 10, 15, 20, 25 en los cultivos tratados con ATc y sin ATc fueron divididas por la concentración en mg de la proteína cuantificada por Bradford respectivamente (27).

En una placa de 96 pozos se agregó 20 µl de las fracciones intracelulares y se agregó 200 µl de la reacción de Bradford diluida con agua MQ 1:4, se midió la absorbancia a 595 nm. Además, se realizó una curva estándar para cuantificar las proteínas con 5, 10, 20, 50, 80 y 100 µg/ml de BSA.

7.5.11. Análisis

La variabilidad del eflujo del POA entre las bacterias inducidas y no inducidas con el sistema CRISPRi, en los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min fue validada por una regresión lineal múltiple con un intervalo de confianza al 95% utilizando el software estadístico Stata versión 14.

VIII. RESULTADOS

8.1. Alineamiento de secuencias y selección de los genes homólogos de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*

La búsqueda de las secuencias homólogas en *M. smegmatis* de los genes *Rv1258c*, *Rv1634*, *Rv0202c*, *Rv3728*, *Rv2005c*, *Rv1183*, *Rv1250*, *Rv0934*, *Rv3239c*, *Rv1348* y *Rv0507* de *M. tuberculosis* se realizó con el software en línea Blast de NCBI (115). El análisis fue realizado a partir del inicio de marco de lectura de cada gen a nivel de aminoácidos, buscando que las proteínas en *M. smegmatis* tengan un porcentaje de identidad mayor al 20% y una cobertura mayor al 50% con los aminoácidos de *M. tuberculosis* (figura 6) (Anexo 7).

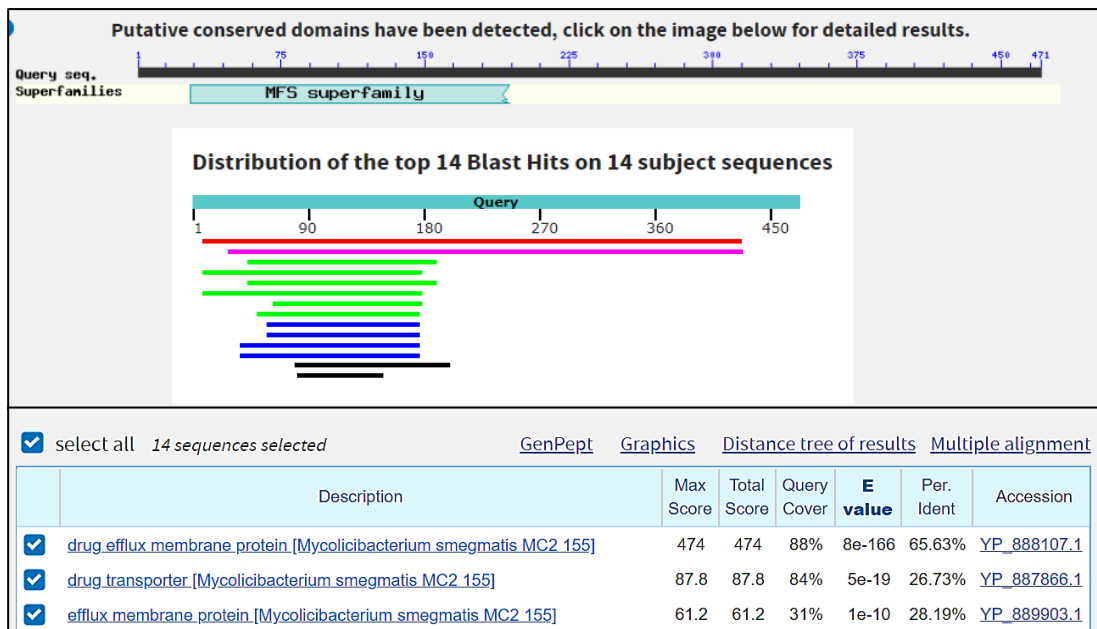


Figura 6: Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv1634* de *M. tuberculosis*, encontrando como homólogo el transportador de tipo MFS en *M. smegmatis* mc²1555 con 65.63% de identidad, 88% de cobertura y con el número de accesoión YP_888107.1.

En total se obtuvieron nueve genes codificantes de bombas de eflujo en MTB con sus respectivos homólogos en *M. smegmatis* (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados de la homología de los genes de bombas de eflujo de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*. Quedando como candidatas por mayor homología y cobertura los genes *MSMEI_4905*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_0410*, *MSMEG_5046*, *MSMEG_5782*, *MSMEG_6554*, *MSMEG_3496* y *MSMEG_0250*

	Locus	Cobertura	Identidad	Gen Homólogo	Número de accesión
1	<i>Rv1258c</i>	68%	62.59%	<i>MSMEI_4905</i>	AFP41349.1
2	<i>Rv1634</i>	88%	65.63%	<i>MSMEG_3815</i>	YP_888107.1
3	<i>Rv0202c</i>	100%	69%	<i>MSMEG_0241</i>	YP_884656.1
4	<i>Rv1183</i>	97%	57%	<i>MSMEG_0410</i>	YP_884823.1
5	<i>Rv1250</i>	86%	64.47%	<i>MSMEG_5046</i>	YP_889296.1
6	<i>Rv0934</i>	77%	34.23%	<i>MSMEG_5782</i>	YP_890011.1
7	<i>Rv1348</i>	99%	71.58%	<i>MSMEG_6554</i>	YP_890766.1
8	<i>Rv0507</i>	95%	59.31%	<i>MSMEG_3496</i> (<i>mmpl4</i>)	YP_887800.1
9	<i>Rv0206c</i>	66%	77%	<i>MSMEG_0250</i> (<i>mmpl3</i>)	WP_011726778.1

8.2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *M. tuberculosis* con sus homólogos en *M. smegmatis*

Se comprobó los resultados de BLASTp de las secuencias homólogas de los genes *Rv1258c*, *Rv1634*, *Rv1183*, *Rv0202c*, *Rv1250*, *Rv0934*, *Rv1348*, *Rv0507* y *Rv0206c* de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*, por alineamiento simple global de las secuencias de aminoácidos completas, comprobándose una vez más que los genes *MSMEI_4905*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_0410*, *MSMEG_5046*,

Tabla 4: Alineamiento de las secuencias de MTB con los genes de *M. smegmatis* por Clustal, en el cual se obtiene una identidad mayor de 30% y una similitud mayor al 40%

Genes de MTB	Genes homólogos en <i>M. smegmatis</i>	Identidad	Similitud
<i>Rv1634</i>	<i>MSMEG_3815</i>	63.2%	75%
<i>Rv0202c</i>	<i>MSMEG_0241</i>	69%	80.6%
<i>Rv1183</i>	<i>MSMEG_0410</i>	55%	72%
<i>Rv1250</i>	<i>MSMEG_5046</i>	55.8%	67.4%
<i>Rv0934</i>	<i>MSMEG_5782</i>	30.5%	45.3%
<i>Rv1348</i>	<i>MSMEG_6554</i>	71.4%	83.6%
<i>Rv0507</i>	<i>MSMEG_3496</i>	56%	72.3%
<i>Rv1258c</i>	<i>MSMEI_4905</i>	42.7%	51.1%
<i>Rv0206c</i>	<i>MSMEG_0250</i>	69.68%	66%

8.3. Diseño de los ARN guías

Se diseñaron un par de oligonucleótidos por cada gen, para hibridarlos, del cual se obtendrá el ADN molde, a partir del cual se generará un ARNg por cada gen cuando este sea sobreexpresado en las micobacterias. Se obtuvo un ARNg para *MSMEG 5782*, *MSMEG_3496*, *MSMEG_6554*, *MSMEG 1258*, *MSMEG_3815* y *MSMEG_0241* y dos pares ARNg diferentes para *MSMEG_5046*, *MSMEG_1258* y *MSMEG_0410*. Además, para el gen *MSMEG_0250* se usó la secuencia de ARNg reportada previamente (Tabla 5) (29).

Tabla 5: Oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de los genes de interés para formar los ARN guías del sistema de CRISPRi. Las letras rojas es el nucleótido del inicio del ARNg. Las letras moradas los nucleótidos necesarios para clonar los ARNg dentro del plásmido pLJR962.

		Oligonucleotido 1	Oligonucleotido 2
<i>MSMEG_3815</i>	F:	5' GGGG G CACGGTGGTCGCGGCGACC 3'	
<i>Rv1634</i>	R:	5' AAAC GGTCGCCGCGACCACCGTGC 3'	
ARN guía		5' G CACGGTGGTCGCGGCGACC 3'	
<i>MSMEG_0410</i>	F:	5' GGGG GCCCATCTTGCGAAACTCA 3'	5' GGGG GGTGGTCTGTCTGGCTGG 3'
<i>Rv1183</i>	R:	5' AAAC TGAGTTTCGCCAAGATGGGC 3'	5' AAAC CCAGCCAGGACAAGACCACC 3'
ARN guía		5' GCCCATCTTGCGAAACTCA 3'	5' GGTGGTCTGTCTGGCTGG 3'
<i>MSMEG_5046</i>	F:	5' GGGG ATGCCGACGGGACGTTGAC 3'	5' GGGG GCGACACCGCGCCGGTTCGC 3'
<i>Rv1250</i>	R:	5' AAAC GTCAACGTCCCCGTCGGCAT 3'	5' AAAC GCGAACCGCGCGGTGTCGC 3'
ARN guía		5' ATGCCGACGGGACGTTGAC 3'	5' GCGACACCGCGCCGGTTCGC 3'
<i>MSMEG_5782</i>	F:	5' GGGG GCGGCGCAGTGAGGTACTT 3'	
<i>Rv0934</i>	R:	5' AAAC AAGTACCTCACTGCCGCCGC 3'	
ARN guía		5' GCGGCGCAGTGAGGTACTT 3'	
<i>MSMEG_1258</i>	F:	5' GGGG GACCGAGACGAGTCCCAGCA 3'	5' GGGG ACCCCGCGCGCCGGCCGCCTCGG 3'
<i>Rv1258c</i>	R:	5' AAAC TGCTGGGACTCGTCTCGGT 3'	5' AAAC CCGAGGCGCGCCGGCCGCGGGGT 3'
ARN guía		5' GACCGAGACGAGTCCCAGCA 3'	5' ACCCCGCGCGCCGGCCGCCTCGG 3'
<i>MSMEG_6554</i>	F:	5' GGGG ATGTACTCGTCGAGGCGGCG 3'	
<i>Rv1348</i>	R:	5' AAAC CGCCGCTCGACGAGTACAT 3'	
ARN guía		5' ATGTACTCGTCGAGGCGGCG 3'	
<i>MSMEG_3496</i>	F:	5' GGGG GCTGTCGACAGTGGCTCCCA 3'	
<i>Rv0507</i>	R:	5' AAAC TGGGAGCCGCACTGCGACAGC 3'	
ARN guía		5' GCTGTCGACAGTGGCTCCCA 3'	
<i>MSMEG_0241</i>	F:	5' GGGG GCAAGCGGTGATGCGCCCTGGTC 3'	
<i>Rv0202c</i>	R:	5' AAAC GACCAGGCGCATCACCGCTTGC 3'	
ARN guía		5' GCAAGCGGTGATGCGCCCTGGTC 3'	
<i>MSMEG_0250</i>	F:	5' GGGG GTCGGTAACGAAGTATGCCGA 3'	
<i>Rv0206c</i>	R:	5' AAAC TCGGCATACTTCGTTACCGAC 3'	
ARN guía		5' GTCGGTAACGAAGTATGCCGA 3'	

8.4. Clonación de un ARN guía en el plásmido pLJR962

8.4.1. Digestión y purificación por gel del plásmido pLJR962

Los resultados de la digestión del plásmido pLJR962 con la enzima *SapI* (NEB: 10U/ μ l) se muestran en la Figura 8. Se obtuvo 0.6 μ g de plásmido purificado, el cual se verificó el tamaño y purificación del producto de 8881pb, junto al plásmido sin linearizar (500 ng/ μ l),

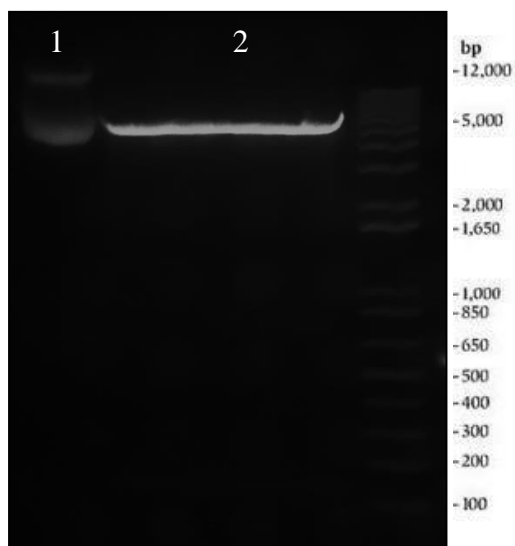


Figura 8: Electroforesis de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1X. (1) Plásmido pLJR962 sin digerir, (2) Plásmido linearizado con *SapI*, migra menos a comparación de la forma circular del carril 1 y (3) Marcador 1 kb plus DNA ladder.

8.4.2. Formación de los ARN guías

Los ADN moldes hibridados de los ARNg de los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_5046*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_3496*, *MSMEG_0410*, *MSMEG_5782*, *MSMEG_6554* y *MSMEG_1258* tuvieron un tamaño aproximado de 30pb.

8.4.3. Ligación del ARN guía en el plásmido pLJR962

El número de colonias obtenidas, que contenían el vector ligado con el ARNg de los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_5046*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_3496*, *MSMEG_0410*, *MSMEG 5782*, *MSMEG_6554* y *MSMEG 1258* fueron más de 20; además las colonias con el plásmido autoligado representaron menos del 10% de las colonias transformadas (Figura 9).

Además, se llegó a clonar un segundo ARNg diferente para los genes *MSMEG_0410*, *MSMEG_5046* y *MSMEG 1258*, codificándolo como ARNg 2 o agregando el número 2 al gen para diferenciarlos del primer ARNg diseñado.

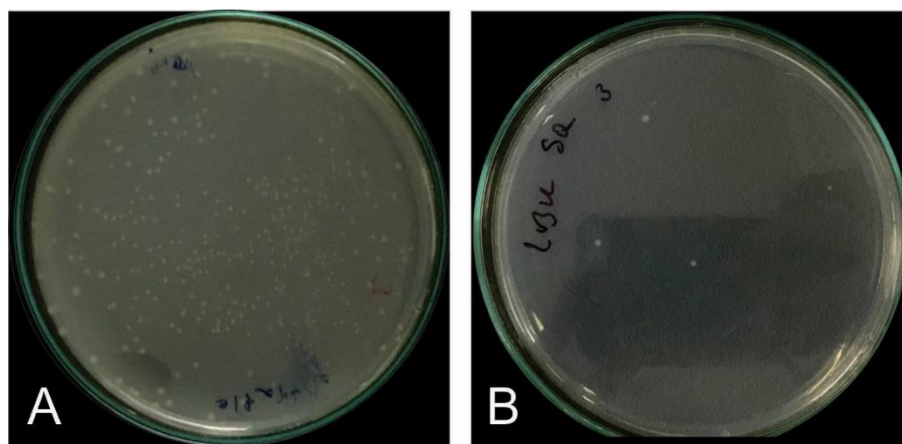


Figura 9: Clonación de un ARN guía en el plásmido pLJR962. (A) Placa de colonias de *E. coli* nova blue con el inserto del ARNg del gen *MSMEG_5046* ligado en el plásmido, (B) Placa control, plásmido ligado sin inserto, en la cual solo se observa una colonia.

8.4.4. Verificación de las colonias transformadas con el plásmido recombinante que contiene el ARNg por secuenciación

A través del programa MEGA-X se comparó el plásmido pLJR962 sin ARNg clonado con los plásmidos con los insertos de los ARNg diseñados para cada gen. Para el caso de los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_3496*, *MSMEG_5782* y *MSMEG_6554* se analizaron una clona con un solo ARNg; en cambio para los genes *MSMEG_0410*, *MSMEG_5046*, y *MSMEG_1258* se analizaron dos clonas con ARN guías diferentes (Figura 10).

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. pLJR962	3 A T A G A T A T A A T C T G G G A G G A G A C G A T T A A T G C G T C T C G G T T T T T G T
2. pLJR962_MSMEG_0250_18343	A T A G A T A T A A T C T G G G A G C G A C A G A C T G G C T G C C C T C G T C G T T T T T
3. MSMEG_0250	----- G C G A C A G A C T G G C T G C C C T C G T C
4. pLJR962_MSMEG_3815_18343	A T A G A T A T A A T C T G G G A G C A C G G T G G T C G C G G C G A C C G T T T T T G T A
5. MSMEG_3815	----- G C A C G G T G G T C G C G G C G A C C
6. pLJR962_MSMEG_0410_1_1833	A T A G A T A T A A T C T G G G A G C C C A T C T T G G C G A A A C T C A G T T T T T G T A
7. MSMEG_0410_1	----- G C C C A T C T T G G C G A A A C T C A
8. pLJR962_MSMEG_0410_2_C13	A T A G A T A T A A T C T G G G A G G T G G T C T T G T C C T G G C T G G G T T T T T G T A
9. MSMEG_0410_2	----- G G T G G T C T T G T C C T G G C T G G
10. pLJR962_MSMEG_3496_1833	A T A G A T A T A A T C T G G G A G C T G T C G C A G T G C G G C T C C C A G T T T T T G T
11. MSMEG_3496	----- G C T G T C G C A G T G C G G C T C C C A
12. pLJR962_MSMEG_5046_1_13	A T A G A T A T A A T C T G G G A A T G C C G A C G G G G A C G T T G A C G T T T T T G T A
13. MSMEG_5046_1	----- A T G C C G A C G G G G A C G T T G A C
14. pLJR962_MSMEG_5046_2_C3	A T A G A T A T A A T C T G G G A G C G A C A C C G C G C C G G T T C G C G T T T T T G T A
15. MSMEG_5046_2	----- G C G A C A C C G C G C C G G T T C G C
16. pLJR962_MSMEG_1258_1_13	A T A G A T A T A A T C T G G G A G A C C G A G A C G A G T C C C A G C A G T T T T T G T A
17. MSMEG_1258_1	----- G A C C G A G A C G A G T C C C A G C A
18. pLJR962_MSMEG_1258_2_C3	A T A G A T A T A A T C T G G G A A C C C C G C G C G G C C G G C C G C C T C G G G T T T T
19. MSMEG_1258_2	----- A C C C C G C G C G G C C G G C C G C C T C G G
20. pLJR962_MSMEG_0241_1833	A T A G A T A T A A T C T G G G A G C A A G C G G T G A T G C G C C C T G G T C G T T T T T
21. MSMEG_0241	----- G C A A G C G G T G A T G C G C C C T G G T C
22. pLJR962_MSMEG_5782_1833	A T A G A T A T A A T C T G G G A G C G G C G G C A G T G A G G T A C T T G T T T T G T A C
23. MSMEG_5782	----- G C G G C G G C A G T G A G G T A C T T
24. pLJR962_MSMEG_6554_1833	A T A G A T A T A A T C T G G G A A T G T A C T C G T C G A G G C G G C G G T T T T G T A C
25. MSMEG_6554	----- A T G T A C T C G T C G A G G C G G C G

Figura 10: Secuenciación de los plásmidos recombinantes que contienen el ARNg de los genes de interés.

8.5. Transformación de *M. smegmatis* por electroporación con el plásmido recombinante conteniendo un ARNg clonado.

Los plásmidos que contenían un ARNg fueron introducidos en *M. smegmatis* por transformación empleando electroporación, con colonias visibles, y no se encontraron colonias recombinantes en el grupo control (sin plásmido) (Figura 11).

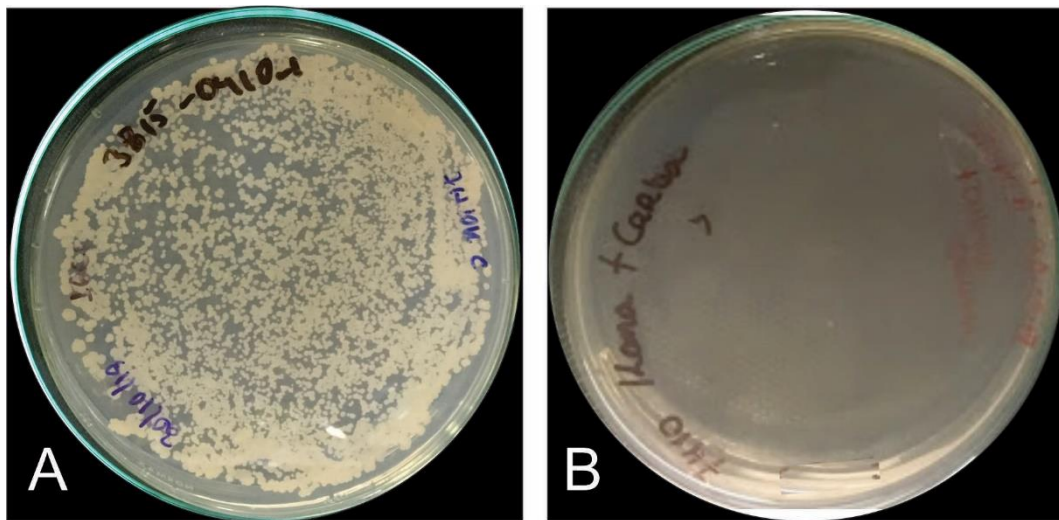


Figura 11: Transformación de *M. smegmatis* por electroporación con el plásmido pLJR962 con un ARN guía clonado. (A) Placa de colonias transformadas de *M. smegmatis* con el plásmido pLJR962 con el ARNg del gen *MSMEG_3815* en medio 7H10 con kanamicina, (B) Placa control de colonias de *M. smegmatis* sin plásmido en medio 7H10 con kanamicina.

8.6. Ensayo fenotípico para determinar el efecto en el crecimiento bacteriano debido a los genes silenciados por CRISPRi

El gen *MSMEG_0250*, se usó como control ya que al ser un gen esencial se espera una disminución de crecimiento en las placas tratadas con el inductor a comparación de las placas control (Figura 12). Sin embargo, para los genes no esenciales

MSMEG_3815, *MSMEG_5046* (ARNg1 y ARNg2), *MSMEG_0241*, *MSMEG_0410* (ARNg1 y ARNg2), *MSMEG_6554*, *MSMEG_5782* y *MSMEG_1258* (ARNg1 y ARNg2) no se observó diferencia significativa en el crecimiento bacteriano.

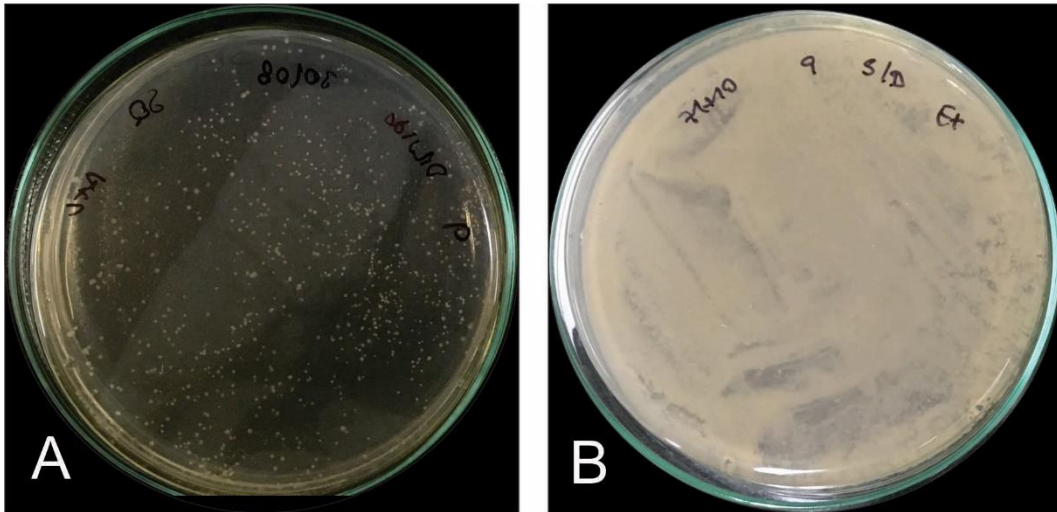


Figura 12: Prueba fenotípica de la co-expresión de *dcas9_{sth1}* y el ARNg del gen *MSMEG_0250*, (A) se observa menor crecimiento de la bacteria en las placas tratadas con ATc, (B) placas sin ATc, por lo que se observa mayor crecimiento bacteriano a comparación de la placa A.

8.7. Cuantificación relativa del ARNm de los genes seleccionados

8.7.1. Integridad del ARN total extraído

La concentración obtenida del ARN total de *M. smegmatis* con los genes *MSMEG_3815*, *MSMEG_5046* (ARNg1 y ARNg2), *MSMEG_0241*, *MSMEG_0410* (ARNg1 y ARNg2), *MSMEG_6554*, *MSMEG_5782* y *MSMEG_1258* (ARNg1 y ARNg2) silenciados por CRISPRi y sin silenciar fueron fue 1900ng –

2000ng con la relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.75 y 260/230 mayor a 1.9.

Además, para verificar la integridad del ARN total, se realizó una corrida electroforética donde se observó los ARN ribosomales bacterianos 16S, 23S y 5S sin signos de degradación. Sin embargo, también se observó ADN genómico, por lo que se realizó un tratamiento con ADNasa I (Invitrogen) previo a la retrotranscripción (Figura 13).

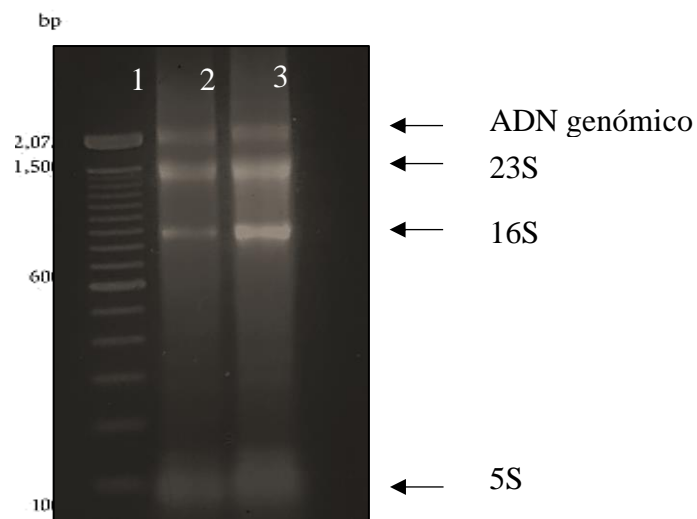


Figura 13: Corrida electroforética en 1.5% de agarosa en buffer TBE 1X de 1 µg de ARN total extraído de las cepas de *M. smegmatis* con el sistema de CRISPRi del gen *MSMEG_3815*, (1) Marcador 100pb (Invitrogen) (2) Cepas tratadas con ATc, genes diana silenciados, (3) Cepas sin tratar con ATc, genes diana no silenciados, control. Además, se señalan los ARN ribosomales bacterianos 23S, 16S y 5S.

8.7.2. PCR en tiempo real para la cuantificación relativa.

Se diseñaron un par de cebadores específicos por cada secuencia de genes, ubicados en la región *downstream* flanqueante a la secuencia de los ARNg (Tabla 6).

Los Cq de los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* (ARNg1 y ARNg2) y *MSMEG_0410* (ARNg1 y ARNg2) silenciados, tratados con ATc, fueron más tardíos (Cq más altos) entre 23 – 26 y los que no fueron silenciados, sin tratar con ATc, estuvieron entre 15 – 19. En cambio, los Cq de los genes *MSMEG_5782*, *MSMEG_6554*, *MSMEG_1258* y *MSMEG_3496* silenciados y no silenciados, no variaron, 24 – 25, por lo que al calcular el *fold change* no hubo cambio en la expresión de los genes.

Tabla 6: Cebadores de los genes candidatos para realizar PCR en tiempo real

Secuencia		Cebadores qPCR
<i>MSMEG_3815</i>	F:	ACGGTGTATCTGGTCGCTTC
	R:	GTGTTGATGACGGCGTACC
<i>MSMEG_0410</i>	F:	CCAGCAACGAAGGCAATCTC
	R:	CGGGTTTGTGAGTCCCAT
<i>MSMEG_5046</i>	F:	CGGTCGGCATGTTCTGAT
	R:	GTGTTACCGACTGCCAGAA
<i>MSMEG_5782</i>	F:	CACCTACGAGATCGTGTGCT
	R:	CTCTTTGAAGCGTTGGGCA
<i>MSMEG_1258</i>	F:	ATGGAGAGTGTGCTGTTCCC
	R:	TTCGACAGCACCGCGTA
<i>MSMEG_6554</i>	F:	ACCCCGAATCGGAATACCTG
	R:	CGTTCCGGTTTCGACGATG
<i>MSMEG_3496</i>	F:	CGGTCTCAACACGGGAATCA
	R:	CGGATCACCAAGGTGTCGAA
<i>MSMEG_0250</i>	F:	CATCAGCGTCGCCTTGATTG
	R:	GAATCACGGTCTTGGTCGGT
<i>MSMEG_0241</i>	F:	CAAGATCGAGGTGACCGACC
	R:	GACTGATCGTCTGTGGGG

8.7.3. Cuantificación relativa del ARNm de los genes silenciados por CRISPRi

A partir de las tres repeticiones del qPCR de los genes candidatos, se calculó el *fold change* de los niveles de expresión con los Cq obtenidos de los genes silenciados con ATc y los no silenciados, normalizados con el gen constitutivo *MSMEG_2758*.

Se observó alta represión de la expresión, mayor a 3 *fold*, en los genes silenciados por CRISPRi *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* (ARNg1 y ARNg2) y *MSMEG_0410* (ARNg1 y ARNg2) (Figura 14). En cambio, en el silenciamiento de los genes *MSMEG_5782*, *MSMEG_6554*, *MSMEI_4905* (ARNg1 y ARNg2) y *MSMEG_3496* se observó una baja represión, fue menor a 3 *fold*, por lo que se optó por no evaluar la velocidad del eflujo del POA con estos últimos (Figura 15).

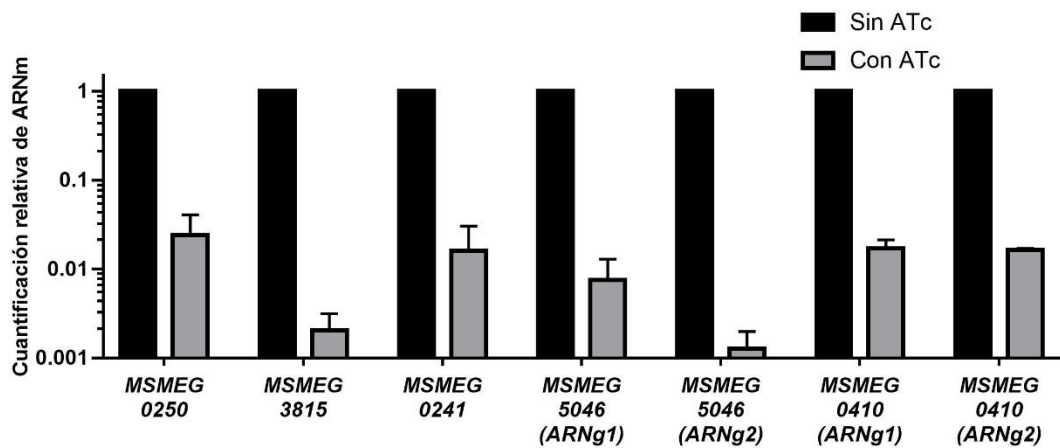


Figura 14: Gráfica de la diferencia de la co-expresión de dCas9_{sth1} con los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* (ARNg 1 y ARNg2) y *MSMEG_0410* (ARNg1 y ARNg2) por medio de la cuantificación relativa del ARNm, se observa que la represión de la expresión de los genes es alta.

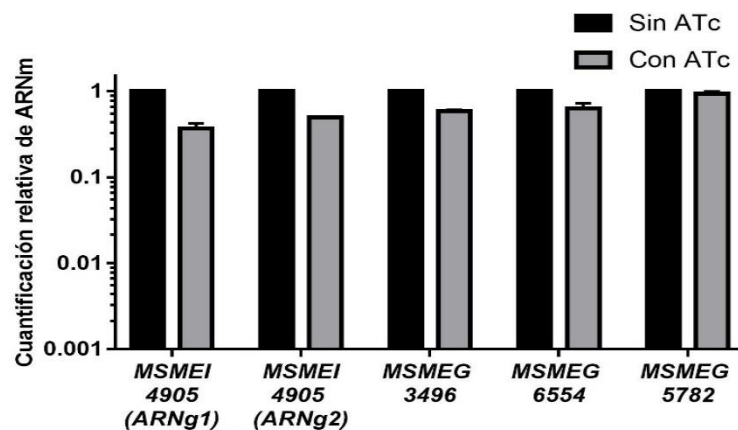


Figura 15: Gráfica de la diferencia de la co-expresión de dCas9sth1 con los genes *MSMEI_1258* (ARNg 1 y ARNg2), *MSMEG_3496*, *MSMEG_6554* y *MSMEG_5782* por medio de la cuantificación relativa del ARNm, se observa que la represión de la expresión de los genes es baja.

8.8. Clonación múltiple de dos genes

Una vez que se confirmó el cambio de expresión con el sistema CRISPRi de los genes *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_0250* y *MSMEG_0410*, se procedió a realizar la clonación múltiple en combinación de dos genes: *MSMEG_3815/MSMEG_0250*, *MSMEG_3815/MSMEG_0241* y *MSMEG_3815/MSMEG_0410*.

8.8.1. Linearización y purificación por gel del plásmido pLJR962 con un ARNg clonado

Los plásmidos pLJR962 con un ARNg clonado de los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_0241* y *MSMEG_3815* fueron linearizados con *SapI* (Figura 16).

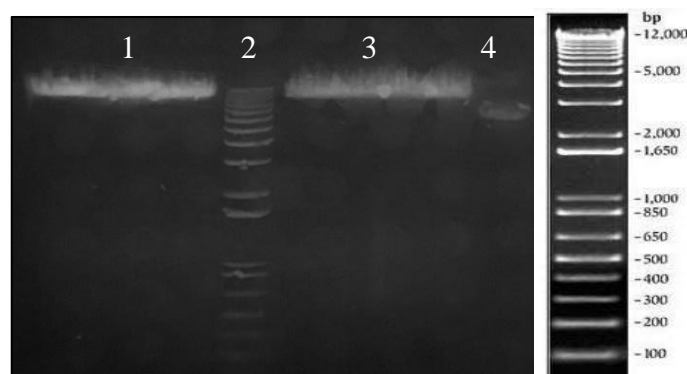


Figura 16: Corrida electroforética en 1% de agarosa con buffer TAE 1X de los plásmidos pLJR962 con un ARNg clonado de los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815* y *MSMEG_0241* y linearizados. (1 y 3) Vectores digeridos, (2) 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) y (4) vector sin digerir.

8.8.2. Amplificación del plásmido pLJR962 con un ARN guía clonado

La amplificación de los plásmidos con un ARNg clonado de los genes *MSMEG_0410*, *MSMEG_0250* y *MSMEG_3815* se realizó con los primers 2433 y 2434 (los cuales tienen secuencias de corte de la enzima *SapI*) obteniendo un producto PCR de 177pb (Figura 17).

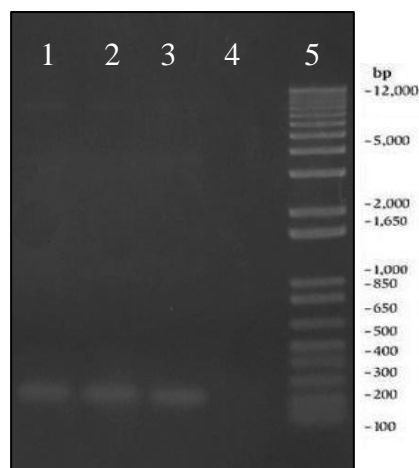


Figura 17: Corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%, (1, 2 y 3) productos PCR de los plásmidos pLJR962 con un ARNg clonado, amplificados con los primers 2433 y 2434, (4) control negativo y (5) marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

8.9. Método Golden gate para clonar dos ARN guías en el plásmido pLJR962

El resultado de la reacción de ligación del plásmido linearizado con un ARNg clonado (plásmido 2) y el producto PCR a partir del plásmido con otro ARNg clonado, digeridos con *SapI* (plásmido 1), transformado en *E. coli* Nova blue se muestra en la figura 18. Se obtuvo más de 20 colonias en la placa de LB agar con la reacción de ligación a comparación del control con plásmido autoligado en las que se obtuvo 1 colonia como máximo.

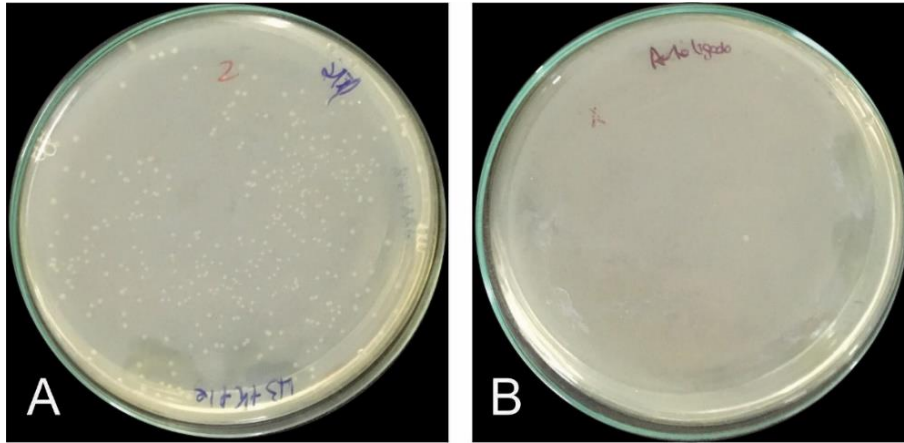


Figura 18: Clonación de dos ARN guías dentro del plásmido pLJR962, (A) En la placa se observan más de 20 colonias que contienen el plásmido pLJR962 con dos ARN guías y (B) en la placa se observa solo una colonia del control plásmido autoligado.

8.10. Verificación de la clonación múltiple

8.10.1. Verificación de la clonación múltiple de dos genes por PCR colony y secuenciación

Los productos PCR de las colonias clonadas con 1 ARNg (355pb) y 2 ARNg (506pb) y el control de plásmido autoligado se muestran en la figura 19.

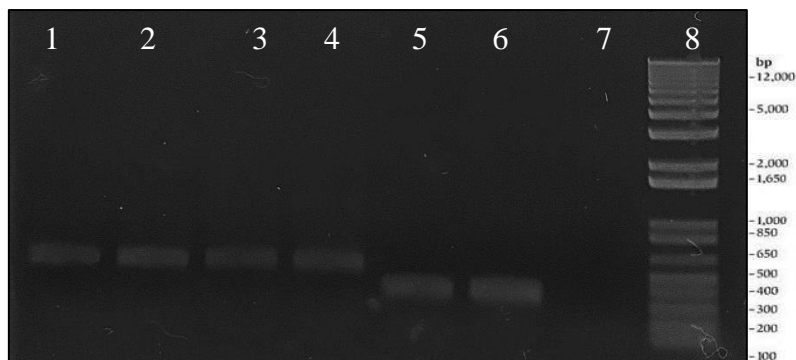


Figura 19: Verificación de la clonación múltiple. (1, 2, 3 y 4) Productos del PCR de las colonias transformadas con dos ARNg de diferentes genes en un plásmido

pLJR962. (5 y 6) Colonias recombinantes con un ARNg en un plásmido pLJR962 (7) control negativo y (8) Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Luego de que los productos PCR fueron verificados, se secuenciaron por SANGER; obteniendo como resultado las combinaciones *MSMEG_3815/MSMEG_0250*, *MSMEG_3815/MSMEG_0241* y *MSMEG_3815/MSMEG_0410*. Se muestra el análisis de secuenciación de la clonación de los genes *MSMEG_3815/MSMEG_0410* en el plásmido pLJR962 en la figura 20 y figura 21.



Figura 21: Comparación de las secuencias del plásmido pLJR962 sin inserto con el plásmido con los ARNg clonados del gen *MSMEG_3815/MSMEG_0410_1*; se observa el ARNg del gen *MSMEG_3815* en el software MEGA X.

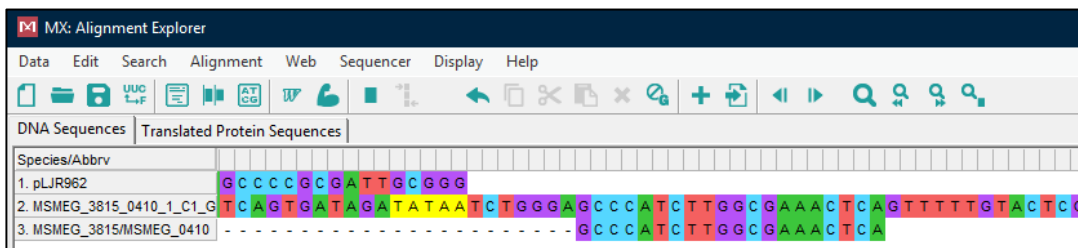


Figura 20: Comparación de las secuencias del plásmido pLJR962 sin inserto con el plásmido con los ARNg clonados del gen *MSMEG_3815/MSMEG_0410_1*; se observa el ARNg del gen *MSMEG_0410_1* en el software MEGA X.

8.11. Transformación en *M. smegmatis* por electroporación con los plásmidos pLJR962 conteniendo dos ARN guías

El resultado de la transformación de *M. smegmatis* por electroporación con el plásmido pLJR962 con dos ARN guías y el control es mostrado en la figura 22.

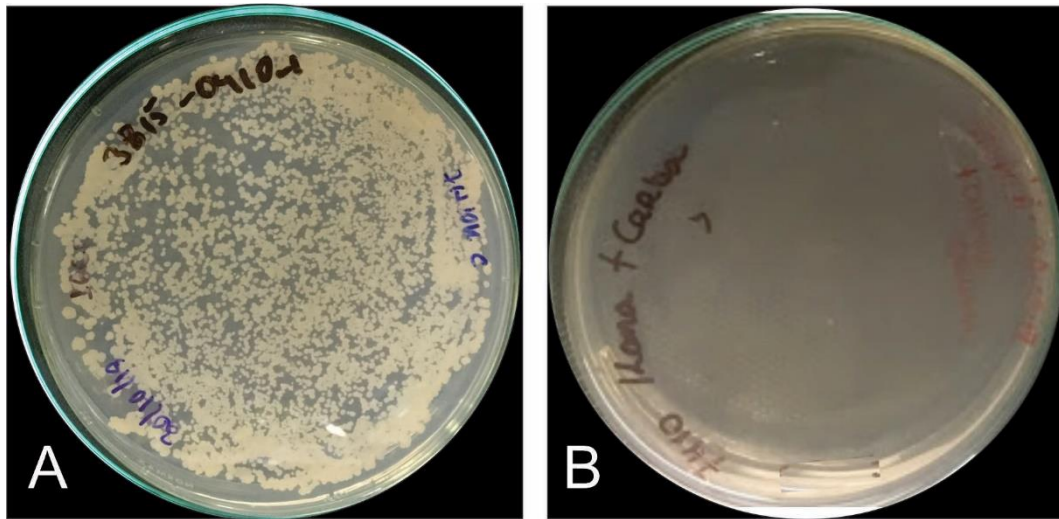


Figura 22: Transformación de *M. smegmatis* por electroporación con el plásmido pLJR962 con dos ARN guías clonados (A) Placa de colonias de *M. smegmatis* transformadas con el plásmido pLJR962 con los ARNg del gen *MSMEG_3815* y *MSMEG_0410* (ARNg1) y (B) Placa de *M. smegmatis* sin plásmido.

8.12. Evaluación del silenciamiento de la expresión génica por dos ARN guías

A través de qPCR se realizó la cuantificación relativa de los niveles del ARNm a cada gen por separado, corroborando que el *fold* de represión de las combinaciones sea igual al obtenido cuando se silenció cada gen por separado.

8.13. Medición de la velocidad del eflujo del POA cuando *M. smegmatis* tiene activado el sistema CRISPRi

Al medir el eflujo del POA cuando se co-expresaron los genes *MSMEG_0250*, *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* (ARNg1 y ARNg2) y *MSMEG_0410* (ARNg1 y ARNg2) con el dCas9_{sth1} con ATc, inducción del silenciamiento y sin ATc, se observó que el único gen que cambió el eflujo significativamente con $P=0.0003$ es el *MSMEG_0250*, a comparación de los otros genes y controles que tienen un $P>0.05$. Igualmente, se evaluó la cinética del eflujo cuando se silenciaron el gen *MSMEG_0410* con el segundo ARNg (*MSMEG_0410_2*), observando que no cambia el resultado con respecto a la evaluación del mismo gen con el primer ARNg (Figura 23).

Así mismo, el silenciamiento de dos genes *MSMEG_3815/MSMEG_0250*, *MSMEG_3815/MSMEG_0241* y *MSMEG_3815/MSMEG_0410* no mostró diferencia significativa en el cambio del eflujo del POA respecto a cuando están silenciados por separado. El silenciamiento en simultáneo de los genes *MSMEG_3815* y *MSMEG_0250*, mostró disminución de la velocidad de eflujo del POA ($P=0.000$) (Figura 24).

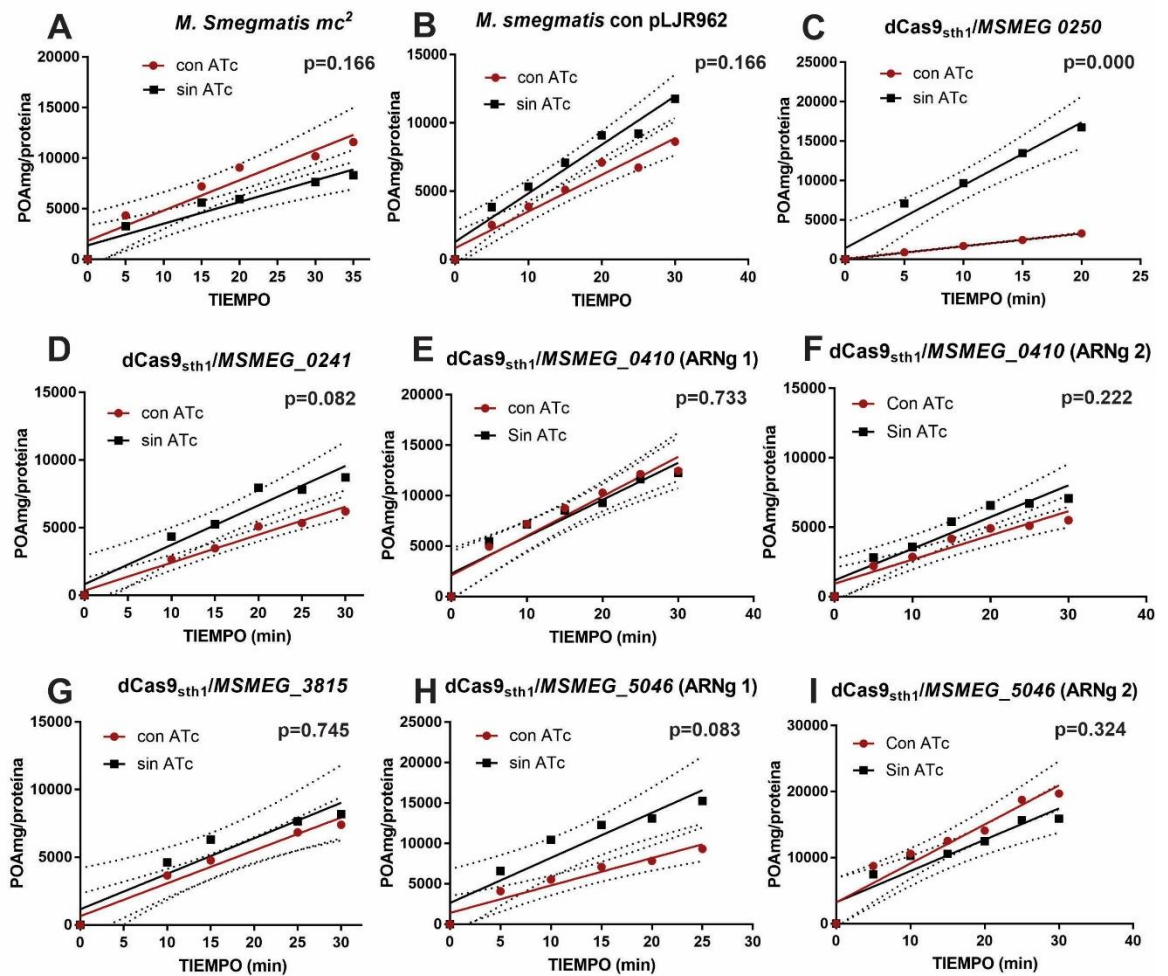


Figura 23: Medición de la velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* cuando un gen está silenciado con el sistema CRISPRi, inducido con ATc y sin silenciar, sin ATc. **(A)** Control 1, *M. smegmatis*, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo ($P=0.166$), **(B)** Control 2, *M. smegmatis* con el plásmido pLJR962, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo ($P=0.166$), **(C)** Gen *MSMEG_0250*, muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo, cuando el gen está silenciado y sin silenciar ($P=0.000$), **(D)** Gen *MSMEG_3815*, no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo ($P=0.745$), **(E)** Gen *MSMEG_5046* (ARNg 1), no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo ($P=0.083$), **(F)** Gen *MSMEG_5046* (ARNg 2), no muestra diferencia

significativa en la velocidad de eflujo ($P=0.324$), **(G)** Gen *MSMEG_0241*, no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo ($P=0.082$), **(H)** Gen *MSMEG_0410* (ARNg1), no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo ($P=0.733$) e **(I)** Gen *MSMEG_0410* (ARNg2), no muestra diferencia significativa en la velocidad de eflujo ($P=0.222$).

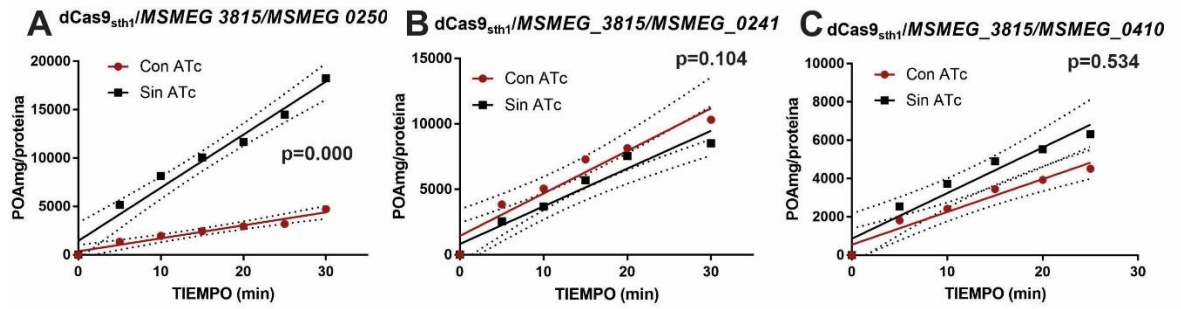


Figura 24: Medición de la velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* cuando dos genes están silenciados al mismo tiempo con el sistema CRISPRi, inducido con ATc y sin silenciar, sin ATc. **(A)** Genes *MSMEG_3815/MSMEG_0250*, se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo ($P=0.000$), **(B)** Genes *MSMEG_3815/MSMEG_0410*, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo ($P=0.109$), **(C)** Genes *MSMEG_3815/MSMEG_0241*, no se observa cambio significativo en la velocidad de eflujo ($P=0.534$).

IX. DISCUSIÓN

La cinética del POA en el modelo de *M. smegmatis*, cuando los genes que codifican a las bombas de eflujo, homólogos en MTB, están silenciados por CRISPRi demuestra que el gen *MSMEG_0250* reduce la velocidad del eflujo del POA ($p < 0.001$), sugiriendo que este podría estar implicado en el transporte del POA en la micobacteria.

Así mismo, se repite la disminución de la velocidad del eflujo del POA cuando se silencia los genes *MSMEG_0250* y *MSMEG_3815* simultáneamente por CRISPRi ($p < 0.001$). Sin embargo, cuando el gen *MSMEG_3815* es silenciado individualmente no se observa cambio en la velocidad del eflujo ($p > 0.001$), lo que sugiere que solamente el gen *MSMEG_0250* está involucrado en la liberación de POA.

Las bombas de eflujo son las encargadas de generar la expulsión del POA en el medio extracelular de la bacteria para su acidificación (9,12,13). Resultados preliminares de estudios en el laboratorio de bioinformática y biología molecular del LID-UPCH sobre la velocidad del eflujo del POA con genes *knock-out* por recombinación homóloga indican que más de una bomba de eflujo podrían estar involucradas en el transporte del POA, ya que solo se visualizó reducción o aumento de la velocidad del eflujo, más no reducción total del POA (datos no publicados). Ante la posibilidad de que las bombas de eflujo *MSMEG_3815*, *MSMEG_5046*, *MSMEG_0241* y *MSMEG_0410* no puedan liberar POA por sí mismas, pero sí de manera cooperativa, se evaluó las combinaciones *MSMEG_3815/MSMEG_0250*, *MSMEG_3815/MSMEG_0241* y *MSMEG_3815/MSMEG_0410*.

El gen *MSMEG_0250*, que codifica a la proteína MmpL3, es un gen esencial en condiciones *in vitro* en micobacterias y transportador del ácido micólico en forma de *trehalose monomycolates* (TMM) desde el citoplasma a la pared celular (116–118); además, es un complejo unido a la proteína TtfA y al gen *MSMEG_5308*, el complejo Mmpl3/TtfA se encargan exclusivamente del transporte del TMM; en cambio el gen *MSMEG_5308*, ante el agotamiento del Mmpl3, se acumula la proteína estabilizando al complejo Mmpl3/TtfA y así preservan el transporte del TMM y la biosíntesis de la pared celular (119).

En la evaluación fenotípica del efecto del silenciamiento del gen *MSMEG_0250* se observa que el crecimiento bacteriano disminuye en el medio agar 7H10; caso contrario en caldo 7H9, en el que las micobacterias crecen tanto en las cepas con los genes diana silenciados como en aquellas con los genes diana no silenciados, por lo que se considera que la expresión del gen *MSEMG_0250* no se silencia totalmente o que podría estar siendo compensado por otros genes.

El medio líquido 7H9 permite crecer más rápido a las micobacterias a comparación del medio sólido 7H10 (120). En la cuantificación relativa de los transcritos (ARNm) del gen *MSMEG_0250*, la disminución de los niveles de expresión de los genes es parcial con un Cq no mayor a 30, lo que sugeriría que la represión del gen *MSMEG_0250* no es suficiente para disminuir el crecimiento bacteriano a pesar de que es un gen altamente vulnerable (29,121–123).

La vulnerabilidad de un gen se mide en los genes esenciales, un gen altamente vulnerable afecta el fitness de la bacteria, como el crecimiento, en cambio se observa lo contrario en un gen con baja vulnerabilidad (123). El gen *MSMEG_0250*, además de ser reportado como un gen esencial, se ha comprobado que tanto el gen

como su homólogo *Rv0206c* en MTB tienen alta vulnerabilidad, y afecta el crecimiento bacteriano (123,124).

En cada experimento antes de extraer el ARN total y medir la velocidad del eflujo del POA se cuantificaron las bacterias por densidad óptica (OD600nm) tanto en las micobacterias con expresión de genes diana silenciadas y en aquellas con los genes sin silenciar. Se verificó que ambos cultivos tuvieran el mismo OD600nm en no más de 24 horas como sugiere el protocolo estandarizado de CRISPRi para micobacterias (108).

A pesar de que el sistema CRISPRi es muy eficiente, existe la probabilidad de encontrar mutaciones inesperadas en el sistema, principalmente en el ARNg o en la secuencia PAM del gen diana (94,125–127). Entonces la no disminución del número de las bacterias en medio 7H9 se podría explicar por la presencia de mutaciones inesperadas en el sistema CRISPRi, por alta concentración de ATc, disminuyendo el *fold* de represión del gen *MSMEG_0250*. Por lo que algunas bacterias tendrían el sistema CRISPRi inactivo, y otras bacterias tendrían el sistema CRISPRi activo, suficientes para observar el efecto del silenciamiento del gen *MSMEG_0250* y en consecuencia la disminución de la velocidad del eflujo del POA.

La ATc es un derivado de tetraciclina, un eficiente inductor del promotor del gen *tetR*, codificante del represor TetR que no afecta al crecimiento bacteriano del *Mycobacterium* (29,97,98). Las concentraciones recomendadas para trabajar la ATc como inductor para el TetR en las micobacterias es a partir de 50 a 100 ng/mL, cuando se trabaja con concentraciones mayores de 250 o 500 ng/mL, el inductor

reduce su actividad sobre el promotor de *tetR*, disminuyendo el *fold* de represión de los genes silenciados (29,97,98).

Así mismo, estudios previos han observado la disminución de la hidrofobicidad de la pared celular de la micobacteria en cepas con mutaciones en el gen *MSMEG_0250* que codifica a la bomba de eflujo (118,128). Entonces, la disminución del POA en el medio extracelular no necesariamente estaría relacionado con el silenciamiento del gen, sino que al reducir la expresión del gen *MSMEG_0250* podría decrecer la hidrofobicidad de la pared celular, dificultando el transporte del POA a través de ella (129).

La velocidad del eflujo del POA en las cepas con los genes *MSMEG_3815*, *MSMEG_5046*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_0410* y controles (cepa de *M. smegmatis* sin plásmido de CRISPRi y cepa de *M. smegmatis* con el plásmido pLJR962 de CRISPRi sin un ARNg) silenciados disminuyó o aumentó ligeramente a comparación de cuando no están silenciados, lo que podría sugerir toxicidad del inductor ATc. Sin embargo, se controló el crecimiento bacteriano a través del OD600nm y no se observó variación entre las micobacterias con genes silenciados y sin silenciar en medios de cultivo 7H9. Lo que reafirma lo reportado previamente, que el ATc no es tóxico para las micobacterias y la variación de la velocidad del eflujo del POA es causada por otros agentes, como la manipulación de los cultivos o variaciones o adaptaciones fenotípicas, ajenas a la técnica de la medición de la velocidad del eflujo, ya que tiene una sensibilidad de 80% y especificidad de 100% (15,97,104).

A pesar de que el silenciamiento de los genes *MSMEG_0410* y *MSMEG_5046* se realizó con dos ARNg diferentes, diferentes secuencias PAM, y se obtuvo distintos

*fold*s de represión, los resultados de la medición de la velocidad del eflujo del POA no variaron ($p > 0.001$). Lo que reconfirma fuertemente que ninguno de estos genes está implicado en el transporte del POA.

En los genes *MSMEG_3496*, *MSMEG_1258*, *MSMEG_5782* y *MSMEG_6554*, no se observó una alta represión de la expresión genética a pesar de que el sistema CRISPRi estaba activo y se usó la misma cepa de referencia, *M. smegmatis* mc² 155. La eficiencia de sistema CRISPRi depende de varios factores como la selección de los ARNg para cada gen diana, tamaño y composición de nucleótidos del ARNg, el inicio del ARNg en A o G, contenido de GC en los *motifs* y estructuras secundarias (90). Además, el sistema CRISPRi con dCas9_{sth1} ha sido ampliamente estandarizado para micobacterias demostrando un alto porcentaje de *fold* de represión genética a comparación de otros sistemas dCas9 (29,94). Por lo que no se descarta al sistema CRISPRi como una gran herramienta para el estudio de la resistencia a fármacos; no obstante, se debería evaluar nuevos ARNg para estas secuencias dianas que no tuvieron alto *fold* de represión.

A través del uso del sistema CRISPRi dCas9_{sth1} se ha silenciado el gen homólogo del gen *MSMEG_0250* en MTB, *Rv0206c*, también codificante de una bomba de eflujo, y se ha validado que el gen es un blanco de unión para drogas contra TB y el sistema puede ser usado para descubrir drogas antituberculosas (124,130,131).

A pesar de que existen otros sistemas para silenciar, deletar genes de micobacterias y evaluar su efecto en la velocidad del eflujo del POA, tales como *knock-out* por recombinación homóloga que ha sido previamente estandarizado en nuestro grupo de trabajo. Estos sistemas no pueden ser empleados para evaluar el efecto del silenciamiento del gen *MSMEG_0250*, por ser un gen esencial, por lo

tanto la importancia de usar el sistema CRISPRi porque regula la expresión genética de un gen (95,106,130).

Así mismo, se ha intentado usar el sistema CRISPR Cas9 para silenciar, deletar genes en micobacterias. El sistema de CRISPRi, a través del uso de un plásmido que permite la expresión de un TetR, se ha estandarizado con éxito empleando ATc para inducir el silenciamiento de genes, usando la ventaja de que las micobacterias no muestran resistencia natural a la ATc como sí a otras moléculas (29,94,98,132). Además de que el sistema CRISPRi estandarizado por Rock *et al.* 2017, es de fácil y rápida manipulación, gracias a la tabla de secuencias PAM con diferentes *fold*s de represión es más sencillo diseñar un ARNg para una secuencia de interés (29).

Una gran desventaja del sistema de CRISPRi, es que al inhibir la expresión de un gen esencial puede afectar la expresión de más genes (132). Además de que tiene un efecto polar, lo que significa que puede inhibir la expresión de otros genes dentro de un mismo operón, que se encuentren en la región 5' del gen de interés y en menor porcentaje a genes que se encuentren cerca de la región 3' (29,94,95). Sin embargo, recientes estudios afirman que el gen *MSMEG_0250* no forma parte de un operón con otros genes, lo que sugiere que el efecto del silenciamiento en la velocidad del eflujo del POA es netamente a causa del gen *MSMEG_0250* (123).

El efecto del silenciamiento del gen *MSMEG_0250* sobre la velocidad del eflujo del POA, se podría comprobar a través de una secuenciación del transcriptoma (RNA-seq) por Illumina, a partir del ARN total de las micobacterias con los genes silenciados con el sistema CRISPRi. Se corroboraría que el silenciamiento de la expresión del gen *MSMEG_0250* no afecta la expresión de otros genes (133–135). Así mismo se podría comprobar la vulnerabilidad del gen a través de un *knock-out*

por recombinación homóloga, en el que se esperaría que la cepa con el gen *MSMEG_0250* KO no crezca por ser un gen esencial altamente vulnerable; en caso de que se observe lo contrario, también se podría realizar una secuenciación del transcriptoma para reconocer el gen que compensa al *MSMEG_0250* (106,123).

En conclusión, el gen *MSMEG_0250*, podría estar implicado en el transporte del POA en *M. smegmatis*. Se tiene que confirmar por otras metodologías que solamente el gen *MSMEG_0250* es el responsable de la disminución de la velocidad del eflujo del POA, y no otros genes, o que la reducción del eflujo del POA no es consecuencia del silenciamiento del gen por ser esencial.

X. CONCLUSIONES

- El silenciamiento del gen *MSMEG_0250* reduce la velocidad del eflujo del POA en *M. smegmatis* por lo que podría estar relacionado con la resistencia a PZA.
- El silenciamiento de los genes *MSMEG_3815*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* y *MSMEG_0410*, de manera individual o conjunta no reducen la velocidad de eflujo del POA en *M. smegmatis*.
- El uso de dos ARNg diferentes en los genes *MSMEG_0410* y *MSMEG_5046* no varía los resultados de la velocidad de eflujo del POA en *M. smegmatis*.

XI. DIRECCIONES A FUTURO

- Silenciar los demás genes dentro del marco de lectura del promotor de los genes que no se lograron silenciar, *MSMEG_3496*, *MSMEG_1258*, *MSMEG_5782* y *MSMEG_6554*.
- Evaluar el gen homólogo del gen *MSMEG_0250* en *Mycobacterium tuberculosis*.
- Secuenciar el transcriptoma de las micobacterias con el gen *MSMEG_0250* silenciado por CRISPRi.
- Evaluar la velocidad del eflujo del POA cuando el gen *MSMEG_0250* esté inactivado/delecionado por recombinación homóloga (*knock-out*)

XII. LIMITANTES

- La principal limitante del sistema CRISPRi es que no se puede silenciar por completo la expresión de un gen.
- El CRISPRi al reprimir la expresión genética por tipo *knock down* inducido por ATc, tiene un límite de silenciamiento de aproximadamente 24 horas en el modelo de *M. smegmatis*.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. *World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. 2020.*
2. *World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. 2019.*
3. *Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. Clinical and Developmental Immunology. 2011;2011:17.*
4. *Goodman J. Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells . These include : Mycobacterium tuberculosis Invades and Replicates within Type II Alveolar Cells. 1996;64(4):1400–6.*
5. *World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines. 4Th Edition. 2010;160.*
6. *World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018. 2018.*
7. *World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. 2016;*
8. *Vásquez-Campos L, Asencios-Solis L, Leo-Hurtado E, Quispe-Torres N, Salazar-Lindo E, Bayona J, et al. Drug resistance trends among previously treated tuberculosis patients in a national registry in Peru, 1994-2001. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2004;8(4):465–72.*
9. *Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2003;7(1):6–21.*
10. *Suzuki Y, Suzuki A, Tamaru A, Katsukawa C, Oda H. Rapid Detection of Pyrazinamide-Resistant. Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(2):501–*

- 7.
11. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA, Talbot EAS, George JW, Kreuzer KN. Identification, cloning and expression of the *Escherichia coli* pyrazinamidase and nicotinamidase gene, *pnc A*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996;40(6):1426–31.
 12. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2014;2(4):1–12.
 13. Stehr M, Elamin AA, Singh M. Pyrazinamide: The importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2015;13(5):593–603.
 14. Cole ST. Pyrazinamide—Old TB Drug Finds New Target. *Science*. 2011;333(September):1583–4.
 15. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2009;89(2):109–13.
 16. Mestdagh M, Realini L, Fonteyne P-A, Rossau R, Jannes G, Mijs W, et al. Correlation of *pncA* Sequence with Pyrazinamide Resistance Level in BACTEC™ for 21 *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Microb Drug Resist*. 2000;6(4):283–7.
 17. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal structure of the pyrazinamidase of *mycobacterium tuberculosis*: Insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS ONE*.

2011;6(1).

18. Yang J, Liu Y, Bi J, Cai Q, Liao X, Li W, et al. Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of *Mycobacterium tuberculosis* by pyrazinamide. Vol. 95, *Molecular Microbiology*. 2015. 791–803 p.
19. Kanji A, Hasan R, Hasan Z. Efflux pump as alternate mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Elsevier science*. 2018;66(1):20–5.
20. Te Brake LHM, de Knecht GJ, de Steenwinkel JE, van Dam TJP, Burger DM, Russel FGM, et al. The Role of Efflux Pumps in Tuberculosis Treatment and Their Promise as a Target in Drug Development: Unraveling the Black Box. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2018;58(1).
21. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;453(2):254–67.
22. Du D, van Veen HW, Murakami S, Pos KM, Luisi BF. Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Current Opinion in Structural Biology*. 2015;33(Figure 1):76–91.
23. Rahman T, Yarnall B, Doyle DA. Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. *European Biophysics Journal*. 2017;46(7):647–53.
24. Li X, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

2004;48(7):2415–23.

25. Li G, Zhang J, Guo Q, Jiang Y, Wei J, Zhao LL, et al. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS ONE*. 2015;10(2):1–12.
26. Guo M, Sun Z, Zhang Y. *Mycobacterium smegmatis* has two pyrazinamidase enzymes, PncA and PzaA. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(13):3881–4.
27. Zimic M, Fuentes P, Gilman RH, Gutiérrez AH, Kirwan D, Sheen P. Pyrazinoic acid efflux rate in *Mycobacterium tuberculosis* is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*. 2012;92(1):84–91.
28. Hawkins JS, Wong S, Peters JM, Almeida R, Qi LS. Targeted Transcriptional Repression in Bacteria Using CRISPR Interference (CRISPRi). *Methods Mol Biol*. 2015;9:1–366.
29. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nature Microbiology*. 2017;2(February):1–9.
30. Palomino JC, Cardoso Leao S. *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. 2007;(c):2–6.
31. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2013;49(3):423–39.
32. Centers for Disease Control and Prevention. *Transmission and pathogenesis*

- of tuberculosis. Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. 2016;1(2):167–74.*
33. *Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, et al. Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. PLoS Pathogens. 2008;4(9).*
 34. *Bañuls AL, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: Ecology and evolution of a human bacterium. Journal of Medical Microbiology. 2015;64(11):1261–9.*
 35. *Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall : Structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiology Letters. 1994;123:11–8.*
 36. *Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annual Review of Biochemistry. 1995;*
 37. *Hett EC, Rubin EJ. Bacterial Growth and Cell Division : a Mycobacterial Perspective. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008;72(1):126–56.*
 38. *Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. Nature Reviews Microbiology. 2014;12 (8):550–62.*
 39. *Grzegorzewicz AE, Auria CDS, Mcneil MR, Huc-claustre E, Jones V, Petit C, et al. Assembling of the Mycobacterium tuberculosis Cell Wall. The Journal of Biological Chemistry. 2016;291(36):18867–79.*
 40. *Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular Biology of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Curr Top Microbiol Immunol. 2014;374:53–*

80.

41. Chan ED, Iseman MD. Current medical treatment for tuberculosis. *British Medical Journal*. 2002;325(7375):1282–6.
42. Norton BL, Holland DP. Current management options for latent tuberculosis: a review. *Infection and Drug Resistance*. 2012;163.
43. Holland DP, Sanders GD, Hamilton CD, Stout JE. Strategies for treating latent multiple-drug resistant tuberculosis: A decision analysis. *PLoS ONE*. 2012;7(1).
44. Momekov G, Ferdinandov D, Voynikov Y, Stavrakov G, Peykov P. Pyrazinamide - Pharmaceutical, biochemical and pharmacological properties and reappraisal of its role in the chemotherapy of tuberculosis. *Pharmacia*. 2014;61(1):38–67.
45. Tan Y, Hu Z, Zhang T, Cai X, Kuang H, Liu Y, et al. Role of *pncA* and *rpsA* gene sequencing in detection of pyrazinamide resistance in mycobacterium tuberculosis isolates from southern China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(1):291–7.
46. Shi W, Chen J, Feng J, Cui P, Zhang S, Weng X, et al. Aspartate decarboxylase (*PanD*) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging microbes & infections*. 2014;3(8):e58.
47. Sun Q, Li X, Perez LM, Shi W, Zhang Y, Sacchettini JC. The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* *PanD*. *Nature Communications*. 2020;1–7.

48. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. *Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2011;333(6049):1630–2.
49. Shi W, Cui P, Niu H, Zhang S, Tonjum T, Bingdong Z, et al. *Introducing RpsA Point Mutations Δ 438A and D123A into the Chromosome of Mycobacterium tuberculosis Confirms Their Role in Causing Resistance to Pyrazinamide*. 2019;(March):1–6.
50. Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. *Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA*. *Scientific Reports*. 2017;1–8.
51. Andersson DI. *The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Current Opinion in Microbiology*. 2006;9(5):461–5.
52. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Roman P, Gutierrez AH, et al. *Role of metal ions on the activity of Mycobacterium tuberculosis pyrazinamidase*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;87(1):153–61.
53. Yoon J-H, Nam J-S, Kim K-J, Ro Y-T. *Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Korea and analysis of the correlation between the mutations and pyrazinamidase activity*. *World J Microbiology Biotechnology*. 2014;2821–8.
54. Sheen P, Monsalve A, Campos J, Huerta R, Antiparra R, Arteaga H, et al. *Metallochaperones are needed for Mycobacterium tuberculosis and Escherichia coli nicotinamidase-pyrazinamidase Activity*. 2020;202(2):1–

- 16.
55. Khan MT, Khan A, Rehman AU, Wang Y, Akhtar K. *Structural and free energy landscape of novel mutations in ribosomal protein S1 (rpsA) associated with pyrazinamide resistance. Scientific Reports. 2019;(November 2018):1–12.*
56. Gopal P, Nartey W, Ragunathan P, Sarathy J, Kaya F, Yee M, et al. *Pyrazinoic Acid Inhibits Mycobacterial Coenzyme A Biosynthesis by Binding to Aspartate Decarboxylase PanD. ACS Infectious Diseases. 2017;3(11):807–19.*
57. Njire M, Tan Y, Mugweru J, Wang C, Guo J, Yew W, et al. *Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis : Review and update. Advances in Medical Sciences. 2015;1–9.*
58. Gopal P, Sarathy JP, Yee M, Ragunathan P, Shin J, Bhushan S, et al. *Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. Nature Communications. 2020;11(1):1–10.*
59. Gopal P, Tasneen R, Yee M, Lanoix J-P, Sarathy J, Rasic G, et al. *In Vivo-Selected Pyrazinoic Acid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Harbor Missense Mutations in the Aspartate Decarboxylase PanD and the Unfoldase ClpC1. ACS Infectious Diseases. 2017;*
60. Kar NP, Sikriwal D, Rath P, Choudhary RK, Batra JK. *Mycobacterium tuberculosis ClpC1: Characterization and role of the N-terminal domain in its function. FEBS Journal. 2008;275(24):6149–58.*

61. Zhang S, Chen J, Shi W, Cui P, Zhang J, Cho S, et al. Mutation in *clpC1* encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*. 2017;6(2):e8.
62. Lee H, Suh J-W. Anti-tuberculosis lead molecules from natural products targeting *Mycobacterium tuberculosis* ClpC1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2015;
63. Yee M, Gopal P, Dick T. Missense mutations in the unfoldase ClpC1 of the caseinolytic protease complex are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(2):1–6.
64. Li X-Z, Nikaido H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update Xian-Zhi. Vol. 69, *Drugs*. 2009. 1555–1623 p.
65. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, Veen HW va., Pos KM, Piddock LJ V., et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(9):523–39.
66. Liu J, Shi W, Zhang S, Hao X, Maslov DA, Weeks JW. Mutations in Efflux Pump Rv1258c (Tap) Cause Resistance to Pyrazinamide , Isoniazid , and Streptomycin in *M . tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:1–7.
67. Szumowski JD, Adams KN, Edelstein PH, Ramakrishnan L. Antimicrobial efflux pumps and *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance: Evolutionary Considerations. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;6(4):23–7.

68. Marquez B. *Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie.* 2005;87:1137–47.
69. da Silva PEA, Groll A Von, Martin A, Palomino JC. *Efflux as a mechanism for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. IMMUNOLOGY & MEDICAL MICROBIOLOGY.* 2011;1–9.
70. Zhang Y, Zhang J, Cui P, Zhang Y, Zhang W. *Identification of novel efflux proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c involved in pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2017;61(8).
71. AlMatar M, Var I, Kayar B, Köksal F. *Differential Expression of Resistant and Efflux Pump Genes in MDR-TB Isolates. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets.* 2019;20(2):271–87.
72. Kardan-Yamchi J, Kazemian H, Haeili M, Harati AA, Amini S, Feizabadi MM. *Expression analysis of 10 efflux pump genes in multidrug-resistant and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2019;17:201–8.
73. Narang A, Garima K, Porwal S, Bhandekar A, Shrivastava K, Giri A, et al. *Potential impact of efflux pump genes in mediating rifampicin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from India. PLoS ONE.* 2019;14(9):1–14.
74. Narang A, Giri A, Gupta S, Garima K, Bose M, Varma-Basil M. *Contribution of Putative Efflux Pump Genes to Isoniazid Resistance in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. The International Journal of*

- Mycobacteriology*. 2017;6(3):239–45.
75. Sharma S, Sheoran A, Gupta KB, Yadav A, Varma-Basil M, Sreenivas V, et al. Quantitative detection of a cocktail of mycobacterial MPT64 and PstS1 in tuberculosis patients by real-time immuno-PCR. *Future Microbiology*. 2019;14(3):223–34.
 76. Tullius M V., Harmston CA, Owens CP, Chim N, Morse RP, McMath LM, et al. Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5051–6.
 77. Liu J, Shi W, Zhang S, Cassell G, Maslov D, Shur K, et al. Mutations in efflux pump Rv1258c (Tap) cause resistance to pyrazinamide and other drugs in *M. tuberculosis*. *bioRxiv*. 2018;
 78. Bolla JR. Targeting MmpL3 for anti-tuberculosis drug development. *Biochemical Society Transactions*. 2020;48(4):1463–72.
 79. Zhang B, Li J, Yang X, Wu L, Zhang J, Yang Y, et al. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell*. 2019;176(3):636-648.e13.
 80. Reytrat JM, Kahn D. *Mycobacterium smegmatis*: An absurd model for tuberculosis? *Trends in Microbiology*. 2001;9(10):472–3.
 81. Long Q, Zhou Q, Ji L, Wu J, Wang W, Xie J. *Mycobacterium smegmatis* genomic characteristics associated with its saprophyte lifestyle. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113(10):3051–5.

82. Shiloh MU, Champion PAD. *To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about Mycobacterium tuberculosis pathogenesis? Current Opinion in Microbiology.* 2010;13(1):86–92.
83. Tyagi JS, Sharma D. *Mycobacterium smegmatis and tuberculosis. Trends in Microbiology.* 2002;10(2):68–9.
84. Malhotra S, Vedithi SC, Blundell TL. *Decoding the similarities and differences among mycobacterial species. PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2017;11(8):1–18.
85. Yamada H, Yamaguchi M, Igarashi Y, Chikamatsu K, Aono A, Murase Y, et al. *Mycobacterium smegmatis, Basonym Mycobacterium smegmatis, Expresses Morphological Phenotypes Much More Similar to Escherichia coli Than Mycobacterium tuberculosis in Quantitative Structome Analysis and CryoTEM Examination. Frontiers in Microbiology.* 2018;9(SEP).
86. Oost J Van Der, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJJ. *CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes.* 2009;(July):401–7.
87. Doudna JA, Charpentier E. *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science.* 2014;346(6213):1258096–1258096.
88. Jiang F, Doudna JA. *CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms.* 2017;505–31.
89. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology.* 2011;9(6):467–77.

90. Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2180–96.
91. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–21.
92. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*. 2013;31(3):233–9.
93. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. 2013;31(3):227–9.
94. Choudhary E, Thakur P, Pareek M, Agarwal N. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nature Communications*. 2015;6:1–11.
95. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*. 2013;152(5):1173–83.
96. Addgene: Qi Lab CRISPR Page [Internet]. [cited 2020 Apr 11]. Available from: <https://www.addgene.org/crispr/qi/>
97. Ehrt S, Guo X V, Hickey CM, Ryou M, Monteleone M, Riley LW, et al. Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. 2005;33(2):1–11.

98. Gossen M, Bujard H. Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Research*. 1993;21(18):4411–2.
99. Evans JC, Mizrahi V. The application of tetracyclineregulated gene expression systems in the validation of novel drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(AUG).
100. Carroll P, Niranjala Muttucumaru DG, Parish T. Use of a tetracycline-inducible system for conditional expression in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(6):3077–84.
101. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. 2019.
102. Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniewski F, Rodionova Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide Resistance Determinants : a multicenter study. *mBio*. 2014;5(5):1–10.
103. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine*. 1996;2:662–7.
104. Zimic M, Loli S, Gilman RH. A New Approach for Pyrazinamide Susceptibility Testing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Drug Resistance*. 2012;18(4):372–5.
105. Boshoff HIM, Mizrahi V. Expression of *Mycobacterium smegmatis*

- pyrazinamidase in mycobacterium tuberculosis confers hypersensitivity to pyrazinamide and related amides. Journal of Bacteriology. 2000;182(19):5479–85.*
106. Flores Tumba JA. *Knock-out del gen MSMEG5046 en Mycobacterium smegmatis, un homólogo de la bomba de eflujo putativa Rv1250 de Mycobacterium tuberculosis y su efecto en la susceptibilidad a drogas antituberculosas. Repositorio Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2015.*
107. Cauna Orocollo Y. *Estandarización de una técnica de complementación del gen pncA en Mycobacterium tuberculosis pncA-knockout: herramienta para el estudio de la relación entre mutaciones en pncA y parámetros fenotípicos. Repositorio Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2019.*
108. Wong AI, Rock JM. *CRISPR Interference (CRISPRi) for Targeted Gene Silencing Gene silencing in Mycobacteria. In: Parish T, Kumar A, editors. Mycobacteria Protocols. New York, NY: Springer US; 2021. p. 343–64.*
109. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods. 2001;25(4):402–8.*
110. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. *A One Pot , One Step , Precision Cloning Method with High Throughput Capability. PLoS ONE. 2008;3(11).*
111. Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. *Golden Gate Shuffling : A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes.*

PLoS ONE. 2009;4(5).

112. Meinen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, et al. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*. 2016;99:41–6.
113. Wayne LG. Simple Pyrazinamidase and Urease Tests for Routine Identification of Mycobacteria. *American Review of Respiratory disease*. 1974;109:147–51.
114. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;254:248–54.
115. Altschup SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;403–10.
116. Xu Z, Meshcheryakov VA, Poce G, Chng S. MmpL3 is the flippase for mycolic acids in mycobacteria. 2017;114(30).
117. Varela C, Rittmann D, Singh A, Krumbach K, Bhatt K, Eggeling L, et al. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in Mycobacteria and Corynebacteria. *Chemistry & Biology*. 2012;19(4):498–506.
118. Li W, Yazidi A, Pandya AN, Hegde P, Tong W, Calado V, et al. MmpL3 as a target for the treatment of drug-resistant nontuberculous mycobacterial infections. 2018;9(July):1–9.
119. Fay A, Czudnochowski N, Rock JM, Johnson JR, Krogan NJ, Rosenberg O, et al. Two accessory proteins govern MmpL3 mycolic acid transport in

- mycobacteria*. 2019;(April):1–17.
120. Moore DAJ, Evans CAW, Ph D, Gilman RH, Sc B, Coronel J, et al. *Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB*. 2007;355(15):1539–50.
121. Meijers AS, Troost R, Ummels R, Maaskant J, Speer A, Nejentsev S, et al. *Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using Streptococcus thermophilus CRISPR1-Cas9*. *Tuberculosis*. 2020;124(August):101983.
122. Houdebine LM. *Design of Vectors for Optimizing Transgene Expression*. *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook: Third Edition*. Elsevier Inc.; 2014. 489–511 p.
123. Bosch B, DeJesus MA, Poulton NC, Zhang W, Engelhart CA, Zaveri A, et al. *Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of M. tuberculosis*. *Cell*. 2021;184(17):4579-4592.e24.
124. Degiacomi G, Benjak A, Madacki J, Boldrin F, Provvedi R, Palù G, et al. *Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing on Mycobacterium tuberculosis gene expression*. *Scientific Reports*. 2017;7(December 2016):1–8.
125. Künne T, Zhu Y, da Silva F, Konstantinides N, McKenzie RE, Jackson RN, et al. *Role of nucleotide identity in effective CRISPR target escape mutations*. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(19):10395–404.
126. Chabas H, Nicot A, Meaden S, Westra ER, Tremblay DM, Pradier L, et al. *Variability in the durability of CRISPR-Cas immunity*. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2019;374(1772):1–7.
127. Hossain AA, McGinn J, Meeske AJ, Modell JW, Marraffini LA. Viral recombination systems limit CRISPR-Cas targeting through the generation of escape mutations. *Cell Host & Microbe [Internet]*. 2021;1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.09.001>
128. Mcneil MB, Dennison D, Parish T. Mutations in *MmpL3* alter membrane potential, hydrophobicity and antibiotic susceptibility in *Mycobacterium smegmatis*. 2017;1065–70.
129. Cynamon MH, Klemens SP, Chou T, Gimi RH, Welch JT. Antimycobacterial Activity of a Series of Pyrazinoic Acid Esters. 1992;1212–5.
130. Mcneil MB, Cook GM. Utilization of CRISPR Interference To Validate *MmpL3* as a Drug Target in *Mycobacterium tuberculosis*. 2019;(May):1–7.
131. Rock J. Tuberculosis drug discovery in the CRISPR era. *PLoS Pathogens*. 2019;15(9):1–10.
132. Singh AK, Carette X, Potluri L, Sharp JD, Xu R, Prisic S, et al. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system. 2016;44(18).
133. Podnar J, Deiderick H, Huerta G, Hunicke-Smith S. Next-generation sequencing RNA-Seq library construction. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2014;(SUPL.106):1–19.
134. Rodríguez-garcía A, Sola-landa A, Barreiro C. RNA-Seq-Based

Comparative Transcriptomics: RNA Preparation and Bioinformatics.
Microbial Steroids: Methods and Protocols. 1645(2):59–72.

135. *illumina. TruSeq Stranded mRNA. TruSeq Stranded mRNA Reference Guide.*
2017;13(3):258–62.

ANEXOS

Anexo 1: Preparación de células competentes de *E. coli*.

- Sembrar por agotamiento 1 colonia de la cepa deseada de una placa con LB-agar sin antibiótico.
- Pasar una colonia a 2ml de medio LB e incubar a 37°C con agitación durante toda la noche.
- Tomar 1ml del cultivo e inocular 50ml de medio LB sin antibiótico en un flask de 250ml e incubar a 37°C con agitación hasta OD_{600nm}: 0.35 a 0.45 OD (aprox. En 2 horas).
- Pasar el contenido a tubos de 50ml enfriados previamente e incubar en hielo por 10min. Centrifugar el cultivo a 4000rpm y 4°C por 10min.
- Descartar el sobrenadante y secar bien el pellet. Agregar 20ml de 0.1M CaCl₂ frío y homogenizar. Incubar 15 min en hielo y centrifugar a 3000 rpm y 4°C durante 10 min.
- Resuspender el pellet con 1ml de 0.1 M CaCl₂, 15% glicerol frío y homogenizar.
- Preparar alícuotas de fracciones de 50µl en tubos eppendorf en gradillas con alcohol previamente congelados a -70°C y Guardar a -70°C.

Anexo 2: Transformación de *E. coli* con plásmidos.

- Añadir a un tubo de células competente plásmido pET28a (5 µl).
- Incubar en hielo por 30 minutos.

- Colocar los tubos en un baño María a 42°C por 1 minuto. Retirarlo y dejarlo en hielo por 2 min. Inmediatamente agregar 1000 µl de medio SOC o caldo LB estéril e incubar a 37°C por 1 hora en agitación.
- Centrifugar los tubos a 6,000 rpm por 5 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 100 µl de caldo SOC y Sembrar en placas con agar LB + kanamicina (20 µg/ml) con un asa de Driglasky (usar etanol para desinfectar el sembrador) e incubar entre 16 - 18 horas a 37°C.

Anexo 3: Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*.

- Inocular una colonia de *M. smegmatis* en 10ml de caldo 7H9 - tween 80 (0.05% v/v) suplementado con 5% OADC (7H9 – T) e incubar a 37°C a 300rpm durante 3 a 5 días.
- Transferir 1 ml del cultivo a 100 ml de caldo 7H9 - T (Dilución 1/100) y continuar la incubación a 37°C en agitación constante hasta que el cultivo llegue a un OD600 = 0.5 – 0.8.
- Centrifugar el cultivo a 8000 rpm durante 10 min a 4°C para concentrar las células.
- Resuspender y lavar el pellet 3 veces en glicerol al 10% - tween80 frio, primer lavado con 20ml, segundo con 10ml y el tercero con 5ml.
- Resuspender en 10 ml de glicerol al 10% - tween 80 y preparar alícuotas de 400µl y almacenar las células -70°C.

Anexo 4: Transformación de *M. smegmatis* por electroporación con plásmidos.

- Agregar 5 µl de ADN plasmídico (1µg/µl) a 400µl de células electrocompetentes de *M. smegmatis* e incubar durante 10 minutos en hielo.

- Transferir la suspensión a una cubeta de electroporación de 2 mm (BTX) previamente enfriada en hielo.
- Colocar la cubeta en el electroporador (ECM 630, BTX) bajo las siguientes condiciones: Voltaje de 2.5V, capacitancia de 25 μ F y resistencia de 1000 Ω .
- Transferir la suspensión a tubos de vidrio que contengan 3 ml de caldo 7H9-T e incubar por 3 horas a 37°C en agitación.
- Posterior a las 3 horas, tomar 100 μ l del cultivo incubado y sembrar en agar 7H10 con sus antibióticos respectivos empleando un asa de Drigalsky. Las placas serán incubadas a 37°C hasta que las colonias se hagan visible (3 – 5 días).

Anexo 5: Extracción de ARN

En cabina de cultivo

- Cultivar 10ml de *M. smegmatis* hasta un OD > 1.2.
- Centrifugar en un falcon libre de RNAsa a 3000g por 20 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con buffer TE pH 8 (Preparado con agua DEPC) y centrifugar a 3000g por 20 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de trizol al pellet y homogenizar bien y traspasar todo a un tubo de 1.5ml con 500 μ l de beads de 0.1mm.
- Romper las células en el Fastprep-24 a 6.5m/s durante 30 segundos, dos veces con un descanso de 3 minutos en hielo.
- Centrifugar las células a 12000 g por 15 min a 4°C

En cabina de ARN

- Traspasar el sobrenadante a un nuevo tubo con cuidado de no sacar beads. (Usar tips de 200µl). Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 200µl de cloroformo. Agitar vigorosamente por 15 segundos e incubar por 5 minutos en hielo. Centrifugar las células a 12000 g 15 min 4°C.
- Traspasar sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5ml, sin tocar la fase blanca (ADN). Añadir un volumen igual de etanol absoluto frío y mezclar suavemente 4 veces por inversión.
- Añadir 350µl aproximadamente de la mezcla a la columna de purificación Direct-zol™ Zymo Research, incubar por 10 minutos en hielo y centrifugar a 16000g durante 1 minuto a temperatura ambiente en la microcentrifuga.
- Descartar sobrenadante de tubo colector
- Añadir el restante de lisado a columna de purificación y centrifugar a 16000g durante 30 segundos en la microcentrifuga.
- Añadir 400µl de Directzol RNA Pre-wash y centrifugar a 16000 g durante 30 segundos en la microcentrifuga. Descartar.
- Cambiar el tubo colector, añadir 700µl de RNA Wash buffer a la columna y centrifugar a 16000 g durante 2 minutos (4°C). Descartar.
- Centrifugar el tubo vacío a 16000g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Transferir columna a un tubo de 1.5ml libre de RNAsa.
- Eluir el ARN en 20µl de agua libre RNAsas (DEPC) e incubar durante 5 minutos en hielo y centrifugar durante 30 segundos a 16000 g.
- Cuantificar por nanodrop.

Anexo 6:

Primera fase: Hibridación del primer hexámero con el molde de ARN:

50uM de Hexámeros	1µl
10mM de dNTP mix	1µl
ARN con DNAsa	10µl
Agua DEPC	1µl

Se incubo a 65°C durante 5 minutos y luego en hielo.

Segunda fase: Preparación de la reacción de Retrotranscripción:

5X Buffer de SuperScript IV	4µl
100mM DTT	1µl
Inhibidor de RNasa	1µl
RT SuperScript IV	0.5µl

La reacción completa se mezcló con la primera fase y se incubo en el termociclador (Benchmark TC9639) a 23°C durante 10 minutos, 55°C durante 10 minutos y 80°C durante 10 minutos. Además, se tuvo un control de presencia de ADN genómico, en la cual se omite la enzima SuperScriptIV y el inhibidor de RNasa.

Anexo 7:

Búsqueda de los genes homólogos de MTB en *M. smegmatis* con el programa BLASTp

Gen Rv0202c: Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia Rv0202c de MTB, encontrando como homólogo el transportador de membrana en *M. smegmatis* mc21555 con locus MSMEG_0241 con 69.04% de identidad, 100% de cobertura y con el número de accesión YP_884656.1 (Figura 25).

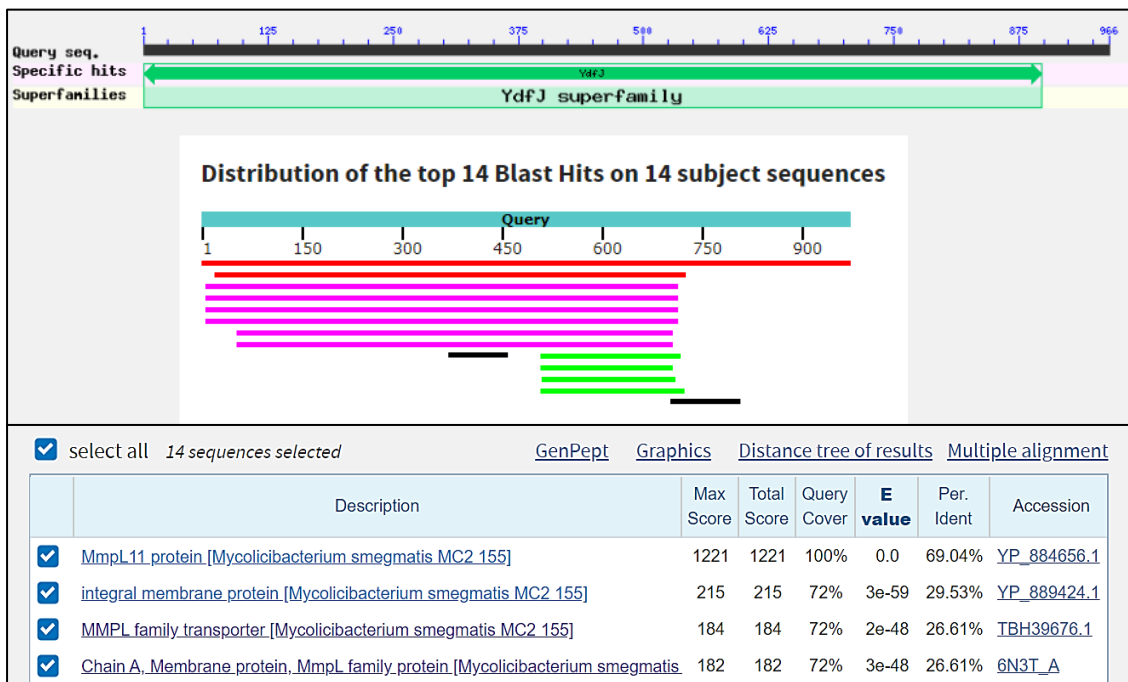


Figura 25: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen Rv0202c de MTB en *M. smegmatis*.

Rv1183: Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv1183* de MTB, encontrando como homólogo el transportador de membrana en *M. smegmatis* mc21555 con locus *MSMEG_0410* con 57% de identidad, 97% de cobertura y con el número de accesión YP_884823.1.

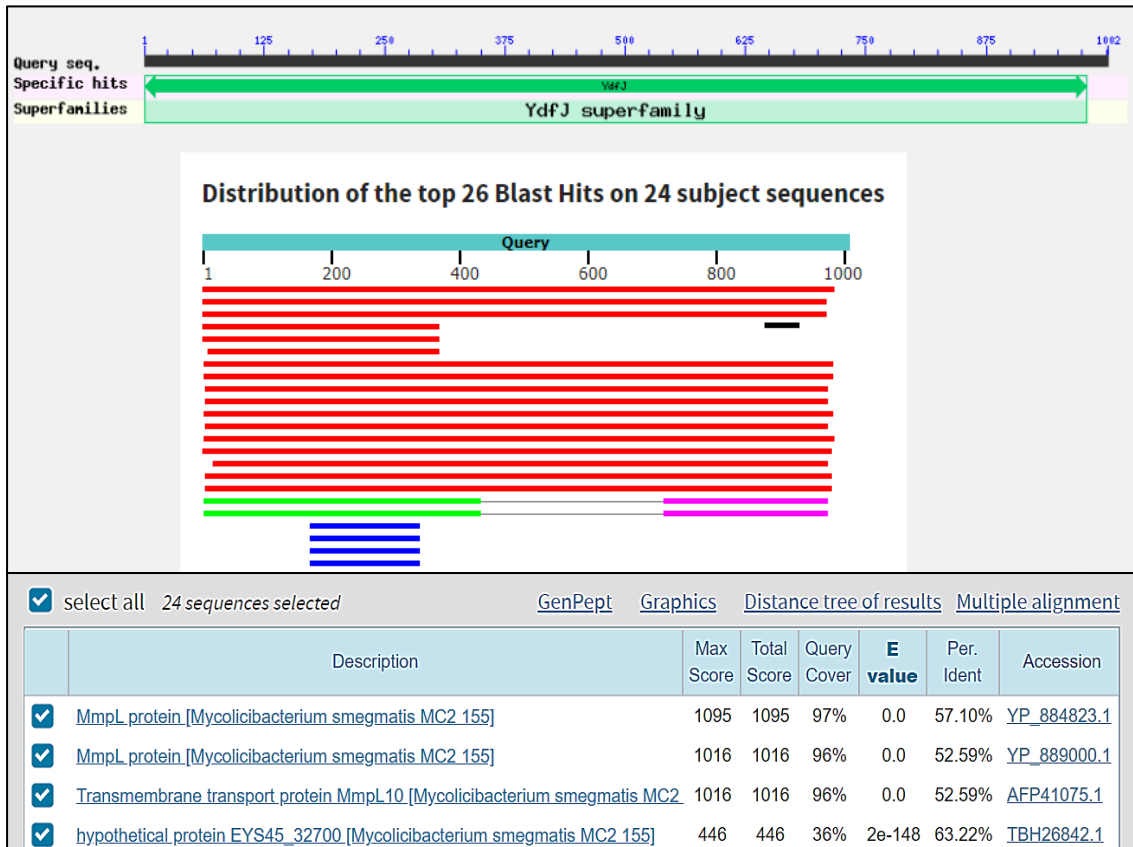


Figura 26: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1183* de MTB en *M. smegmatis*.

Rv1250: Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv1250* de MTB, encontrando como homólogo el transportador de membrana en *M. smegmatis* mc21555 con locus *MSMEG_5046* con 64.47% de identidad, 86% de cobertura y con el número de accesión YP_889296.1.

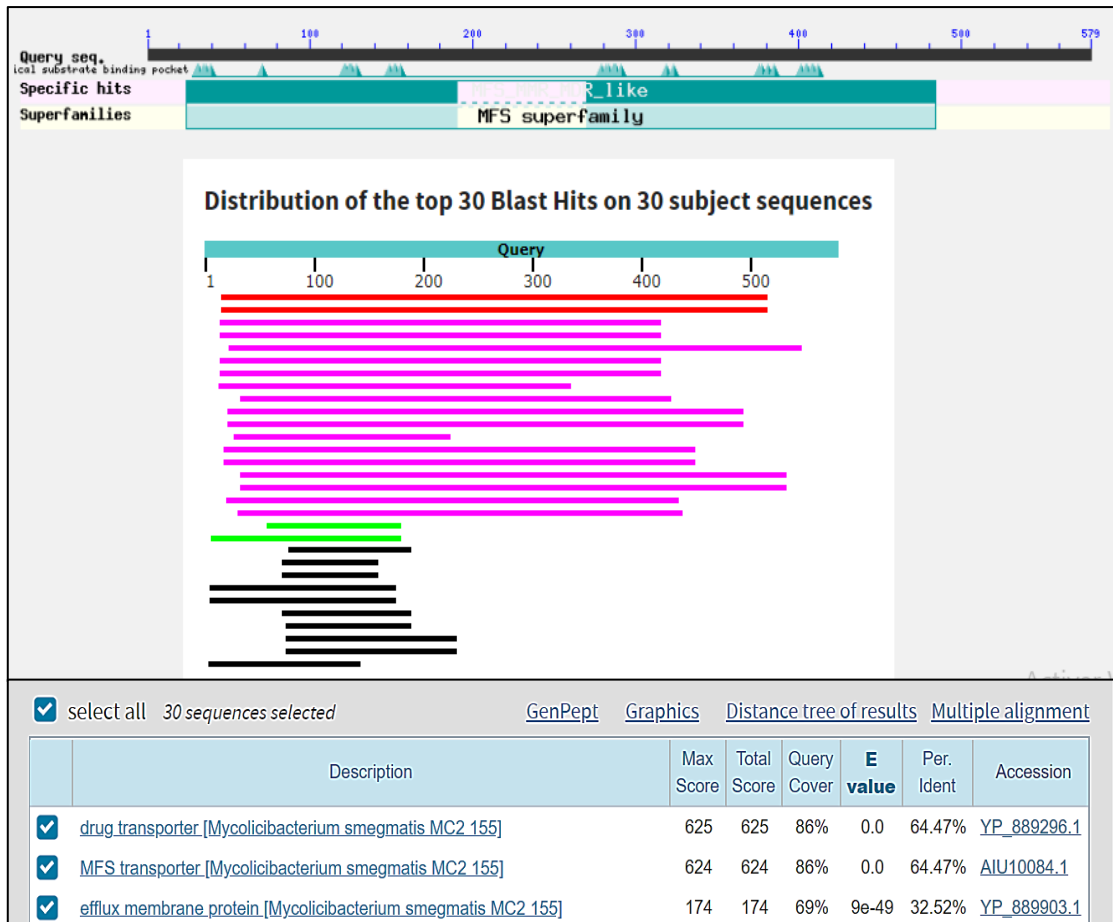


Figura 27: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1250* de MTB en *M. smegmatis*.

Rv0934: Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv0934* de MTB, encontrando como homólogo el transportador de membrana en *M. smegmatis* mc21555 con locus *MSMEG 5782* con 34.23% de identidad, 77% de cobertura y con el número de accesión YP_890011.1.

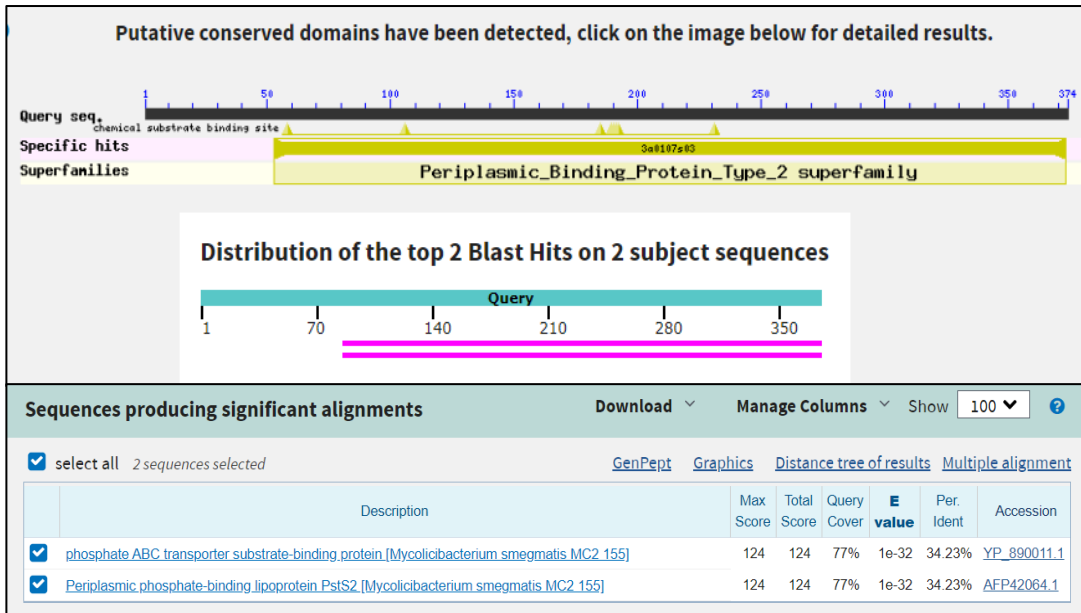


Figura 28: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv0934* de MTB en *M. smegmatis*

Rv1348: Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv1348* de MTB, encontrando como homólogo el transportador de membrana en *M. smegmatis* mc21555 con locus *MSMEG_6554* con 71.58% de identidad, 99% de cobertura y con el número de accesoión YP_890766.

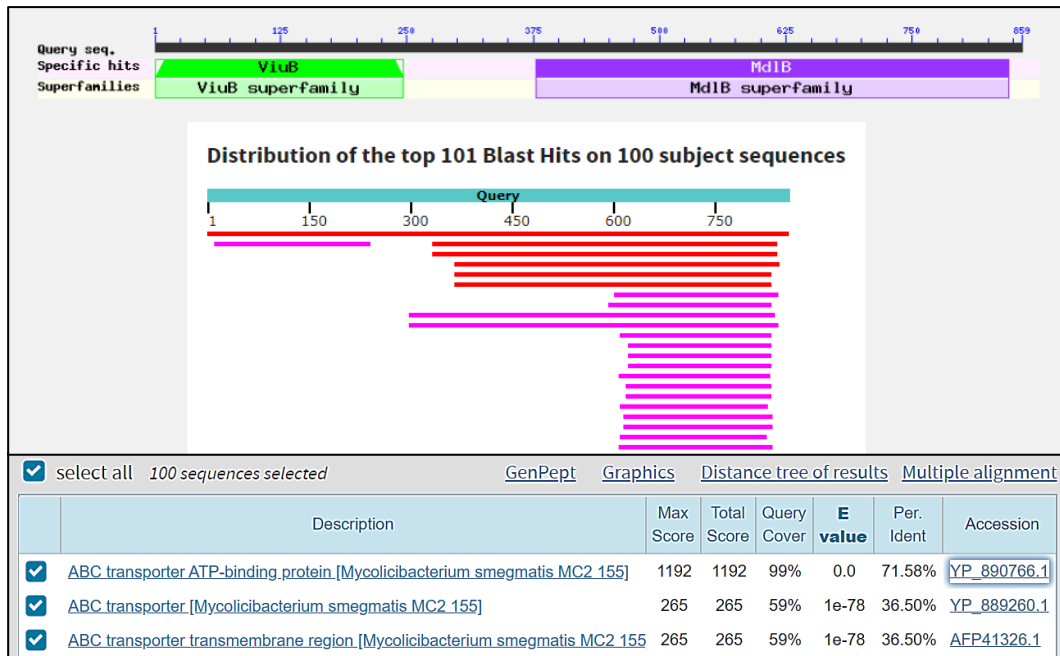


Figura 29: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1348* de MTB en *M. smegmatis*

Rv0507: Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv0507* de MTB, encontrando como homólogo el transportador de membrana en *M. smegmatis* mc21555 con locus *MSMEG_3496* con 59.31% de identidad, 95% de cobertura y con el número de accesoión YP_887800.1

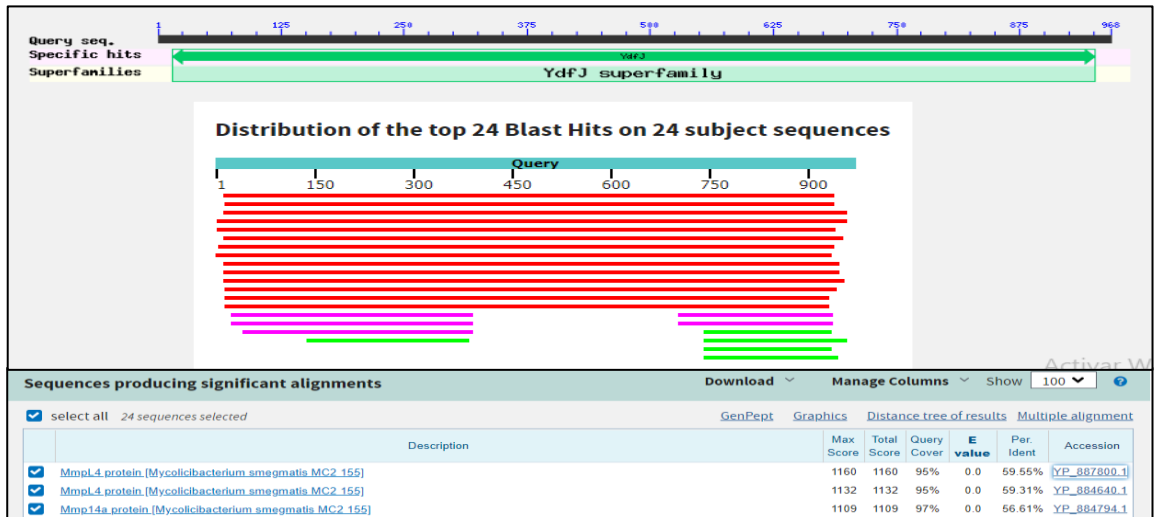


Figura 30: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv0507* de MTB en *M. smegmatis*

***Rv1258c*:** Resultado de la búsqueda en BLASTp de la secuencia *Rv1258c* de MTB, encontrando como homólogo el transportador de membrana en *M. smegmatis* mc21555 con locus *MSMEI_4905* con 62.59% de identidad, 68% de cobertura y con el número de accesoión AFP41349.1

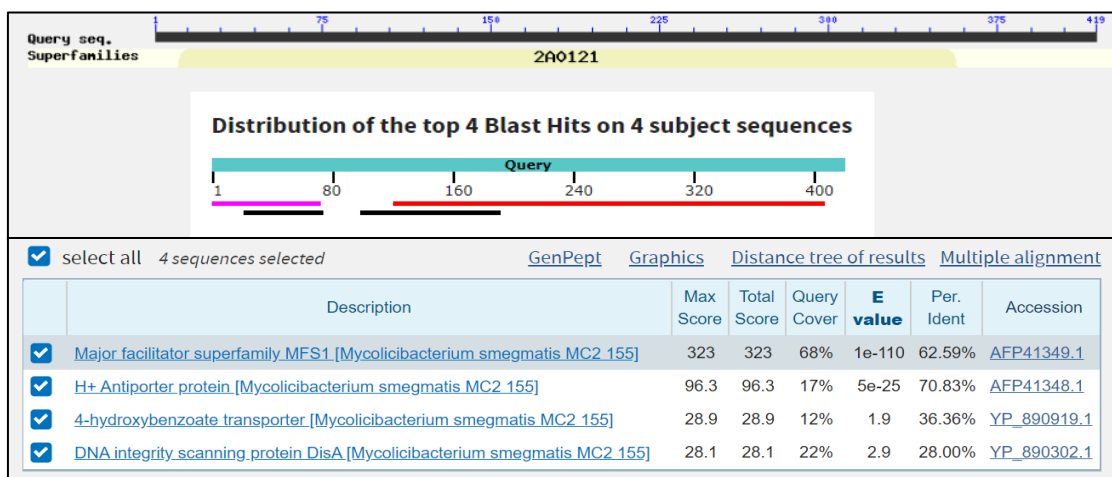


Figura 31: Resultado de la búsqueda con BLASTp del homólogo del gen *Rv1258c* de MTB en *M. smegmatis*