

Tesina de Grado para la Licenciatura en Bioquímica

**Puesta en marcha de la técnica de CRISPR-dCas9i en micobacterias,
focalizada en el gen de la fosfatasa de tirosina PtpA**

Valentina Hergatacorzian

**Universidad de la República
Facultad de Ciencias**

**Orientadora: Dra. Andrea Villarino
Co-orientadora: Dra. Mariana Margenat**

**Montevideo, Uruguay
2024**

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) es el agente etiológico de la tuberculosis, enfermedad que causa en el mundo 1.3 millones de muertes por año. Aunque existe quimioterapia, esta enfermedad sigue siendo un problema debido a múltiples factores, el diagnóstico y tratamiento tardío o abandono de éste debido a su larga duración, la aparición de cepas multirresistentes, el deterioro de la salud general de la población y la falta de fondos suficientes a nivel mundial. Se estima que una de cada cuatro personas se infecta con *Mtb* y un 10% desarrolla la enfermedad. Dentro de las estrategias para evadir la respuesta inmune *Mtb* introduce en el citosol diversos factores de virulencia. Uno de ellos es la fosfatasa de tirosina PtpA, proteína que nuestro grupo demostró interacciona con proteínas humanas relacionadas al metabolismo. En este contexto, es relevante para el grupo obtener cepas micobacterianas que carezcan de dicho gen o que el mismo esté silenciado. Recientemente se ha aplicado con éxito la estrategia CRISPR-dCas9 interferente en la generación de cepas mutantes de micobacterias. Con este método se puede modular el nivel de expresión de un gen, insertando al genoma bacteriano un plásmido que contenga la secuencia de la proteína dCas9 y el sgRNA. La enzima dCas9 es incapaz de cortar la doble hebra de ADN debido a mutaciones en sus dominios nucleasa y se une al sgRNA, cuya secuencia fue diseñada de forma de que complemente y se hibride al gen que codifica para PtpA, formando un complejo que inhibe la transcripción de dicho gen. En el presente trabajo se aplicó dicha estrategia a *Mycobacterium bovis* BCG y *Mycobacterium smegmatis*, siendo exitosa para esta última micobacteria, ya que se detectó una reducción significativa de los niveles de PtpA en extractos proteicos bacterianos. A su vez, los resultados sugieren que en las condiciones de cultivo utilizadas en la tesis la PtpA de *Mycobacterium smegmatis* producida no se secreta ya que se detecta principalmente en los extractos celulares y no en el sobrenadante de los cultivos de *Mycobacterium smegmatis*.

Palabras clave

Micobacterias, fosfatasa de tirosina, PtpA, CRISPR-dCas9i

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	5
1.1. La tuberculosis	
1.2. Características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
1.3. Fosfatasa de tirosina PtpA en diferentes micobacterias	
1.4. CRISPR en micobacterias	
2. Hipótesis.....	14
3. Objetivo general y específicos.....	14
4. Materiales y Métodos.....	15
4.1. Materiales	
4.2. Ensayo de CRISPR-dCas9i para la obtención de una cepa micobacteriana mutante en el gen que codifica para PtpA	
4.2.1. Expansión en <i>E. coli</i> de los plásmidos de pIRL58 y pIRL19 y purificación	
4.2.2. Obtención e inserción del fragmento crRNA en el plásmido pIRL58	
4.2.3 Obtención de cultivos de <i>Mb BCG</i> y <i>Msmeg</i>	
4.2.4. Electroporación de <i>Mb BCG</i> con los plásmidos de interés	
4.2.5. Electroporación de <i>Msmeg</i> con los plásmidos de interés	
4.2.6. Inducción del sistema CRISPR-dCas9i en <i>Msmeg</i>	
4.3. Evaluación de la presencia de PtpA en los cultivos de <i>Msmeg</i>	
4.3.1. Preparación de extractos	
4.3.2. Determinación de la concentración de proteínas	
4.3.3. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	
4.3.4. Dot Blot y Western Blot	
5. Resultados y Discusión.....	23
5.1. Se obtuvieron pIRL58 y pIRL19 necesarios para CRISPR-dCas9i	
5.2. Se generó el fragmento ADN que dará lugar al crRNA y se introdujo en pIRL58	
5.3. Se logró cultivar y realizar una identificación fenotípica de <i>Mb BCG</i> y <i>Msmeg</i>	
5.4. Se logró introducir los plásmidos pIRL58 y pIRL19 en <i>Msmeg</i>	
5.5. Se indujo con éxito el sistema CRISPR-dCas9i en <i>Msmeg</i>	
6. Conclusiones y Perspectivas.....	33
7. Bibliografía.....	33
8. Anexo.....	41
8.1. Preparación de soluciones	
8.2. Transformación plásmido pIRL58 con inserto	

8.3. Determinación de concentración de los extractos proteicos obtenidos en 4.3.1 por el método BCA

8.4. Evaluación de la inducción del sistema CRISPR-dCas9i por *Dot Blot* y *Western Blot*

1. Introducción

1.1. La tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una zoonosis de incidencia mundial que afecta a humanos, bovinos y otras especies. Los agentes etiológicos de la TB son las micobacterias incluídas en el *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), grupo que incluye al patógeno humano *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (Vogelneest, 2013). El bacilo *Mtb* responsable de esta enfermedad fue descubierto por el Dr. Robert Koch el 24 de marzo de 1882, por lo que hoy nos referimos a *Mtb* también como “Bacilo de Koch”. Históricamente es una de las enfermedades infecciosas más letales en el mundo. En los últimos 20 años la TB ha causado la muerte de 30 millones de personas, a una tasa promedio 1.5 millones por año, ocupando el primer lugar hasta la aparición de COVID-19. En 2022 se estimaron 10.6 millones de casos, 7.5 millones de ellos fueron personas diagnosticadas por primera vez (5.8 millones fueron hombres, 3.5 millones mujeres y 1.3 millones niños). En las Américas se estima un incremento del 14% de casos de TB en comparación con 2015 (Global tuberculosis report, 2023). Particularmente en nuestro país en 2023 se reportaron 1350 casos, de los que 1171 fueron casos nuevos, lo que hace a un índice de incidencia de 35,9 casos cada 100,000 habitantes. Desde 2006 Uruguay presenta un aumento sostenido de la incidencia, mayor que el promedio de las Américas (31 cada 100,000 habitantes) (CHLAEP, 2024).

La única vacuna aprobada contiene el Bacilo Calmette y Guérin (*BCG*) que corresponde a una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (*Mb* BCG) (Lange et al., 2022). En 1921 fue administrada con éxito por primera vez a un bebé recién nacido cuya madre había perecido de TB. Existen varias cepas vacunales que difieren levemente entre sí (“Pasteur”, “Copenhagen”, etc.), las cuales fueron atenuadas a partir de una cepa original de *M. bovis* mediante 230 pasajes seriados. La cepa vacunal, se mantuvo en medio líquido, demostrando su no-virulencia en diferentes modelos animales (como vacas, ratones y monos) (Hesseling, 2009; Moise et al., 2009), lo cual indica que las mutaciones inducidas en el atenuamiento son estables (Mahairas et al., 1996). Posteriormente, se demostró que algunas mutaciones interrumpen con el funcionamiento del sistema de secreción del factor de virulencia ESAT-6 (*early secretory antigenic target* 6 kD) (Harboe et al., 1996) y varios polimorfismos de un solo nucleótido que afectan diversos sistemas, tales como la producción de ciertos ácidos micólicos (lípidos de la membrana de *Mtb*) (Belley et al., 2004) y el correcto funcionamiento de una proteína regulada por AMP cíclico (CRP) (Spreadbury et al., 2005). La vacuna BCG no logra actualmente prevenir de forma efectiva la TB y es eficaz principalmente en niños (Mangtani et al., 2014). Una de las razones principales de esto es que las cepas circulantes de *Mtb* son mucho más virulentas que las cepas que circulaban 100 años atrás. Nuevas vacunas se vienen desarrollando basadas en el uso de diferentes estrategias, siendo MTBVAC una de las que estarán disponibles próximamente. MTBVAC se basa en el uso de una cepa atenuada de *Mtb*, a la que se le eliminaron los genes *phoP* (Rv0757) y *fadD26* (Rv2930) (Zhuang et al., 2023). PhoP es un factor de

transcripción que regula la expresión de alrededor del 2% del genoma de *Mtb*, incluyendo la síntesis de lípidos de la membrana celular como las aciltrealosas y la secreción de ESAT-6 (Frigui et al., 2008). Por otra parte, la delección en *fadD26* interfiere en la síntesis de *Phthiocerol dimycocerosate* (PDIM), lípidos de la envoltura bacteriana (Camacho et al., 1999). Por lo tanto, gracias a la delección de estos genes, se genera una desestabilización de las membranas y envolturas celulares y una disminución de la secreción de factores de virulencia. Actualmente se encuentra en la fase tres de pruebas clínicas, que incluye la prueba de su eficiencia en niños y adolescentes (Zhuang et al., 2023).

Existe una quimioterapia que permite tratar la TB, los antibióticos más comunes y de primera línea son: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (Tabla 1). No obstante, no se ha logrado erradicar la enfermedad a nivel mundial debido a varias razones. Entre ellas, no toda la población tiene acceso a estos antibióticos, los pacientes abandonan el tratamiento debido a que es largo (de cuatro meses a un año), en ciertos casos el tratamiento no es el adecuado y muchas veces el diagnóstico es tardío presentándose cuadros clínicos más complicados e infecciones más avanzadas. Todo esto ha contribuido al surgimiento de cepas resistentes a uno, dos o todos los antibióticos existentes (Liebenberg et al., 2022; Global tuberculosis report, 2023). Sumado a esto, el deterioro de la salud general de la población (infección por HIV, COVID-19, adicciones, diabetes, malnutrición) dificulta aún más el tratamiento de la TB, la adherencia a este y empeora el pronóstico de salud en las personas infectadas. Otro factor relevante es que los fondos dedicados a la investigación, prevención y tratamiento de la TB son insuficientes a nivel mundial, del orden de la mitad de los que se necesitaría para erradicar la TB (Global tuberculosis report, 2023).

Tabla 1: Mecanismo de acción y resistencia de los antibióticos de primera generación utilizados en la quimioterapia contra TB (Shi et al., 2007).

Antibiótico	Blanco/Mecanismo	Resistencia
Rifampicina	Se une a la ARNpolimerasa micobacteriana y bloquea así la elongación del ARN que está siendo sintetizado.	Asociada a una mutación en el gen de la subunidad b de la ARN polimerasa (gen <i>rpoB</i>).
Isoniazida	Entra a la bacteria como una pro-droga y es activada por la enzima catalasa-peroxidasa KatG de <i>Mtb</i> generando una amplia variedad de especies reactivas con actividad bactericida que afectan la síntesis de ácido micólico, dañan el ADN, oxidan lípidos, y alteran el metabolismo del NAD ⁺ .	Asociada a mutaciones en los genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> (NADH enoil acil carrier proteína reductasa), <i>kasA</i> (cetoacil ACP sintasa), <i>ndh</i> (NADH deshidrogenasa), <i>ahpC</i> (hidroperóxido reductasa).
Etambutol	Interfiere con la síntesis e integridad de la pared celular de la micobacteria al inhibir las arabinosil transferasas codificadas por el locus <i>embCAB</i> esencial para la síntesis de arabinogalactano (<i>embA</i> y <i>embB</i>) y lipoarabinomanano (<i>embC</i>).	Asociada a mutaciones en el locus <i>embCAB</i> , principalmente en <i>embB</i> .

Pirazinamida	Pro-droga activada por enzima pirazinamidasa -nicotinamidasa de <i>Mtb</i> , codificada por el gen <i>pncA</i> . Su mecanismo de acción continúa sin comprenderse completamente, sin embargo estudios recientes sugieren que se une a la enzima aspartato decarboxilasa, y promueve así su degradación (Gopal et al., 2020).	Asociada a mutaciones en el gen <i>pncA</i> .
--------------	--	---

La pandemia de Covid 19 generó un estado de emergencia global en el que disminuyó la cantidad de casos de TB reportados, dado que los sistemas de salud no tuvieron la capacidad de diagnóstico necesaria debido a su estado de saturación, falta de recursos y el estímulo a la población a permanecer confinado. En la Figura 1 se observa la estimación de muertes causadas por TB mundialmente en los últimos 12 años. Durante los años de la pandemia (2019-2021) se interrumpe la reducción sostenida en el número de muertes, observándose un aumento, que impide llegar a la meta propuesta para 2025 por la OMS (Global tuberculosis report, 2023). Asimismo, la epidemia por TB históricamente ha afectado mayoritariamente a personas de edad avanzada y niños, sin embargo en los últimos años se ve mayor incidencia y circulación en la población activa, entre los 15 y 45 años (CHLAEP, 2024; Global tuberculosis report, 2023).

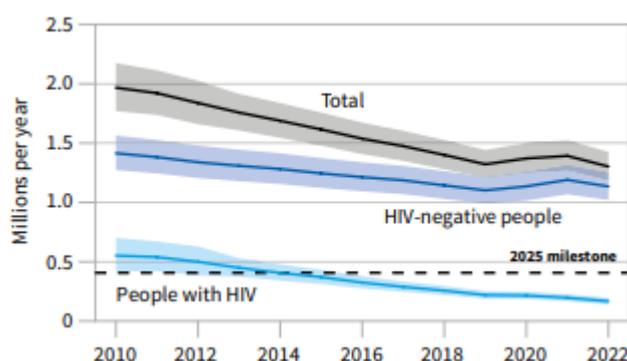


Figura 1: Tendencias globales en el número estimado de muertes causadas por TB entre los años 2010 y 2022. La línea en negro muestra los casos totales, en azul los casos de personas HIV negativas y en celeste personas HIV positivas. La línea punteada muestra la meta para 2025 de la “End TB strategy” (reducción del 75% en el número de muertes totales por TB). Las áreas sombreadas representan intervalos de 95% de incertidumbre. Imagen tomada de Global tuberculosis report, 2023.

1.2. Características de *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb es una bacteria aerobia facultativa de crecimiento lento, forma parte del MTC, un grupo de micobacterias que causan TB en humanos y otros animales. Posee una alta resistencia a diversos antibióticos gracias a la estructura de su compleja envoltura celular (Figura 2), caracterizada por la presencia de una primera capa de peptidoglicanos unidos a la membrana plasmática, típica en las bacterias Gram positivas, y una segunda capa de arabinogalactanos unidos covalentemente a los peptidoglicanos. Los arabinogalactanos se

encuentran ligados a ácidos micólicos, los que representan la mayor parte de esta estructura celular y le dan su característica hidrofóbica y la ya mencionada resistencia a los antibióticos (Hett & Rubin, 2008; Raffetseder, 2016). La última capa de la pared celular consiste principalmente en glicanos (y en menor medida lípidos y proteínas) unidos no covalentemente con el resto de la pared (Lemassu & Daffé, 1994; Ortalo-Magné et al., 1995). Entre los lípidos que componen la pared celular nos encontramos con glucolípidos tales como lipoarabinomanano (LAM), lipomanano (LM) y manósidos de fosfatidil inositol, capaces de anclarse a la membrana plasmática y cuyas funciones se encuentran relacionadas a las etapas iniciales de la infección por *Mtb*, como el reconocimiento por parte de células del sistema inmune y la fagocitosis por parte de los macrófagos (Brennan, 2003; Pitarque et al., 2008). Por otra parte, la gran densidad de los lípidos de la pared celular también interfiere en la tinción Gram, por lo que las micobacterias son sometidas a tinciones ácido-resistentes, como la tinción Ziehl-Neelsen (ZN).

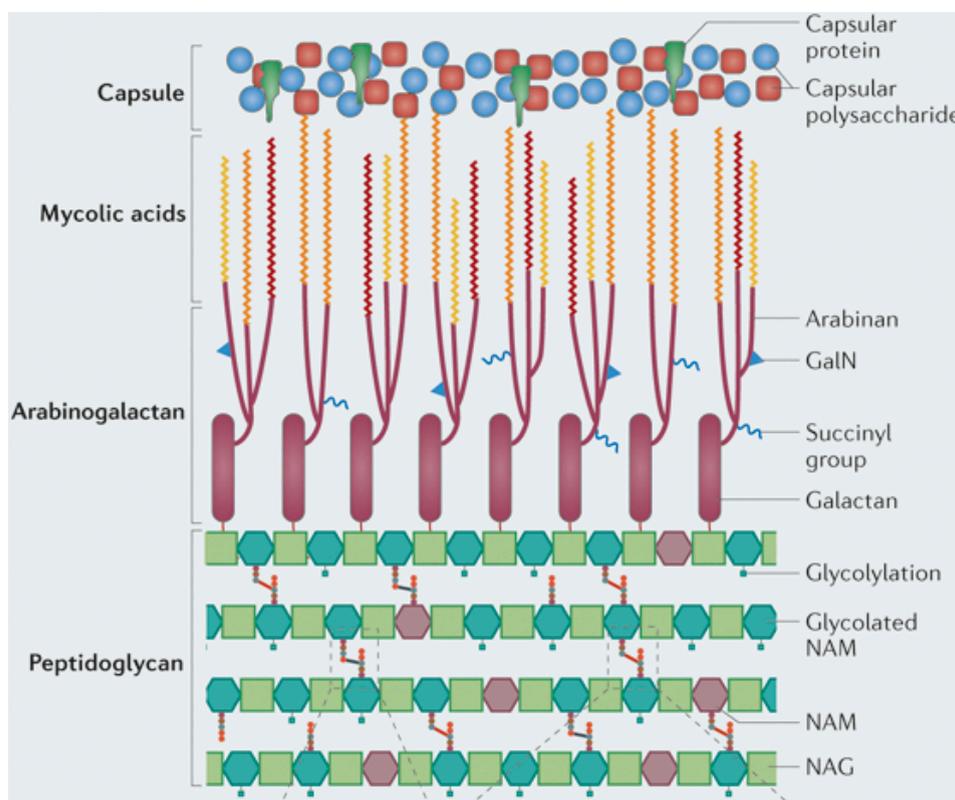


Figura 2: Esquema representativo de la estructura de la pared celular micobacteriana. La primera capa se caracteriza por la presencia de peptidoglicanos, largos polímeros de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) unidos mediante enlaces peptídicos, pueden encontrarse glicosilados. Una segunda capa consistente en arabinogalactanos, conecta los peptidoglicanos a los lípidos principales de la tercera capa, los ácidos micólicos. Además, presentan una cápsula externa compuesta mayormente por polisacáridos (glucanos, arabinanos y arabinomananos), y en menor medida proteínas y lípidos. Tomada de Kieser & Rubin, 2014.

La principal forma de transmisión de *Mtb* es mediante partículas en el aire que ingresan al cuerpo humano por las vías respiratorias e infectan inicialmente macrófagos

alveolares (Cambier et al., 2014). Un 10% de los infectados por *Mtb* generan una infección activa y por ende la TB. En el resto de los infectados la bacteria se mantiene en un estado de latencia durante largos períodos de tiempo contenidos en granulomas, formados en consecuencia de la respuesta inmune. Estos se encuentran constituidos por núcleos de macrófagos infectados y células necróticas rodeadas de células especializadas derivadas de macrófagos (Figura 3). Cuando el hospedero se encuentre en una situación comprometida, como la edad avanzada o con alguna enfermedad inmunosupresora (por ejemplo HIV), *Mtb* se reactivará, pasará a su estado activo y causará la enfermedad al diseminarse a otros órganos. Infecciones extrapulmonares de *Mtb* pueden afectar diversos órganos y tejidos, principalmente ganglios linfáticos cervicales y pleura, y en menor medida el sistema nervioso central, el torrente sanguíneo (considerada una de sus formas más letales) y el sistema esquelético (Moule & Cirillo, 2020).

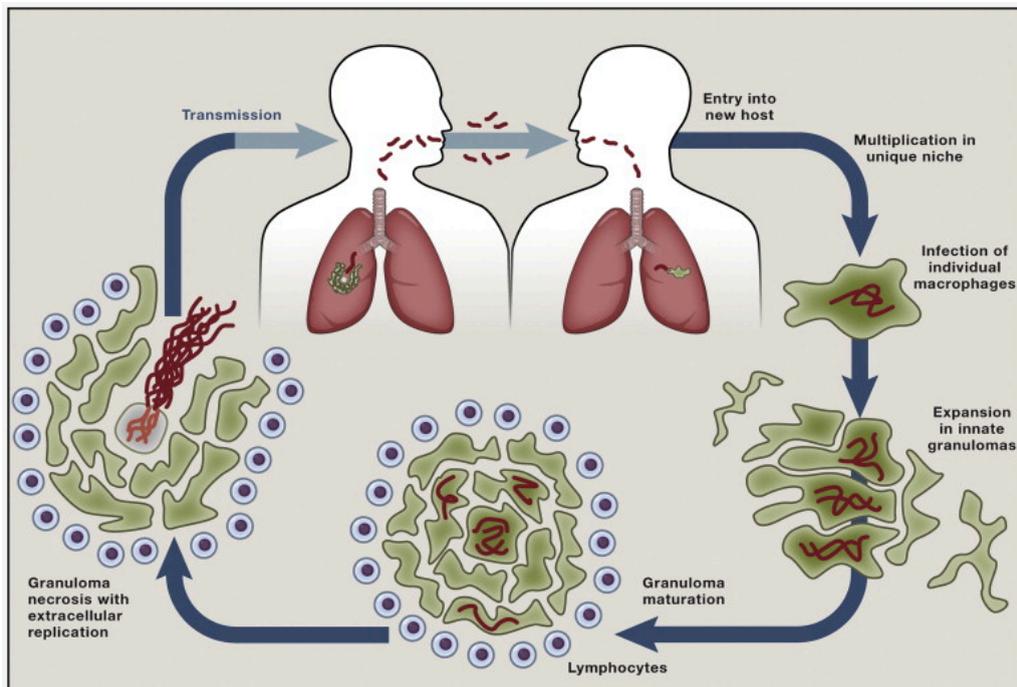


Figura 3: Ciclo infeccioso de *Mtb*. La infección por *Mtb* comienza cuando partículas de aerosol con bacterias, provenientes de un individuo con la enfermedad activa, llegan a los pulmones de un individuo sano. Los macrófagos del epitelio pulmonar fagocitarán a las bacterias y promoverán así el reclutamiento de una nuevos macrófagos y linfocitos que formarán el granuloma. El granuloma limita la expansión de la infección, sin embargo, las bacterias dentro de este pueden generar la necrosis de los macrófagos infectados, promoviendo la replicación de estas, su diseminación y transmisión. Imagen tomada de Cambier et al., 2014.

La interacción con los macrófagos alveolares comienza principalmente mediante el reconocimiento de *Mtb* por parte de receptores de lectina tipo C y receptores barrenderos. En particular, el reconocimiento de LAM (lipoarabinomano) y ManLAM (manosil-LAM) por parte del receptor de manosa (ManR) lleva a la internalización de *Mtb* (Hossain & Norazmi, 2013; Kang et al., 2005). Una vez el patógeno es internalizado en el fagosoma, las líneas de defensa de los macrófagos son diversas, entre ellas se encuentra la fusión del fagosoma

con el lisosoma formando el fagolisosoma que se acidifica y mata la bacteria, la producción de moléculas antimicrobianas, activación de la autofagia y la apoptosis. Sin embargo, *Mtb* logra evadir la respuesta inmune y manipular así a su hospedero, por ejemplo, puede inhibirla apoptosis y autofagia de los macrófagos, lo que favorece la persistencia de la bacteria dentro de las células eucariotas y evita la externalización de componentes intracelulares que serían antígenos clave en el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (Koul et al., 2004); o promover la necrosis en ciertas etapas de la infección que permiten la diseminación del patógeno a otros tejidos (Bo et al., 2023; Zhang et al., 2005).

1.3. Fosfatasa de tirosina PtpA en diferentes micobacterias

Dentro de los factores de virulencia implicados en la persistencia de *Mtb* se encuentra la fosfatasa de tirosina PtpA. PtpA es una fosfatasa de tirosina de bajo peso molecular introducida en el citosol (Bach et al., 2008) y en el núcleo (Wang et al., 2017) de los macrófagos durante la infección. Su secuencia carece de señal de exportación conocida y se ha sugerido es introducida en los macrófagos mediante el sistema de secreción SecA2 o ESX/tipo VII micobacteriano (Sullivan et al., 2012; Wong et al., 2013). Se ha descrito que PtpA, al interactuar con proteínas eucariotas, es capaz de inhibir la formación del fagolisosoma (Bach et al., 2008; Wong et al., 2011), modular la respuesta inmune al inhibir la producción de ciertas citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , y IL-12) (Wang et al., 2015), e inhibir la apoptosis (Poirier et al., 2014), favoreciendo la supervivencia de la bacteria dentro del macrófago. Según la hipótesis de nuestro grupo, PtpA podría, además, regular el metabolismo energético del macrófago (Margenat et al., 2015, 2023). Si bien el gen *ptpA* no es un gen esencial para el crecimiento de la bacteria, se ha demostrado que es relevante durante la infección de macrófagos humanos derivados de monocitos THP-1 y ratones SPF C57BL/6v (Bach et al., 2008).

La cepa *Mb* BCG, a pesar de ser menos virulenta que *Mtb*, cuenta con un gen que codifica para PtpA idéntico al de *Mtb*, cuyo producto se ha demostrado es introducido en el citosol de los macrófagos durante la infección, como ocurre con *Mtb* (Wang et al., 2017). Por otro lado, entre los genes de *Mycobacterium smegmatis* (*Msmeg*) se observa que más de 2800 genes codifican para proteínas con ortólogos en *Mtb*, con identidad en aminoácidos mayor a 50% (Judd et al., 2021). *Msmeg* no pertenece al MTC, ya que es una especie que no causa TB y es de crecimiento rápido. Si bien esta bacteria posee el gen que codifica para PtpA y su homología de secuencia con respecto a la PtpA de *Mb* es de 75,64%, no hay reportes de que se secrete durante la infección. El hecho que *Msmeg* pueda ser manipulada en laboratorios de bioseguridad BSL1 y que su crecimiento sea rápido, la hacen un modelo más favorable ante otros como *Mtb* o *Mb* BCG que requieren largos tiempos de incubación y laboratorios de mayor nivel de bioseguridad (BSL-3 o BSL-2, respectivamente) (Sparks et al., 2023). Sin embargo, este modelo también tiene sus limitaciones debido a su menor patogenicidad y divergencia genética respecto a los miembros del MTC, lo que hace que no sea conveniente utilizarlo al momento de estudiar los mecanismos de infección de *Mtb*. Las micobacterias de crecimiento lento, como *Mb* BCG y *Mycobacterium marinum*, son mejores modelos ya que se encuentran más estrechamente relacionadas con *Mtb* y presentan una

interacción bacteria-hospedero y factores de virulencia semejantes (Shiloh & Champion, 2010).

Para abordar la hipótesis sobre el potencial papel de PtpA en la modulación del metabolismo lipídico del macrófago, es relevante para nuestro equipo contar con estrategias de mutagénesis que nos permitan generar cepas micobacterianas mutantes en el gen de la fosfatasa PtpA. Hemos logrado con éxito, y gracias a la colaboración con el grupo liderado por la Dra. Fabiana Bigi, la cepa mutante para el gen que codifica para PtpA en una cepa virulenta de *Mtb* (CDC1551) (Fleischmann et al., 2002; Irving, 2022). Esta cepa se generó mediante la estrategia clásica de recombinación homóloga (Irving, 2022), estrategia que no ha podido ser aplicada con éxito en Uruguay para *Mb* BCG, en el marco de la tesis de maestría de la Lic. Tania García. La recombinación homóloga aplicada a la generación de micobacterias mutantes consiste en dos etapas principales, la primera es la transformación por electroporación de *Mtb* con un plásmido que expresa las recombinasas RecE y RecT, que promueven el intercambio alélico, y contiene resistencia a kanamicina. En una segunda etapa se realiza una segunda electroporación con la finalidad de introducir el fragmento a recombinar, un cassette de higromicina que interrumpirá el gen que codifica para PtpA. De esta forma se interrumpe el gen e inhibe de forma permanente su transcripción. El problema fundamental ha sido la baja eficiencia en las transformaciones por electroporación de *Mb* BCG. Así, buscando sortear las dificultades, se consideró aplicar la estrategia de CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), y la cuál ha sido utilizada en micobacterias con éxito (Meijers et al., 2020; Yan et al., 2020). Una de las ventajas de esta estrategia es que requiere únicamente de una etapa de transformación por electroporación de la bacteria y no dos como en la estrategia de recombinación homóloga. Por lo tanto, con éste método las bacterias son sometidas a menor cantidad de estrés por el shock eléctrico de la electroporación, lo que hace más viable y rápida la obtención de mutantes. A continuación se describe el origen y características de dicho sistema que permite interferir con la transcripción de genes de interés.

1.4. CRISPR en micobacterias

Muchas bacterias y arqueas poseen secuencias palindrómicas cortas repetidas en su ADN, que se encuentran rodeando secuencias singulares, generalmente provenientes de ADN viral, denominados espaciadores. Esto es a lo que llamamos hoy en día CRISPR, que junto con los genes codificantes de las proteínas Cas, capaces de cortar ADN, forman un sistema de defensa de estos organismos (Jinek et al., 2012). Este sistema puede haber surgido como resultado de la exposición de estas bacterias a elementos génicos de fagos y/o plásmidos, seguido de una posterior integración de fragmentos pertenecientes a estos elementos dentro del arreglo CRISPR. También puede considerarse como un registro o recuerdo de infecciones previas, que definen la capacidad de defensa de las células procariontas, generando una maquinaria de prevención para posibles infecciones de los mismos patógenos en el futuro (Barrangou et al., 2007; Jiang & Doudna, 2017). Así, cuando un virus introduce su ADN en el citoplasma de una bacteria que posee el arreglo CRISPR, esta es capaz de integrar pedazos de ese ADN entre sus secuencias palindrómicas repetidas, y dejar así un registro del ADN foráneo. Luego, el arreglo CRISPR, incluyendo los

Las investigadoras E. Doudna y J. A. Charpentier, galardonadas con el Premio Nobel de Química en 2020, fueron las primeras en demostrar el uso de un corte doble hebra en ADN con el sistema CRISPR-Cas9 (Jinek et al., 2012). Estas investigadoras también diseñaron un gRNA quimérico (*single guide RNA*, sgRNA) que combina el crRNA y el tracrRNA, en una sola molécula, lo que simplifica el sistema. Entonces, el sistema puede ser programado para cortar cualquier porción de ADN, solamente con el cambio de la secuencia del espaciador. Asimismo, es posible controlar el tipo de cambio que se genera al utilizar el sistema ya que el corte doble hebra puede ser reparado mediante unión de extremos no homólogos, que tiende a cometer errores causando deleciones o inserciones; o por recombinación homóloga, que se puede utilizar para realizar una modificación más precisa utilizando una secuencia molde. Por lo tanto, nos encontramos con una técnica de edición génica que no solamente posee gran precisión, sino que es adaptable a casi cualquier condición que uno quiera imponer y con la que se puede obtener una gran variedad de resultados.

Una variación de la estrategia clásica que es muy popular al trabajar con genes no esenciales es el CRISPR-dCas9 interferente (CRISPR-dCas9i). Esta estrategia se basa en la aplicación de una proteína Cas9 incapaz de cortar la doble hebra de ADN, llamada dCas9, debido a mutaciones D10A y H840A en sus dominios nucleasa (Qi et al., 2013), lo que le permite unirse a su ADN blanco e interferir en la transcripción, como se observa en la Figura 5.

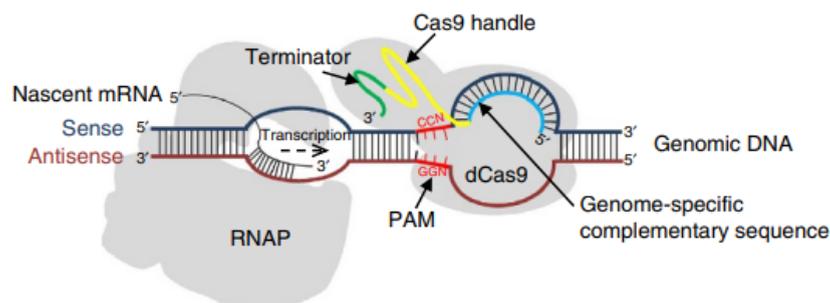


Figura 5: Dibujo explicativo de la regulación de la expresión génica con CRISPR-Cas9 interferente mediante impedimento estérico de dCas9 a la ARN polimerasa. El complejo formado por dCas9 y la secuencia blanco de ADN bloquea el pasaje de ARN polimerasa y por lo tanto la elongación de la transcripción. Imagen tomada de Choudhary et al., 2015.

Esta técnica ha sido aplicada con éxito en micobacterias (Rock et al., 2017). Para ello, un plásmido codificando los diferentes componentes del sistema CRISPR-dCas9i y un promotor inducible por anhidrotetraciclina (ATc) es insertado en el ADN micobacteriano. Para ello, en la primera etapa se introducen dos plásmidos en la micobacteria, uno de los cuales se insertará en el genoma micobacteriano, mediante recombinación sitio específica, sin interrumpir el gen blanco. Esto es posible gracias a que el segundo plásmido introducido posee un gen que codifica de forma constitutiva para la L5 integrasa, la cual proviene de un fago de *Mycobacterium smegmatis*. Esta integrasa reconoce un sitio *attP* presente en el plásmido que codifica para los componentes del sistema CRISPR-dCas9i y un sitio *attB* en

el genoma micobacteriano y es capaz de mediar la recombinación entre los dos sitios. La segunda etapa es la de inducción del sistema con la droga ATc, que da lugar a la expresión de dCas9 (proveniente de *Streptococcus thermophilus*) y del sgRNA, que formarán el complejo capaz de silenciar parcial o totalmente la transcripción del gen blanco. La cantidad de ATc utilizada define el nivel de silenciamiento, suele ser mayor si se trata de micobacterias de crecimiento lento que de crecimiento rápido, posiblemente debido a la diferencia en la regulación de los promotores o a una menor permeabilidad de *Mtb* a las tetraciclinas. Además se ha demostrado que la ATc funciona correctamente durante infecciones de macrófagos con micobacterias mutantes obtenidas con esta estrategia (Ehrt et al., 2005). Por otro lado, el sistema CRISPR-dCas9i puede regularse y adaptarse para cumplir diversas funciones, se puede silenciar total o parcialmente un solo gen, así como múltiples genes simultáneamente. Uno de los principales objetivos con los que se ha utilizado esta técnica en micobacterias ha sido probar la esencialidad de varios genes, por ejemplo, en el trabajo realizado por de Wet et al., 2020, se estudiaron 263 genes en *Msmeg* con ortólogos directos en *Mtb*, visualizando los cambios morfológicos en las células luego del *knockdown* de estos genes.

En el presente trabajo se propone aplicar la estrategia de CRISPR-Cas9i para el gen de la fosfatasa micobacteriana PtpA, utilizando las cepas *Mb BCG* de crecimiento lento y la cepa *Msmeg* de crecimiento rápido. Obtener estas herramientas resulta de suma importancia para caracterizar las cepas mutantes y compararlas con las cepas salvajes. Además contribuirá a evaluar los cambios en el metabolismo del macrófago que puedan estar asociados a PtpA, realizando ensayos de infección con cepas que podamos manipular en Uruguay, como *Mb BCG* y *Msmeg*, dada la carencia de un laboratorio de bioseguridad adecuado para manipular las cepas virulentas.

2. Hipótesis

Es posible modificar genéticamente a *Mb BCG* y *Msmeg* utilizando la técnica CRISPR-dCas9i, de manera de silenciar la expresión del gen que codifica para PtpA.

3. Objetivo general y específicos

Objetivo general

Poner en marcha la técnica de CRISPR-dCas9i con el propósito de silenciar la expresión del gen que codifica para PtpA en *Mb BCG* y *Msmeg*.

Objetivos específicos

- 1) Obtener cultivos puros de *Mb* BCG y *Msmeg* a partir del *stock* del laboratorio
- 2) Obtener el plásmido pIRL58 que expresa el sgRNA para el gen que codifica para PtpA necesario para aplicar el método de CRISPR-dCas9i
- 3) Aplicar con éxito el sistema CRISPR-dCas9i en *Mb* BCG y *Msmeg*

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales

La composición y preparación de las soluciones utilizadas en las diferentes metodologías se describen en la sección de Materiales del Anexo. En cada caso se especificó la marca de los reactivos utilizados.

4.2. Ensayo de CRISPR-dCas9i para la obtención de una cepa micobacteriana mutante en el gen que codifica para PtpA

Para aplicar esta estrategia se necesita contar con dos plásmidos: uno que contenga la secuencia codificante de una proteína integrasa y otro que contenga las secuencias codificantes del sgRNA de interés y de la proteína dCas9. A su vez se necesitaron cultivos de micobacterias que se utilizaron en los ensayos de electroporación con dichos plásmidos. A continuación se detalla la metodología utilizada para la obtención de los plásmidos, los cultivos de micobacterias, los protocolos de las electroporaciones realizadas y de la inducción del sistema CRISPR-dCas9i.

4.2.1. Expansión en *E. coli* de los plásmidos pIRL58 y pIRL19 y su purificación

Los plásmidos pIRL58 y pIRL19 fueron proporcionados por la Dra. Gabriela Gago (IBR-Argentina) (Figura 6). El plásmido pIRL58 contiene la secuencia codificante de dCas9, un promotor inducible con anhidrotetraciclina (ATc), un sitio de corte de la enzima BsmBI (ER0451, Thermo Scientific) seguido de la secuencia tracrRNA y un cassette de resistencia a kanamicina. Por otra parte, el plásmido pIRL19 contiene la secuencia codificante de la integrasa L5 de expresión constitutiva, y un cassette que confiere resistencia a ampicilina.

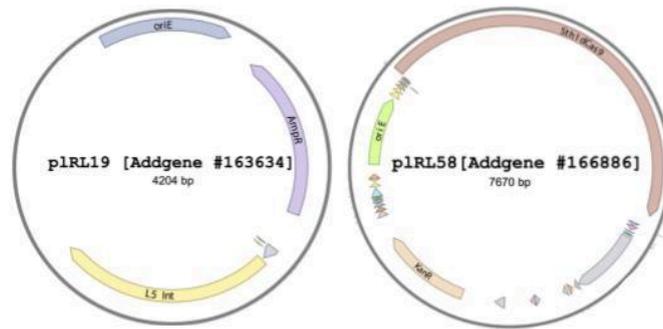


Figura 6: Esquema de los plásmidos utilizados en esta tesis. Der. Plásmido pIRL58 contiene la secuencia codificante de la proteína dCas9, el tracrRNA, un sitio de corte de la enzima BsmBI, sitio de origen de replicación oriE y un cassette de resistencia a kanamicina. Izq. Plásmido pIRL19 contiene la secuencia codificante de una proteína L5 integrasa, sitio de origen de replicación oriE y cassette de resistencia a ampicilina.

Para expandir ambos plásmidos se realizó una transformación mediante shock térmico en bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes disponibles en el laboratorio. Se descongelaron dos alícuotas de 50 μ L de células en hielo durante 10 min, luego se agregaron 100 ng del plásmido correspondiente y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se realizó el shock térmico en termobloque a 42 $^{\circ}$ C por 90 s, seguido de 2 min en hielo, agregando posteriormente 500 μ L de medio *Lisogeny Broth* (LB) e incubando a 37 $^{\circ}$ C por 1 h. Para el plásmido pIRL58, un volumen de 100 μ L de la mezcla de transformación sin diluir y dos diluciones seriadas de esta se sembraron en placas de LB agar/kanamicina (50 μ g/mL). En el caso de pIRL19, se procedió de igual manera, excepto que se utilizaron placas de LB agar/ampicilina (100 μ g/mL). Las placas se dejaron incubando a 37 $^{\circ}$ C durante 24 h para posterior evaluación del crecimiento de colonias transformantes, seleccionando tres colonias de cada transformación e inoculando estas en 3 mL de medio líquido LB conteniendo el antibiótico adecuado e incubando los cultivos a 37 $^{\circ}$ C bajo agitación de 200 rpm durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los cultivos a 12000 rpm por 1 min para recuperar las bacterias, y se procedió a la extracción de ADN plasmídico con un kit comercial (GeneJET Plasmid Miniprep, Thermo Scientific). La cuantificación de los plásmidos se realizó mediante espectrofotometría utilizando un Nano Drop Lite (Thermo Scientific), teniendo en cuenta la relación A260/A280 para evaluar la pureza del plásmido obtenido. Para evaluar la conformación de los plásmidos se sembraron 70 ng de cada uno en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X en buffer de carga 1x final (10X, 10816015, Invitrogen). En paralelo se sembró también 5 μ L del marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb, SM0311, Thermo) y se migró a 100 V durante 40 min. Posteriormente se incubó el gel 40 min en 50 mL de TAE 1X conteniendo 2,5 μ L de GoodView (HCV-2, SBS Genetech) y se visualizaron las bandas del gel en un transiluminador de luz UV.

4.2.2. Obtención e inserción del fragmento crRNA en el plásmido pIRL58

Para la obtención del fragmento de crRNA, que junto al tracrRNA formarán el sgRNA, se utilizó el protocolo descrito por Jeremy Rock (Rock et al., 2017), con algunas modificaciones para adaptarlo a los equipos disponibles en el laboratorio. La primera etapa

Figura 7: Esquema representativo de la digestión de pIRL58 por parte de BsmBI. En rosado se resaltan los sitios de reconocimiento por parte de BsmBI en el plásmido y las flechas rojas marcan sus sitios de corte. Luego de la digestión se subrayan los extremos cohesivos generados, sitio de unión con el crRNA.

Finalmente, una vez obtenido el crRNA hibridado y el plásmido digerido y purificado se realizó la ligación utilizando la enzima T4 ligasa (400.000 U, MD2025, NEB) y las condiciones sugeridas por el proveedor: se mezclaron 2 μ L de pIRL58 digerido (9 ng), 1 μ L oligos hibridados (aproximadamente 3 ng), 0,5 μ L T4 ADN ligasa (200 U finales), 0,6 μ L Buffer T4 ADN ligasa (10X) y 1,9 μ L agua. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 4,5 h, inactivando posteriormente la enzima con una incubación a 65 °C por 10 min. A continuación, para contar con suficiente material se amplificó el plásmido mediante transformación de células *E. coli* DH5 α quimiocompetentes usando 3 μ L de la ligación, siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 4.2.1. En este caso se sembró 250 μ L de la suspensión de bacterias transformadas en placas LB/kanamicina (siempre que se utiliza kanamicina es con una concentración final de 50 μ g/mL) y se dejaron incubando a 37 °C por 16 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se eligieron 10 colonias transformantes que se inocularon en 10 tubos con 3 mL LB/kanamicina e incubaron a 37 °C bajo agitación de 200 rpm durante 16 h. Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 6800 g por 2 min y se hizo una extracción de ADN plasmídico utilizando un kit comercial (GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Scientific). Asimismo, se cuantificó los plásmidos y se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, sembrando 1 μ L de cada plásmido diluido en buffer de carga 1x final. Los cuatro clones con mayor pureza se enviaron a secuenciar (Macrogen) utilizando los cebadores F_pIRL58 (sitio de unión 3342 a 3361) y R_pIRL58 (sitio de unión 3950 a 3969) específicos para el plásmido pIRL58, diseñados en esta tesis (tabla 2). Para no perder los diez clones seleccionados, estos se expandieron también en medio sólido y se conservaron a 4 °C hasta su verificación. Una vez obtenidas las secuencias de los plásmidos se alinearon y analizaron junto a la secuencia del producto esperado, utilizando el programa JalView (Waterhouse et al., 2009). En paralelo se puso a punto una PCR para verificar la presencia de clones positivos, es decir que presentaban la construcción deseada. Para ello se diseñó un cebador interno adicional R_pIRL58_sgRNA (sitio de unión 3841 a 3869) que junto al F_pIRL58 (Tabla 2) permite verificar si la construcción es la correcta, en cuyo caso se debe observar un amplicón de 524 bp mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 2: Oligonucleótidos y cebadores sintetizados para los diversos ensayos

Nombre	Secuencia (5'-3')
F_PtpA_sgRNA	GGGAGATCTGCCGGTCGCCAATGGC
R_PtpA_sgRNA	AAACGCCATTGGCGACCGGCAGATC
F_pIRL58	TGCCTCGGTGAGTTTTCTCC
R_pIRL58	ACCTCTSGGGTCCCAAGTC
R_pIRL58_sgRNA	AAAAGGCCATTGGCGACCG

4.2.3 Obtención de cultivos de *Mb* BCG y *Msmeg*

La manipulación de *Mb* BCG y *Msmeg* se realizó en cabina de flujo vertical con nivel de bioseguridad II (Labconco). *Mb* BCG se cultivó en medio 7H9 Middlebrook líquido o agar, suplementado con 10% albúmina–dextrosa–cloruro de sodio (ADS), 0.5% glicerol como fuente de carbono principal, 2,5% Tween 80 20% (que llamaremos caldo 7H9 completo) y en agar también se suplementó con verde malaquita 0,2 ng/mL. En casos particulares, donde los ensayos lo requerían, se creció en el medio mínimo Sauton. Los cultivos de *Mb* BCG se realizaron a partir del *stock* disponible en el laboratorio desarrollado previamente y una placa proporcionada por Marina Forrellad (CONICET). Tanto los cultivos en medio sólido como líquido se incubaron en cámaras húmedas durante tres a cuatro semanas, generalmente pasando por medio sólido y de allí inoculando los cultivos líquidos. Una vez pasados los tiempos de incubación, se buscó en las placas la presencia de colonias pequeñas, opacas y planas, de un color crema blanquecino. Por otra parte, *Msmeg* (cepa mc2 155) también se cultivó en 7H9, con los mismos suplementos que *Mb* BCG, y en medio LB líquido o agar. Para evaluar la pureza de los cultivos líquidos y en agar se realizaron tinciones con el método Ziehl-Neelsen (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000), típico para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes, con pequeñas modificaciones. Si se partió de cultivo en placa se picó una colonia y resuspendió en 10 μ L de PBS estéril, en cambio si se partió de cultivos líquidos se centrifugó 1 mL a 6000 g durante 3 min, descartando el sobrenadante y agregando 1 mL de PBS estéril, para centrifugar nuevamente a 6000 g durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 20-200 μ L de PBS. Se colocaron 10 μ L de las suspensiones en láminas estériles, secando y fijando las suspensiones en mechero. Una vez frías las láminas se colocaron en un recipiente con la solución de fucsina y se calentaron en estufa a 65 °C durante 15 minutos. Se dejan enfriar las láminas, se hace un lavado suave con agua y se pasa solución decolorante hasta que deje de salir rosado. Se lavó nuevamente con agua y se incubó 1 min con la solución de azul de metileno, lavándola con agua. Las láminas se dejaron secar y se visualizaron en microscopio con aumento 100X.

4.2.4. Electroporación de *Mb* BCG con los plásmidos de interés

La transformación de *Mb* BCG con pIRL58 y pIRL19 se realizó según el protocolo descrito por Parish y Kumar (Parish & Kumar, 2021). Previo a la transformación se prepararon células de *Mb* BCG electrocompetentes. Para ello se inocularon 50 mL de caldo 7H9 10% ADS/2.5% Tween 80 20% con 5 mL de un cultivo puro de *Mb* BCG, que se incubó durante 7 días a 37 °C en agitación. En el 6to día se agregaron 5 mL de glicina 2 M. Luego de la incubación se lavó el cultivo tres veces a temperatura ambiente con glicerol 10% (precalentado a 37 °C), reduciendo el volumen de glicerol progresivamente, es decir un primer lavado con 10 mL, luego 5,0 mL y finalmente 2,5 mL, centrifugando a 3000 g durante 3 min entre cada lavado. A continuación se centrifugaron las células y el pellet de células se resuspendió en 1,5 mL de glicerol 10%. Se hicieron alícuotas de 200 μ L para ser usadas en

el momento. En paralelo, se preparó una mezcla de los dos plásmidos con proporción aproximadamente 2:1 microgramos de plásmido pIRL58 (proveniente del clon 2) respecto a pIRL19, agregando entonces a cada alícuota de micobacterias 0,3 µg de pIRL58 (2 µL) y 0,16 µg de pIRL19 (3 µL), en un volumen final de 5 µL totales. Se transfirieron las mezclas de electroporación a cubetas de 0,2 cm y se sometieron a un único pulso de 2,5 kV, 25 µF y una resistencia de 1000 Ω. Inmediatamente después se diluyeron en 10 mL de medio 7H9 completo, y se incubó a 37 °C durante 16 h. Los cultivos se centrifugaron a 3000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y se realizaron diluciones 1/10, 1/10² y 1/10³ en caldo 7H9 completo. Se inocularon por triplicado gotas de 9 µL de cada dilución y el pellet sin diluir, en placas de 7H9 agar/kanamicina/verde malaquita/ADS. Como control de la electroporación se inocularon también por triplicado las tres diluciones en una placa sin kanamicina. Debido a que pIRL58 no tiene un promotor compatible para micobacterias, la única forma en la que se expresa la resistencia a kanamicina es cuando éste se inserta dentro del genoma y utilice el promotor micobacteriano presente en el sitio, asegurando que las colonias obtenidas sean mutantes. Posteriormente, se calculó la eficiencia de transformación en las diluciones con colonias independientes y distinguibles entre sí y se visualizó la pureza del cultivo previo y después de la transformación por tinción ZN.

4.2.5. Electroporación de *Msmeg* con los plásmidos de interés

Para la preparación de las células electrocompetentes y la electroporación también se utilizó el protocolo de Parish y Kumar modificando los volúmenes a una menor escala (Parish & Kumar, 2021). Para preparar células de *Msmeg* electrocompetentes se inocularon 50 mL de caldo 7H9 ADS/Tween con 500 µL de un cultivo puro de *Msmeg*, incubando a 37 °C durante 24 h, para luego incubar por 1,5 h en hielo. Las bacterias se recuperaron centrifugando a 3000 g por 10 min, se lavó el pellet tres veces con glicerol al 10% frío, reduciendo el volumen de glicerol progresivamente, es decir un primer lavado con 10 mL, luego 5 mL y finalmente 2,5 mL. El pellet se resuspendió en 2 mL de glicerol 10% y se hicieron alícuotas de 200 µL para ser usadas en el momento y guardar a -80 °C. Se preparó una mezcla de los dos plásmidos al igual que cuando se trabajó con BCG, y se agregaron 5 µL de la mezcla a cada alícuota de bacterias. Se dejaron reposar 10 min en hielo y se transfirieron las células con los plásmidos a cubetas de 0,2 cm (enfriadas en hielo previamente) y se sometieron a un único pulso de 2,5 kV, 25 µF y una resistencia de 1000 Ω. Se volvieron a colocar las cubetas en hielo por 10 min, e inmediatamente después se diluyeron en 10 mL de medio 7H9 completo, incubando a 37 °C durante 2 h. Los cultivos se centrifugaron a 3000 g por 10 min y previo a su sembrado en placa fueron diluidos 1/10 y 1/10² en caldo 7H9 completo. En placas de LB agar/Tween/kanamicina se inocularon por triplicado gotas de 9 µL de cada dilución y del pellet sin diluir. Como control de la electroporación se inocularon también por triplicado el pellet sin diluir y las diluciones 1/10, 1/10² y 1/10³ en una placa sin kanamicina. Se calculó la eficiencia de transformación a partir del conteo de las placas: colonias independientes y distinguibles entre sí y se visualizó la pureza del cultivo previo y después de la transformación, por tinción ZN.

4.2.6. Inducción del sistema CRISPR-dCas9i en *Msmeg*

Para evaluar la inducción del sistema CRISPR-dCas9i, se eligieron tres colonias transformantes de la electroporación de *Msmeg*, que se expandieron en placas LB agar/Tween/kanamicina, para luego inocular 5 mL de medio LB/kanamicina, incubando 48 h a 37 °C en agitación. La pureza de las expansiones se verificó realizando una tinción ZN. De los precultivos se tomaron 2 mL para inocular 30 mL de caldo Sauton con y sin el inductor ATc (100 ng/mL) y se dejaron incubando a 37 °C, 100 rpm durante 48 h alcanzando una DO entre 0,743 y 1,038, representando la fase exponencial de crecimiento.

4.3. Evaluación de la presencia de PtpA en los cultivos de *Msmeg*

Para evaluar el éxito del silenciamiento del gen que codifica para PtpA se analizó si la proteína PtpA se detectaba en los extractos proteicos provenientes de los cultivos inducidos con ATc. Se generaron extractos proteicos totales a partir de los pellet de los cultivos (que llamaremos de ahora en más extractos celulares) y además extractos a partir de los sobrenadantes de medios de cultivos (que llamaremos sobrenadantes, SN) para evaluar también la secreción de PtpA en *Msmeg*.

4.3.1. Preparación de extractos

Para preparar los extractos se tomaron 2 mL de cada cultivo obtenido tal cual se describe en 4.2.6 para medir DO₆₀₀ y el resto se centrifugó a 3000 rpm durante 6 min. Se guardaron 25 mL de SN de cada cultivo en alícuotas de 5 mL a -80 °C. Para obtener los extractos celulares totales se tomaron los pellet y se lavaron tres veces con PBS, centrifugando a 6000 g por 3 min luego de cada lavado. Los pellets se resuspendieron en 100 µL de Buffer de Lisis (BL) y se guardaron a -20 °C. Luego se descongelaron, vortexearon y centrifugaron a 4 °C a 12000 g durante 30 min, conservando los SN a -20 °C. Por otra parte, los extractos de SN se obtuvieron a partir de las muestras de SN de cultivo congeladas. Éstas se liofilizaron en el Institut Pasteur de Montevideo. Debido a su composición no se pudo liofilizarlas completamente pero se las pudo concentrar a un volumen final de 2 mL, agregando posteriormente 500 µL de Buffer lisis. Se guardaron a -20 °C y luego se descongelaron, vortexearon y centrifugaron a 4 °C a 12000 g durante 30 min, conservando los SN. Asimismo, para utilizar como controles en diversos ensayos, se liofilizaron 25 mL de medio Sauton y 7H9 de forma exitosa, que luego se resuspendieron en 300 µL de BL y se guardaron a -20 °C. En resumen, se obtuvieron extractos celulares y SN de tres clones transformantes, en condiciones con y sin inducción del sistema CRISPR-dCas9i.

4.3.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración proteica de las muestras obtenidas en 4.3.1 se utilizó el Kit Pierce™ BCA Protein Assays (A65453, Thermo Scientific). Se realizó una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones del estándar BSA (0,05 a 1 mg), sembradas por triplicado y a las que se le midió su absorbancia a 562 nm, al igual que las muestras problema. La curva se ajustó a una ecuación de primer orden y se utilizó para la determinación de la concentración de las muestras problema. Una muestra del medio de

cultivo Sauton se utilizó como blanco en la cuantificación de los extractos de SN. En caso de ser necesario se diluyeron las muestras en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

4.3.3. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE siguiendo el protocolo convencional (Laemmli, 1970), utilizando un gel concentrador al 4% (p/v) y un gel separador de 12% de acrilamida dependiendo de la muestra. Las muestras se diluyeron con buffer muestra 6X (Tris 0.35 M, SDS 10%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0.02%) hasta una concentración 1x de dicho buffer, se les agregó DTT a una concentración final 50-100 mM, se calentaron 5 min a 95°C, y se dejaron enfriar previo a ser sembradas en los pocillos del gel de electroforesis. La misma se realizó a 75 V durante el pasaje por el gel concentrador, y luego a 180 V durante el pasaje por el gel separador, en un buffer Tris glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3). El peso molecular de las muestras se estimó por comparación con estándares de PM. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal, o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por electrotransferencia (ver sección 4.3.4) dependiendo del experimento. Para realizar la tinción de Coomassie se comenzó incubando el gel con una solución fijadora 1 h a 4 °C. Luego se quitó la solución fijadora y se agregó la solución de tinción de Coomassie coloidal, incubando en agitación a temperatura ambiente durante 24-72 h. Finalmente se decoloró el gel con agua destilada en agitación.

4.3.4. Dot Blot y Western Blot

Para los ensayos de *Dot Blot* (DB) se sembraron por triplicado gotas conteniendo 10 µg de extracto celular o 150 µg de extracto SN de los tres clones en membranas de nitrocelulosa (2 gotas entre los 2 y 3,5 µL para extracto celular y 3 gotas entre los 2,5 y 3,4 µL para extracto SN). Para realizar una curva de calibración se utilizó como estándar PtpA recombinante producida por el grupo, que se sembró en cantidades de 1 a 10 ng (gotas de 3 µL), también por triplicado. Una vez secas las membranas, se dejaron bloqueando con Membrane Blocking Solution (000105, Life Technologies) durante toda la noche a 4 °C. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo anti-PtpA (Ac. desarrollado por el grupo, policlonal en conejo), diluído 1/2000 en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM conteniendo Tween-20 al 0.1% (TBS-T) durante toda la noche a 4°C y agitación. Se lavó la membrana tres veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo (#A4416, Sigma) conjugado a peroxidasa (HRP) diluido 1/50000 en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, luego de tres lavados con TBS-T se procedió al revelado. Para ello se utilizó el kit Pierce ECL *Western Blotting Substrate* (32106, Thermo Scientific), mezclando partes iguales de las soluciones A y B, e incubando la membrana 1 min con el sustrato. Luego se expuso la membrana en el equipo de quimioluminiscencia GBOX Chemi System (SynGene), haciendo exposiciones en general de entre 1 y 60 min según la muestra.

Para los ensayos de *Western Blot* (WB), las muestras separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific) utilizando el sistema de

transferencia húmeda de BioRad, en buffer Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, etanol 20%. Las proteínas se transfirieron durante 1 h a 100 V. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución bloqueante comercial (el mismo que en DB) durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó la membrana con TBS-T y se incubó con el anticuerpo anti-PtpA diluido 1/2000 en TBS-T toda la noche a 4 °C. Luego de 4 lavados de 5 min cada uno con TBS-T se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-conejo, diluído 1/50000 en TBS-T. Luego de tres lavados con TBS-T se procedió a revelar y exponer las membranas de la misma forma descrita anteriormente.

Todos los ensayos estadísticos fueron realizados empleando el software GraphPad Prism (<http://www.graphpad.com>). Los datos obtenidos se analizaron mediante el *test* estadístico ANOVA de dos vías y la prueba Tukey.

5. Resultados y Discusión

5.1. Se obtuvieron pIRL58 y pIRL19 necesarios para CRISPR-dCas9i

Para aplicar la estrategia de CRISPR-dCas9i en una primera etapa se realizó la expansión en *E. coli* de los plásmidos pIRL58 y pIRL19 necesarios para generar la cepa micobacteriana mutante en el gen que codifica para PtpA. Recordemos que el plásmido pIRL58 contiene la secuencia codificante de la proteína dCas9_{sth}, el sgRNA y los genes que confieren resistencia a kanamicina; y se integrará en el genoma micobacteriano luego de la electroporación. El plásmido pIRL19 contiene la secuencia codificante de una proteína L5 integrasa, los genes que confieren resistencia a ampicilina, y es necesario para que pIRL58 se integre al genoma. Los plásmidos una vez purificados presentaron una concentración de 85,2 ng/μL y 53,8 ng/μL para pIRL58 y pIRL19, respectivamente. Con respecto a la pureza (relación A260/280), la del plásmido pIRL19 fué de 1,7, levemente menor al valor considerado como aceptable (1,8), y la del plásmido pIRL58 fué adecuada (1,8). Además, se evaluó la pureza y conformación mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 8). En el carril 1 se muestra el pIRL19 purificado, observándose una única banda, que teniendo en cuenta el tamaño del plásmido (4204 pb) y el marcador de pb, se corresponde con una conformación superenrollada. En el carril 3 se muestra el plásmido pIRL58 purificado, observándose dos bandas principales, que si tenemos en cuenta el tamaño del pIRL58 (7670 pb) y el marcador de peso molecular, se corresponden con la conformación circular y lineal del plásmido. Si bien las cantidades sembradas de cada plásmido purificado fué baja, para ninguna de las dos preparaciones se observan otras bandas que indiquen degradación o presencia de otros ácidos nucleicos.

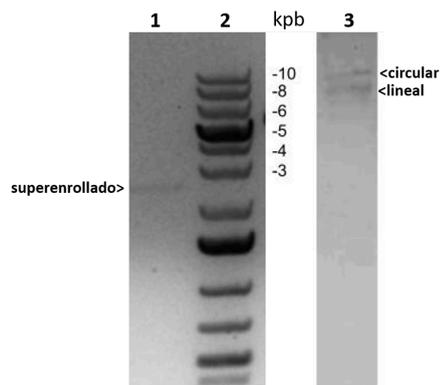


Figura 8: Evaluación de la calidad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa. Carril 1, pIRL19 purificado, carril 2, el marcador GeneRuler 1kb (SM0311, Thermo) y carril 3, pIRL58 purificado.

5.2. Se generó el fragmento ADN que dará lugar al crRNA y se introdujo en pIRL58

Para la obtención del fragmento de ADN que dará lugar al crRNA se diseñaron dos oligos como se detalla en la metodología. Para ello se buscó en el gen *ptpA* de *Mtb* (su secuencia nucleotídica idéntica a la de *Mb BCG*) la secuencia PAM “NNAGAAG” reconocida por la proteína dCas9, siendo la secuencia seleccionada los 20 nucleótidos *upstream* del PAM (Figura 9 A). A dicha secuencia se le agregó nucleótidos extra, en el extremo 5’, que permitirán generar extremos cohesivos (Figura 9 B), y que serán el sitio de unión con pIRL58, una vez digerido con la enzima de restricción BsmBI.

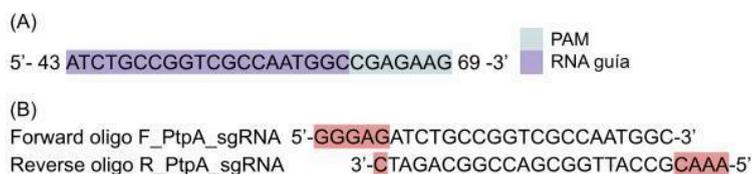


Figura 9: (A) Fragmento de ADN en el gen *ptpA* elegido para ser el blanco del complejo dCas9-sgRNA. En violeta se muestra la región a la que se hibrida el crRNA, mientras que en celeste se muestra la secuencia de reconocimiento PAM, que interactúa con dCas9. **(B)** Esquema de la hibridación de los oligos sintetizados que darán lugar al crRNA. En rosado se resaltan los nucleótidos extra que permitirán generar extremos cohesivos y serán el punto de unión al plásmido pIRL58 luego de la digestión de éste con BsmBI.

Una vez realizada la hibridación de los oligos sintetizados se insertó este ADN en el plásmido pIRL58. Para ello se realizó en primer lugar una digestión de pIRL58 con la enzima BsmBI. En la Figura 10 se observa la electroforesis en gel de agarosa mostrando el éxito de la digestión. En el carril 1 se observa el pIRL58 sin digerir y en el carril 2 y 3 el pIRL58 tratado con BsmBI, observándose el éxito de la digestión al detectarse únicamente la conformación lineal del plásmido en los carriles 2 y 3, concordante con el hecho que este cuenta con un único sitio de corte para dicha enzima. En la figura se muestra también un control adicional que muestra la actividad de la enzima BsmBI utilizando otro plásmido como sustrato (carril 5 sin digerir y carril 6 digerido).

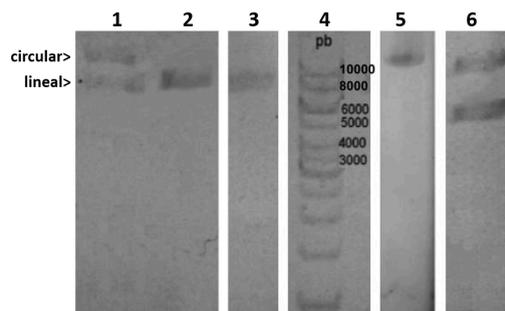


Figura 10: Evaluación de la digestión de pIRL58. En el carril 1 se observa al pIRL58 sin digerir con la enzima BsmBI. En el carril 2 y 3 se sembró el producto de digestión de pIRL58 con BsmBI. En el carril 4 se sembró el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (SM0311, Thermo). En los carriles 5 y 6 se agregó un control adicional de la actividad de BsmBI evaluando la digestión de otro plásmido (Pet-Duet). Tanto en la digestión con BsmBI del pIRL58 (un sitio de corte) como del Pet-Duet (un sitio de corte) se observó un fragmento del tamaño esperado.

El plásmido pIRL58 digerido se purificó y posteriormente se ligó con T4 ligasa al fragmento de oligos de ADN hibridado descrito en la Figura 9 B. A continuación, se expandió la construcción obtenida mediante transformación de células *E. coli* DH5 α y se seleccionaron diez colonias a partir de las cuales se realizó la purificación de los plásmidos y su análisis por electroforesis en gel de agarosa, teniendo en cuenta el tamaño del plásmido esperado (7668 pb). La concentración de estas diez muestras se encontró entre 82 y 121 ng/ μ L y la pureza (A_{260}/A_{280}) entre 1,70 y 1,78. Con respecto al análisis por electroforesis (Anexo, Figura A), se observó que todas las muestras de pIRL58 purificado presentaron una conformación superenrollada. De estas muestras, teniendo en cuenta tanto la relación $A_{260}/280$ como el perfil de la muestra en la electroforesis, se seleccionaron las cuatro de mayor pureza, para ser analizadas por secuenciación en MacroGen. La Figura 11 muestra el alineamiento de las secuencias de estos clones con la secuencia del plásmido original sin inserto (secuencia 10) y con la secuencia teórica del plásmido con inserto (secuencia 5). En todos los casos a modo de simplificar se muestra sólo la región de interés de cada secuencia. Como se observa, la secuencia de los clones 2 y 8 son iguales a la del plásmido teórico con inserto, mientras que los clones 3 y 9 poseen la misma secuencia que el plásmido original, no habiendo incorporado el inserto.

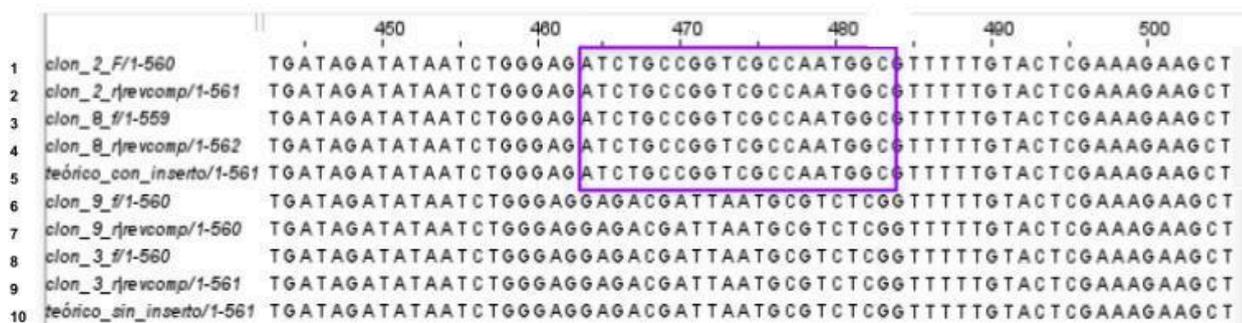


Figura 11: Alineamiento de las secuencias parciales de los plásmidos purificados. Se representan las secuencias forward y reverse (reverso complementario) correspondientes a los 4 plásmidos secuenciados. La

secuencia 5 representa la secuencia teórica con el inserto deseado y la secuencia 10 corresponde a la secuencia parcial del plásmido sin el inserto. En el recuadro violeta se resalta la secuencia con inserto.

En paralelo, con cebadores diseñados en esta tesis, se evaluó la presencia del inserto mediante PCR, lo que permitió detectar los clones portadores de plásmidos recombinantes (Figura 12). Esta estrategia, ayudará a que en el futuro se envíen a secuenciar únicamente aquellos clones que ya sabemos contienen el inserto. En este caso, en acuerdo con el resultado de la secuenciación, se observó una banda de aproximadamente 600 pb, coincidente con el largo del amplicón esperado (628 pb), únicamente para los clones 2 y 8 (carril 1 y 3).

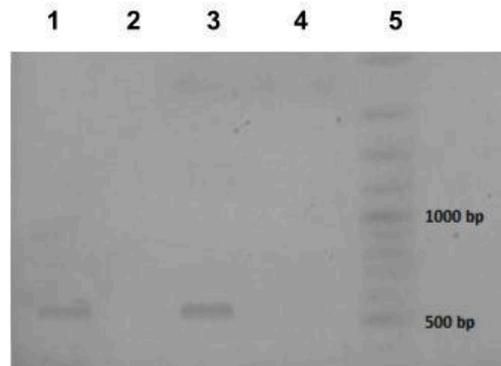


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa mostrando el resultado de la PCR que permite detectar los clones recombinantes. En los carriles 1 y 3 se sembraron los productos de PCR obtenidos al utilizar como molde los plásmidos purificados correspondientes a los clones 2 y 8, y en los carriles 2 y 4 los correspondientes a los clones 3 y 9. En el carril 5 se sembró el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (SM0311, Thermo).

5.3. Se logró cultivar y realizar una identificación fenotípica de *Mb* BCG y *Msmeg*

Como ya se mencionó previamente, *Mb* BCG es una micobacteria de crecimiento lento, su cultivo puede tardar hasta cuatro semanas en crecer y por ende se encuentra expuesto a mayor riesgo de contaminación por otros microorganismos. En el desarrollo de esta tesina se encontraron varios problemas con microorganismos contaminantes de crecimiento lento (posiblemente hongos), los cuales en las etapas iniciales de crecimiento fué difícil diferenciarlos de *Mb* BCG, y sólo fue posible diferenciarlos luego de la tinción con azul de metileno, realizada como etapa final de la tinción ZN. En las imágenes de la Figura 13, se observa que, luego de la coloración con ZN, la mayoría de las bacterias son teñidas de fucsia y presentan el fenotipo propio de las micobacterias, por lo cuál los cultivos obtenidos se encontraban enriquecidos en *Mb* BCG. Sin embargo, tanto en los cultivos en medio sólido (Figura 13 A) como líquido (Figura 13 B) se observó la presencia de microorganismos contaminantes teñidos de azul, de forma ovalada que pueden encontrarse tanto rodeando cúmulos de *Mb* BCG como dispersos a lo largo de las láminas. Hasta este punto todos los cultivos habían sido inoculados a partir del mismo lote de semillas (disponibles en el laboratorio), por lo que nos cuestionamos la integridad de éstas semillas. El resultado mostró que algunas de ellas ya estaban contaminadas. Se probaron, sin éxito, diferentes alternativas con el fin de eliminar la contaminación, desde cantidades variables de

verde malaquita, hasta el agregado a los medios de cultivo de cicloheximida que tiene actividad antifúngica.

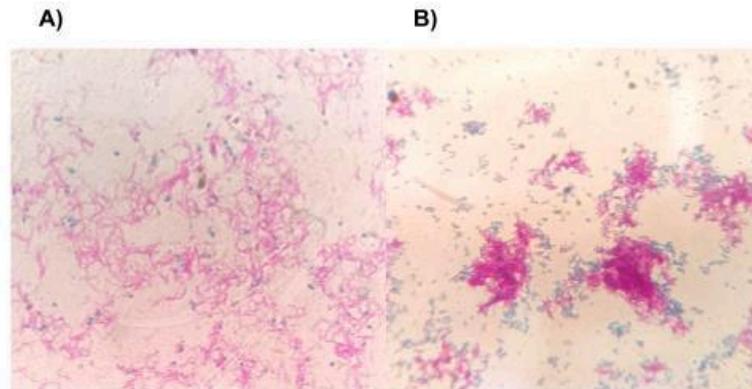


Figura 13: Imágenes representativas de las bacterias observadas luego de la tinción Ziehl-Neelsen y Azul de metileno. En este caso se muestra el resultado de la tinción de un cultivo realizado a partir de una de las semillas de *Mb* BCG, en medio sólido (A) y medio líquido (B).

Frente a esta situación, la Dra. Marina Forrellad del laboratorio del INTA-Castelar-Argentina nos proporcionó un nuevo stock de *Mb* BCG, logrando cultivos puros en medio líquido (Figura 14 A). y de esta manera se comenzó con el proceso de preparación de células electrocompetentes. Sin embargo, durante este proceso tanto los cultivos líquidos para electroporación como los destinados a la realización de semillas se contaminaron nuevamente. Vale la pena resaltar que la manipulación necesaria para producir las electrocompetentes aumenta significativamente las chances de contaminación, lo cual se suma a las dificultades para obtener cultivos puros mencionadas previamente. Además, el hecho que trabajamos en un laboratorio donde se trabaja desde hace años con hongos, dificulta aún más el trabajo con esta bacteria de crecimiento lento.

Esto hizo que nos encontráramos con un dilema: podíamos seguir intentando conseguir cultivos puros de *Mb* BCG teniendo en cuenta los cuidados adicionales que la Dra. Gabriela Gago del IBR-Rosario de Argentina nos sugirió (autoclavar dos veces los medios y usar tips con filtro para evitar contaminación); sin embargo, esto requería como mínimo cuatro semanas de cultivo en placa, cuatro semanas más en cultivo líquido, una semana de preparación de electrocompetentes, cuatro semanas de cultivo de la cepa electroporada y finalmente una semana para la inducción del sistema CRISPR-dCas9i. Por lo tanto, estaríamos hablando de catorce semanas más de manipulación solamente para obtener los extractos proteicos en *Mb* BCG, más la realización de los ensayos de DB y WB y su posterior análisis. Al no disponer del tiempo necesario para comenzar desde cero con *Mb* BCG, buscamos alternativas en micobacterias de crecimiento rápido (2-4 días), que posean el gen que codifica para PtpA, en la que se pueda probar la técnica, en tiempos más cortos, y en el futuro aplicar lo aprendido en *Mb* BCG. En este contexto se puso en cultivo *Msmeg* (cepa mc2 155), partiendo de *stock* disponible en el laboratorio, verificándose el fenotipo

esperado tanto en el tiempo de crecimiento como aspecto de las bacterias, que se muestra a modo de ejemplo en la Figura 14.

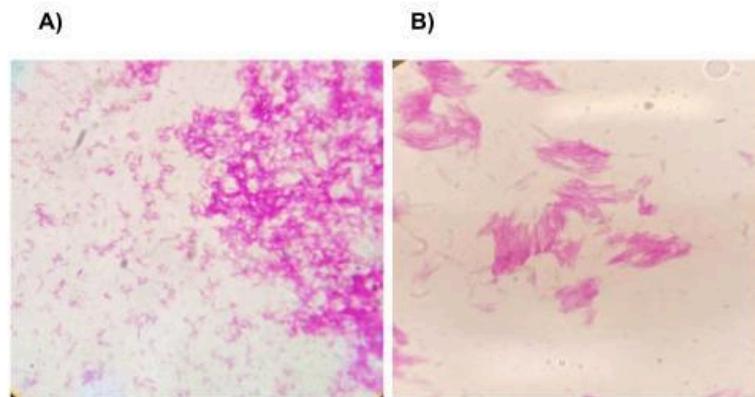


Figura 14: Imágenes representativas de las bacterias observadas luego de la tinción Ziehl-Neelsen. En este caso se muestra el resultado de la tinción de un cultivo realizado a partir de un nuevo stock de *Mb* BCG en medio líquido (A) y de un cultivo de *Msmeg* en medio sólido (B).

Msmeg cuenta con una secuencia aminoacídica idéntica a la PtpA de *Mb* BCG y *Mtb* y con pocas diferencias a nivel nucleotídico en la región de interés (Figura 15), lo que nos motivó a que decidamos aplicar la estrategia CRISPR-dCas9i en esta bacteria.

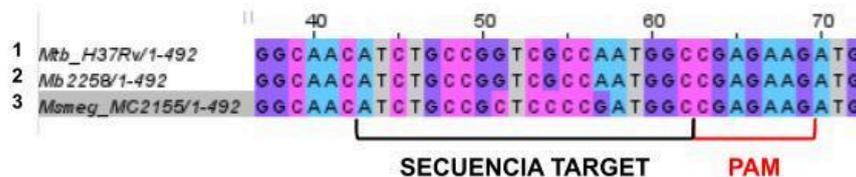


Figura 15: Alineamiento de las secuencias parciales del gen codificante para PtpA en *Mtb*, *Mb* BCG y *Msmeg*. Las secuencias 1, 2 y 3 pertenecen a *ptpA* de *Mtb* y *Mb* BCG y *Msmeg*, respectivamente.

5.4. Se logró introducir los plásmidos pIRL58 y pIRL19 en *Msmeg*

La introducción de los plásmidos pIRL58 y pIRL19 mediante electroporación se realizó con éxito. Se logró observar el crecimiento de clones bacterianos de *Msmeg* en medio sólido seleccionados en base a su resistencia a la kanamicina (Figura 16 A). Cabe señalar que, debido a que pIRL58 no tiene un promotor compatible para micobacterias, la única forma en la que se expresa la resistencia a kanamicina es cuando éste plásmido se inserta dentro del genoma, lo que asegura que las colonias obtenidas son colonias en las que pIRL58 se introdujo en el genoma micobacteriano por recombinación específica de sitio por la integrasa L5, necesario para la aplicación de CRISPR-dCas9i. Se calculó la eficiencia de la transformación a partir del conteo de las colonias observadas en la placa, siendo esta

de 8×10^3 ufc/ng de pIRL58. Además, se confirmó la pureza del cultivo antes y después de la transformación mediante tinción ZN (Figura 16 B).

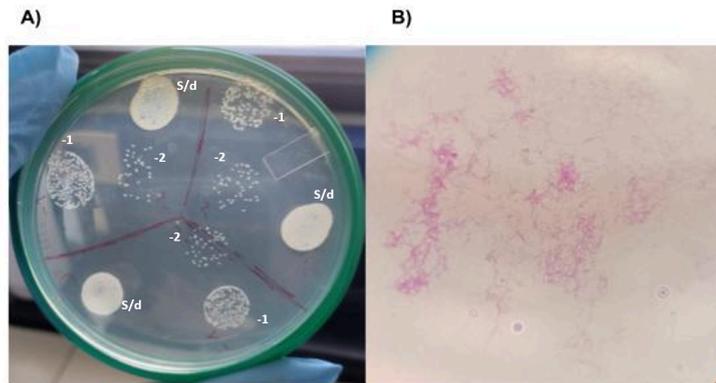


Figura 16: (A) Imagen de la placa LB agar/kanamicina mostrando el crecimiento bacteriano luego de la electroporación. Se sembraron por triplicado gotas de 9 μ L del producto sin diluir, y de las diluciones 1/10 (-1) y 1/100 (-2). (B) Tinción Ziehl-Neelsen de las colonias de la placa mostrada en A).

Por otra parte, con el afán de seguir intentado con *Mb* BCG, se realizó la electroporación de *Mb* BCG electrocompetentes, esperando que al seleccionar los clones mediante el crecimiento en presencia en kanamicina, lograríamos eliminar la contaminación. Al cabo de 3-4 semanas se obtuvieron colonias en el medio 7H9 agar/ADS/verde malaquita/kanamicina, pero la tinción de éstas revelaron la presencia de algunas bacterias con una forma levemente ovalada, diferente de lo usual y de color azul, por lo que se decidió no continuar con el ensayo de inducción del sistema CRISPR en *Mb* BCG, hasta no mejorar las condiciones de cultivo de dicha cepa en el laboratorio.

5.5. Se indujo con éxito el sistema CRISPR-dCas9i en *Msmeg*

Se seleccionaron tres de los clones transformantes de *Msmeg* con los que se realizó un cultivo en ausencia y presencia del inductor ATc, obteniéndose a partir de estas muestras de extractos celulares totales y muestras de SN de los cultivos concentrados mediante liofilización, como se describió en la metodología. Cabe señalar que el medio de cultivo sin bacterias (usado como control negativo) se logró liofilizar completamente, pero esto no ocurrió para los SN de los cultivos de *Msmeg*, los cuales se concentraron hasta 2 mL (12.5 veces). Consideramos que esto se puede deber a la presencia de metabolitos bacterianos (lípidos u otros) que dificultan la deshidratación total de la muestra. La concentración de proteínas, determinada utilizando el método de BCA, fue en promedio de $1,7 \pm 0,1$ mg/mL para los extractos celulares obtenidos a partir de los cultivos sin inducir, y de $1,6 \pm 0,3$ mg/mL para los cultivos inducidos. En el caso de los extractos de SN se obtuvo un promedio de $20,0 \pm 1,5$ mg/mL de proteínas en la condición sin inducir y $17,6 \pm 1,3$ en la inducida. En la tabla A del Anexo se muestran los valores obtenidos para cada una de las muestras.

El éxito del silenciamiento del gen que codifica para PtpA se evaluó mediante inmunodetección de la proteína PtpA en las muestras obtenidas de los tres cultivos realizados con y sin inducción con ATc. En los ensayos de DB se sembraron por triplicado 10 µg de los extractos celulares y 150 µg del SN provenientes de cada cultivo (Figura C Anexo). La cantidad de PtpA en cada muestra problema (ng de PtpA) se determinó gracias a una curva de calibración realizada utilizando PtpA recombinante (Figura B Anexo). Posteriormente, los valores obtenidos se normalizaron por µg de proteína de cada muestra y se resumen en la tabla mostrada en la Figura 17 A.

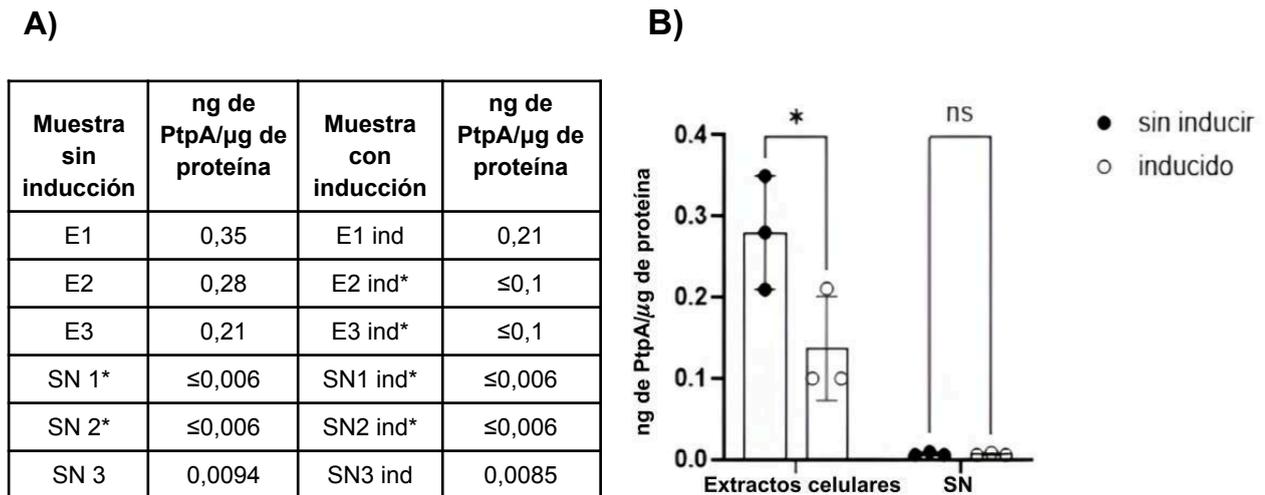


Figura 17: PtpA detectada en los extractos celulares y en los sobrenadantes de cultivo de *Msmeg*, provenientes de los ensayos de CRISPR-dCas9i para el gen de PtpA. (A) Tabla mostrando los ng de PtpA/µg de proteína de los extractos celulares y SN provenientes de tres cultivos independientes sin inducción (E1, E2, E3, SN1, SN2, SN3) y con inducción con ATc (E1 ind, E2 ind, E3 ind, SN1 ind, SN2 ind, SN3 ind). Se resaltan con un asterisco las muestras en las que los ng de PtpA detectados fueron menores al límite inferior de la curva de calibración realizada con la PtpA recombinante (ver Anexo Figura B). **(B)** Gráfico mostrando la inducción del silenciamiento del gen que codifica para PtpA de *Msmeg* mediante CRISPR-dCas9i en los extractos celulares. Se realizó un análisis ANOVA de dos vías y la prueba Tukey, las diferencias significativas están indicadas con asteriscos (* $p \leq 0.05$), en caso de no haber diferencias significativas se indican con “ns”.

Como se observa en la tabla y gráfico de la Figura 17, se detectó PtpA en todas las muestras, siendo en todos los casos mayor en los extractos celulares que en los SN. Por ejemplo, en las muestras correspondientes a los extractos sin inducir (E1, E2, E3) se detectó un promedio de $0,28 \pm 0,070$ ng de PtpA/µg proteína, representando un 28% de la proteína total del extracto. Sin embargo, en los SN se detectó ≤ 0.006 - 0.0094 ng de PtpA/µg proteína (un 0.94% de la proteína total del extracto), siendo este valor unas 30 veces menor que el observado en los extractos celulares. Por otro lado, en el gráfico de la Figura 17 B, se muestra que luego de la inducción con ATc se observó una disminución significativa del nivel de PtpA únicamente para los extractos celulares, siendo mayor para los cultivos 2 y 3, lo que sugiere hubo un silenciamiento de la expresión de dicha proteína. Asimismo, el gráfico

también muestra una clara diferencia en los niveles de PtpA entre los extractos celulares sin inducir y los SN, y estaría indicando que ésta proteína se encuentra principalmente dentro de *Msmeg*. Contrariamente, la PtpA de la cepa virulenta *Mtb H37Rv* se ha detectado en el SN y en el citosol de macrófagos infectados (Bach et al., 2008; Koul et al., 2000). En el caso de la PtpA de *Mb* BCG se ha detectado en el citosol de macrófagos infectados (Wang et al., 2017). Además, nuestro equipo mostró que en la cepa virulenta *Mtb* CDC1551 PtpA representa un 20% de la proteína del SN de cultivo realizado en medio Sauton.

El bajo nivel de PtpA detectado en el SN de *Msmeg* puede provenir de células muertas presentes en el cultivo o que se lisaron durante el procedimiento y no de su secreción por células vivas. En el único antecedente encontrado en relación a la secreción de PtpA por *Msmeg* se reportó que se detectó actividad fosfatasa en el SN de cultivo con medio Sauton (Chatterjee et al., 2015), evaluada mediante detección de la hidrólisis del sustrato artificial de fosfatasas para-nitrofenilfosfato (pNPP). Sin embargo este método es poco específico, dado que el pNPP es un sustrato hidrolizado por varios tipos de fosfatasas e incluso esterasas. Cabe señalar que *Mtb* y *Mb* BCG, secretan la fosfatasa PtpB (Koul et al., 2000; Wang et al., 2017) y la fosfatasa ácida SapM (Puri et al., 2013) además de PtpA. En *Msmeg* se encuentra un homólogo de la PtpB (MSMEG_0100), pero no de SapM, analizando la base de secuencias mycobrowser.epfl.ch.

Tal como se indicó en la introducción, si bien PtpA se ha detectado en el SN de los cultivos de bacterias patógenas de crecimiento lento como *Mtb*, no se conoce el sistema responsable de su secreción, habiéndose sugerido a los sistemas de secreción SecA2 o ESX/tipo VII (Sullivan et al., 2012). *Msmeg*, micobacteria de crecimiento rápido, posee sistemas de secreción de este tipo, por lo que habría que analizar con cuidado las diferencias entre estos sistemas de secreción y los promotores utilizados en *Msmeg* respecto a *Mtb* y *Mb* BCG que puedan explicar que la PtpA no esté siendo secretada (Cowley et al., 2002). Particularmente, *Mb* BCG codifica para todos los sistemas de secreción del tipo ESX menos ESX-1 y SecA2 en comparación con *Mtb* (Pym et al., 2002), mientras que *Msmeg* codifica los sistemas SecA2, ESX-1, ESX-3 y ESX-4 (Gey Van Pittius et al., 2001).

El sistema CRISPR-dCas9i ya se ha aplicado en diferentes micobacterias, donde se utiliza una dCas9, proveniente de *S. pyogenes* (Choudhary et al., 2015) y *S. thermophilus* (Rock et al., 2017), pero nunca con el objetivo de silenciar el gen que codifica para PtpA. Varios trabajos han utilizado *Msmeg* como modelo de estudio de *Mtb*, ya sea para el análisis del rol de ciertas proteínas y su interacción con diferentes antibióticos (Yuliani et al., 2024), o la identificación de posibles nuevos blancos para terapias anti-tuberculosas (McNeil et al., 2022; Silveiro et al., 2023). Los protocolos del sistema CRISPR-dCas9i utilizados previo a la inducción de este sistema no varían de forma significativa y generalmente las bacterias se crecen en Middlebrook 7H9 y no en Sauton como en esta tesina. Luego de la electroporación es donde radican las mayores diferencias entre protocolos, específicamente en la concentración de ATc y en el tiempo de inducción. En el trabajo de Yuliani y colaboradores (Yuliani et al., 2024) se mostró que es posible inducir el sistema CRISPR-dCas9i con concentraciones 200 veces menores que la usada en esta tesina pero

que, al mismo tiempo, las altas concentraciones de ATc no influyen en la viabilidad del cultivo micobacteriano. Asimismo, cuando se trabaja con cultivos de *Msmeg* se describen tiempos de incubación con ATc generalmente hasta 24 h (Choudhary et al., 2015; Rock et al., 2017; Silveiro et al., 2023), menores al utilizado en esta tesina (48 h). Esto pudo haber causado en nuestros ensayos una menor eficiencia de la inducción del silenciamiento debido a una disminución de la cantidad de inductor por célula, ya que la bacteria sigue dividiéndose. Esto podría explicar porque no se observó una reducción total de la expresión de PtpA. Además, otra posible causa del silenciamiento parcial podría ser que el complejo sgRNA-ADN no se encuentra hibridado de forma estable debido a los *mismatches* del sgRNA con respecto a la secuencia blanco en *Msmeg* (Figura 15). Es necesario tener presente que el silenciamiento inducido por el sistema es por un bloqueo del acceso de la ARN polimerasa al gen que codifica para PtpA, lo que inhibe la transcripción.

Como se describió arriba, en nuestro trabajo analizamos los resultados de la aplicación del sistema CRISPR-dCas9i por DB. Además, quisimos analizar estas muestras por WB, de manera de confirmar que la señal de PtpA detectada en el DB se corresponde con una proteína de la masa molecular de PtpA (20 kDa). Para ello se seleccionaron las muestras provenientes de los ensayos 2 y 3, donde se observó el mayor nivel de silenciamiento de PtpA en los extractos celulares. Sin embargo, al sembrar lo máximo que pudimos (25-30 µg de proteína total), no fuimos capaces de detectar la PtpA en ninguna de las muestras problemas. Esto se debió seguramente al bajo nivel de PtpA total (6-8 ng) en los µg de proteína sembrados en el gel SDS-PAGE. A modo de referencia, el Ac anti-PtpA, es capaz de detectar en un DB como mínimo 1 ng de PtpA recombinante. Sin embargo durante un WB, que implica más etapas que un DB, incluyendo la separación en el gel SDS-PAGE y la electrotransferencia a una membrana, claramente se puede perder proteína, lo que dificulta su detección. La cantidad de ng de PtpA presentes en la muestra sembrada en el SDS-PAGE, incluso se encontraba por debajo del límite de detección del Coomassie coloidal, por lo cuál tampoco fué posible ver a la PtpA directamente en el gel teñido con este colorante. Este resultado refuerza la necesidad futura de recuperar más cantidad de PtpA, que permita su inmunodetección en este tipo de muestra. Por último, como era de esperar, sí logramos detectar por WB la PtpA recombinante que se utilizó como control positivo, ya que se sembró 4,7 µg de esta proteína (Anexo, Figura D).

En la mayoría de los estudios publicados se evalúa el silenciamiento por RT-qPCR (Yuliani et al., 2024), pero hemos encontrado dos ocasiones en las cuales se realiza un WB para evaluar diversos aspectos del silenciamiento (Choudhary et al., 2015; Shaku et al., 2023). Sin embargo, en ninguno de ellos se especifican datos respecto a la cantidad de proteína sembrada y no se cuantifica el nivel de la proteína de interés respecto a la proteína total usando una curva de calibración como se realizó en esta tesina. En uno de los estudios, como otra aproximación se demostró el silenciamiento evaluando por WB y densitometría el cambio en nivel de expresión de las proteínas de interés con respecto a su nivel basal (Choudhary et al., 2015).

6. Conclusiones y Perspectivas

Se indujo con éxito el sistema CRISPR-dCas9i en *Msmeg* lográndose un silenciamiento parcial de la transcripción del gen que codifica para la fosfatasa PtpA. Para comprobar si es posible un silenciamiento completo en *Msmeg* se diseñará un nuevo sgRNA enteramente complementario a la misma región blanco estudiada y se evaluará el efecto del inductor ATc a diferentes concentraciones.

El silenciamiento de la PtpA se logró evaluar por DB, pero no por WB. Para poder solucionar este problema y así poder detectar a la PtpA entre las proteínas del extracto y verificar su tamaño molecular, una posibilidad será concentrar las muestras por precipitación o inmunopurificar la PtpA presente en los extractos utilizando una matriz con el Ac anti PtpA inmovilizado.

Asimismo, en este estudio se detectaron muy bajos niveles de PtpA de *Msmeg* en los SN de cultivo en medio Sauton (inducidos o no), lo que sugiere que PtpA no es secretada por *Msmeg* pero sí es producida por esta bacteria. Esto sugiere que PtpA posiblemente tenga blancos también dentro de la bacteria, como ha sido reportado para la cepa avirulenta *Mtb H37Ra* donde se ha identificado a la ATP sintasa micobacteriana como su blanco (Chatterjee et al., 2019).

Un ensayo complementario y posiblemente más informativo será realizar un análisis por espectrometría de masas de las proteínas de los extractos celulares y SN de cultivo obtenidos en esta tesina, de manera de poder evaluar la presencia de PtpA así como de otras fosfatasas micobacterianas en ambas fracciones.

En el caso del cultivo de *Mb* BCG se emplearán nuevas estrategias de esterilización de reactivos y medios (doble esterilización) y limpieza de superficies y materiales de trabajo para lograr mantener la esterilidad en las diferentes etapas de los ensayos, y lograr aplicar el sistema CRISPR-dCas9i.

En resumen, se logró poner en marcha el sistema CRISPR-dCas9i en nuestro laboratorio, que podrá ser aplicado al estudio del papel de PtpA en las micobacterias y durante la infección de macrófagos humanos.

7. Bibliografía

- Bach, H., Papavinasandaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. *Cell Host & Microbe*, 3(5), 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.008>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N. Y.)*, 315(5819), 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Belley, A., Alexander, D., Di Pietrantonio, T., Girard, M., Jones, J., Schurr, E., Liu, J., Sherman, D. R., & Behr, M.

- A. (2004). Impact of methoxymycolic acid production by *Mycobacterium bovis* BCG vaccines. *Infection and Immunity*, 72(5), 2803-2809. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2803-2809.2004>
- Bo, H., Moure, U. A. E., Yang, Y., Pan, J., Li, L., Wang, M., Ke, X., & Cui, H. (2023). *Mycobacterium tuberculosis*-macrophage interaction: Molecular updates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1062963. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1062963>
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 83(1-3), 91-97. [https://doi.org/10.1016/s1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/s1472-9792(02)00089-6)
- Camacho, L. R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., & Guilhot, C. (1999). Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology*, 34(2), 257-267. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01593.x>
- Cambier, C. J., Falkow, S., & Ramakrishnan, L. (2014). Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 159(7), 1497-1509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024>
- Chatterjee, A., Pandey, S., Dhamija, E., Jaiswal, S., Yabaji, S. M., & Srivastava, K. K. (2019). ATP synthase, an essential enzyme in growth and multiplication is modulated by protein tyrosine phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Biochimie*, 165, 156-160. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.023>
- Chatterjee, A., Pandey, S., Singh, P. K., Pathak, N. P., Rai, N., Ramachandran, R., Tripathi, R. P., & Srivastava, K. K. (2015). Biochemical and functional characterizations of tyrosine phosphatases from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria: Indication of phenyl cyclopropyl methyl-/phenyl butenyl azoles as tyrosine phosphatase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(18), 7539-7548. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6502-8>
- CHLAEP. (2024). *Situación de la Tuberculosis 2023*. https://chlaep.org.uy/wp-content/uploads/2024/04/Situacion-TB-2023-_-completo-1.pdf
- Choudhary, E., Thakur, P., Pareek, M., & Agarwal, N. (2015). Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nature Communications*, 6(1), 6267. <https://doi.org/10.1038/ncomms7267>
- Cowley, S. C., Babakaiff, R., & Av-Gay, Y. (2002). Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Research in Microbiology*, 153(4), 233-241. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(02\)01309-8](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(02)01309-8)
- de Wet, T. J., Winkler, K. R., Mhlanga, M., Mizrahi, V., & Warner, D. F. (2020). Arrayed CRISPRi and quantitative imaging describe the morphotypic landscape of essential mycobacterial genes. *eLife*, 9, e60083. <https://doi.org/10.7554/eLife.60083>

- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*(7340), 602-607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Ehrt, S., Guo, X. V., Hickey, C. M., Ryou, M., Monteleone, M., Riley, L. W., & Schnappinger, D. (2005). Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic Acids Research*, *33*(2), e21. <https://doi.org/10.1093/nar/gni013>
- Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L. A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., ... Fraser, C. M. (2002). Whole-Genome Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical and Laboratory Strains. *Journal of Bacteriology*, *184*(19), 5479-5490. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5479-5490.2002>
- Frigui, W., Bottai, D., Majlessi, L., Monot, M., Josselin, E., Brodin, P., Garnier, T., Gicquel, B., Martin, C., Leclerc, C., Cole, S. T., & Brosch, R. (2008). Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 Secretion and Specific T Cell Recognition by PhoP. *PLoS Pathogens*, *4*(2), e33. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040033>
- Gopal, P., Sarathy, J. P., Yee, M., Ragunathan, P., Shin, J., Bhushan, S., Zhu, J., Akopian, T., Kandror, O., Lim, T. K., Gengenbacher, M., Lin, Q., Rubin, E. J., Grüber, G., & Dick, T. (2020). Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nature Communications*, *11*(1), 1661. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15516-1>
- Harboe, M., Oettinger, T., Wiker, H. G., Rosenkrands, I., & Andersen, P. (1996). Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity*, *64*(1), 16-22. <https://doi.org/10.1128/iai.64.1.16-22.1996>
- Hesseling, A. (2009). BCGHistory, evolution, efficacy, and implications in the HIV era. En *Tuberculosis* (pp. 759-770). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3988-4.00074-3>
- Hett, E. C., & Rubin, E. J. (2008). Bacterial growth and cell division: A mycobacterial perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *72*(1), 126-156, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-07>
- Hossain, M. M., & Norazmi, M.-N. (2013). Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection—The double-edged sword? *BioMed Research International*, *2013*, 179174. <https://doi.org/10.1155/2013/179174>
- International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. (2000). *Technical Guide: Sputum Examination for*

Tuberculosis by Direct Microscopy in Low-Income Countries.

- Irving, V. (2022). Estudio del papel de la fosfatasa PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* en el metabolismo energético de células eucariotas THP-1 [Tesis de maestría]. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46, 505-529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Judd, J. A., Canestrari, J., Clark, R., Joseph, A., Lapierre, P., Lasek-Nesselquist, E., Mir, M., Palumbo, M., Smith, C., Stone, M., Upadhyay, A., Wirth, S. E., Dedrick, R. M., Meier, C. G., Russell, D. A., Dills, A., Dove, E., Kester, J., Wolf, I. D., ... Derbyshire, K. M. (2021). A Mycobacterial Systems Resource for the Research Community. *mBio*, 12(2), e02401-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02401-20>
- Kang, P. B., Azad, A. K., Torrelles, J. B., Kaufman, T. M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L. E., & Schlesinger, L. S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 987-999. <https://doi.org/10.1084/jem.20051239>
- Kieser, K. J., & Rubin, E. J. (2014). How sisters grow apart: Mycobacterial growth and division. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(8), 550-562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3299>
- Koul, A., Choidas, A., Treder, M., Tyagi, A. K., Drlica, K., Singh, Y., & Ullrich, A. (2000). Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5425-5432. <https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5425-5432.2000>
- Koul, A., Herget, T., Klebl, B., & Ullrich, A. (2004). Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(3), 189-202. <https://doi.org/10.1038/nrmicro840>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lange, C., Aaby, P., Behr, M. A., Donald, P. R., Kaufmann, S. H. E., Netea, M. G., & Mandalakas, A. M. (2022). 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *The Lancet. Infectious Diseases*, 22(1), e2-e12. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00403-5)
- Lemassu, A., & Daffé, M. (1994). Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*, 297(2), 351-357. <https://doi.org/10.1042/bj2970351>

- Liebenberg, D., Gordhan, B. G., & Kana, B. D. (2022). Drug resistant tuberculosis: Implications for transmission, diagnosis, and disease management. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 943545. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.943545>
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., & Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*, *178*(5), 1274-1282. <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1274-1282.1996>
- Mangtani, P., Abubakar, I., Ariti, C., Beynon, R., Pimpin, L., Fine, P. E. M., Rodrigues, L. C., Smith, P. G., Lipman, M., Whiting, P. F., & Sterne, J. A. (2014). Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *58*(4), 470-480. <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>
- Margenat, M., Betancour, G., Irving, V., Costábile, A., García-Cedrés, T., Portela, M. M., Carrión, F., Herrera, F. E., & Villarino, A. (2023). Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* PtpA interaction and activity on the alpha subunit of human mitochondrial trifunctional protein, a key enzyme of lipid metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1095060. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1095060>
- Margenat, M., Labandera, A.-M., Gil, M., Carrion, F., Purificação, M., Razzera, G., Portela, M. M., Obal, G., Terenzi, H., Pritsch, O., Durán, R., Ferreira, A. M., & Villarino, A. (2015). New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: Hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Scientific Reports*, *5*(1), 8819. <https://doi.org/10.1038/srep08819>
- McNeil, M. B., Ryburn, H. W., Tirados, J., Cheung, C.-Y., & Cook, G. M. (2022). Multiplexed transcriptional repression identifies a network of bactericidal interactions between mycobacterial respiratory complexes. *iScience*, *25*(1), 103573. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103573>
- Meijers, A. S., Troost, R., Ummels, R., Maaskant, J., Speer, A., Nejentsev, S., Bitter, W., & Kuijl, C. P. (2020). Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. *Tuberculosis*, *124*, 101983. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101983>
- Moise, L., McMurry, J., & De Groot, A. S. (2009). *Mycobacterium tuberculosis*. En *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* (pp. 1219-1239). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369408-9.00060-3>
- Moule, M. G., & Cirillo, J. D. (2020). Mycobacterium tuberculosis Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 65. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00065>

- Nguyen, T. N., Sawa-Makarska, J., Khuu, G., Lam, W. K., Adriaenssens, E., Fracchiolla, D., Shoebridge, S., Bernklau, D., Padman, B. S., Skulsuppaisarn, M., Lindblom, R. S. J., Martens, S., & Lazarou, M. (2023). Unconventional initiation of PINK1/Parkin mitophagy by Optineurin. *Molecular Cell*, 83(10), 1693-1709.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.021>
- Ortalo-Magné, A., Dupont, M. A., Lemassu, A., Andersen, A. B., Gounon, P., & Daffé, M. (1995). Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology (Reading, England)*, 141 (Pt 7), 1609-1620. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1609>
- Parish, T., & Kumar, A. (Eds.). (2021). *Mycobacteria Protocols* (Vol. 2314). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1460-0>
- Pitarque, S., Larrouy-Maumus, G., Payré, B., Jackson, M., Puzo, G., & Nigou, J. (2008). The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis*, 88(6), 560-565. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.04.002>
- Poirier, V., Bach, H., & Av-Gay, Y. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Anti-apoptotic Activity of the Macrophage by PtpA Protein-dependent Dephosphorylation of Host GSK3 α . *Journal of Biological Chemistry*, 289(42), 29376-29385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582502>
- Puri, R. V., Reddy, P. V., & Tyagi, A. K. (2013). Secreted Acid Phosphatase (SapM) of *Mycobacterium tuberculosis* Is Indispensable for Arresting Phagosomal Maturation and Growth of the Pathogen in Guinea Pig Tissues. *PLoS ONE*, 8(7), e70514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070514>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Raffetseder, J. (2016). Interplay of human macrophages and *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes [Ph.D., Linköping University]. <https://doi.org/10.3384/diss.diva-132321>
- Rock, J. M., Hopkins, F. F., Chavez, A., Diallo, M., Chase, M. R., Gerrick, E. R., Pritchard, J. R., Church, G. M., Rubin, E. J., Sasseti, C. M., Schnappinger, D., & Fortune, S. M. (2017). Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nature Microbiology*, 2(4), 16274. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.274>
- https://media.addgene.org/data/plasmids/115/115163/115163-attachment_vIKvu61hzB2c.pdf
- Shaku, M. T., Ocius, K. L., Apostolos, A. J., Pires, M. M., VanNieuwenhze, M. S., Dhar, N., & Kana, B. D. (2023). Amidation of glutamate residues in mycobacterial peptidoglycan is essential for cell wall cross-linking. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1205829.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1205829>

- Shi, R., Itagaki, N., & Sugawara, I. (2007). Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 7(11), 1177-1185.
<https://doi.org/10.2174/138955707782331740>
- Shiloh, M. U., & Champion, P. A. D. (2010). To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Current Opinion in Microbiology*, 13(1), 86-92.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.11.006>
- Silveiro, C., Marques, M., Olivença, F., Pires, D., Mortinho, D., Nunes, A., Pimentel, M., Anes, E., & Catalão, M. J. (2023). CRISPRi-mediated characterization of novel anti-tuberculosis targets: Mycobacterial peptidoglycan modifications promote beta-lactam resistance and intracellular survival. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1089911. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1089911>
- Sparks, I. L., Derbyshire, K. M., Jacobs, W. R., & Morita, Y. S. (2023). *Mycobacterium smegmatis*: The Vanguard of Mycobacterial Research. *Journal of Bacteriology*, 205(1), e0033722.
<https://doi.org/10.1128/jb.00337-22>
- Spreadbury, C. L., Pallen, M. J., Overton, T., Behr, M. A., Mostowy, S., Spiro, S., Busby, S. J. W., & Cole, J. A. (2005). Point mutations in the DNA- and cNMP-binding domains of the homologue of the cAMP receptor protein (CRP) in *Mycobacterium bovis* BCG: Implications for the inactivation of a global regulator and strain attenuation. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 2), 547-556.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.27444-0>
- Sullivan, J. T., Young, E. F., McCann, J. R., & Braunstein, M. (2012). The *Mycobacterium tuberculosis* SecA2 System Subverts Phagosome Maturation To Promote Growth in Macrophages. *Infection and Immunity*, 80(3), 996-1006. <https://doi.org/10.1128/IAI.05987-11>
- Vogelnest, L. (2013). Tuberculosis: An emerging zoonosis. *New South Wales Public Health Bulletin*, 24(1), 32-33.
<https://doi.org/10.1071/NB12098>
- Wang, J., Ge, P., Qiang, L., Tian, F., Zhao, D., Chai, Q., Zhu, M., Zhou, R., Meng, G., Iwakura, Y., Gao, G. F., & Liu, C. H. (2017). The mycobacterial phosphatase PtpA regulates the expression of host genes and promotes cell proliferation. *Nature Communications*, 8(1), 244.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00279-z>
- Wang, J., Li, B.-X., Ge, P.-P., Li, J., Wang, Q., Gao, G. F., Qiu, X.-B., & Liu, C. H. (2015). *Mycobacterium tuberculosis* suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system. *Nature Immunology*, 16(3), 237-245. <https://doi.org/10.1038/ni.3096>

- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺ –ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19371-19376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109201108>
- Wong, D., Chao, J. D., & Av-Gay, Y. (2013). *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: From pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends in Microbiology*, 21(2), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.002>
- World Health Organization. (2023). *Global tuberculosis report* (p. 75).
- Yan, M.-Y., Li, S.-S., Ding, X.-Y., Guo, X.-P., Jin, Q., & Sun, Y.-C. (2020). A CRISPR-Assisted Nonhomologous End-Joining Strategy for Efficient Genome Editing in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*, 11(1), e02364-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02364-19>
- Yuliani, Y., Ilimi, A. F. N., Petsong, S., Sawatpanich, A., Chirakul, S., Chatsuwana, T., Palaga, T., & Rotcheewaphan, S. (2024). CRISPR Interference-Mediated Silencing of the mmpL3 Gene in *Mycobacterium smegmatis* and Its Impact on Antimicrobial Susceptibility. *Antibiotics*, 13(6), 483. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13060483>
- Zhang, J., Jiang, R., Takayama, H., & Tanaka, Y. (2005). Survival of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Involves Preventing Apoptosis Induced by Bcl-2 Upregulation and Release Resulting from Necrosis in J774 Macrophages. *Microbiology and Immunology*, 49(9), 845-852. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03673.x>
- Zhuang, L., Ye, Z., Li, L., Yang, L., & Gong, W. (2023). Next-Generation TB Vaccines: Progress, Challenges, and Prospects. *Vaccines*, 11(8), 1304. <https://doi.org/10.3390/vaccines11081304>

8. Anexo

8.1. Preparación de soluciones

Caldo y agar LB: para medio líquido se disolvieron 6 g de Triptona (Duchefa), 3 g extracto de levadura (Duchefa), 6 g NaCl (Supelco) en 600 mL de agua destilada. Se autoclavó durante 20 minutos a 121 °C. Para obtener LB agar se agregó a la mezcla anterior 9 g agar (Apollo) y se autoclavó de igual manera.

Caldo y agar 7H9 con ADS/Tween 80: se disolvieron 2,35 g de 7H9 (Sigma, M0178) en 450 mL de agua Milli Q a los que se le agregó 2 mL de glicerol 50% (JT Baker). Se autoclavó durante 20 minutos a 121 °C. Una vez termostatizado a temperatura ambiente se agregaron 5 mL de ADS (concentración final 10%) y 1,25 mL de Tween 80 20% (2,5% concentración final). En el caso del medio sólido, se preparó medio líquido al que se agregó 1,5 g de agar (Apollo) cada 100 mL de medio. Cuando especificado, se agregó 100 µL de verde malaquita 1000X cada 100 mL de agar luego de su atemperado.

Caldo Sauton: se disolvieron 0,83 mg citrato de amonio férrico (Sigma, F5879), 0,06 g de L-Asparagina (Sigma, A-0884), 0,033 g de ácido cítrico (Baker), 8,3 mg de sulfato de magnesio heptahidratado, 8,85 mg de fosfato dipotásico hidrogenado (LabGuard, 7092), 2,8 mg de fosfato sódico dihidrogenado (Sigma, S-0751), 1,75 mg de cloruro de sodio (Supelcro, 1.06404.1000), 0,389 mL de Tween 80 (Sigma, P4780) y 10 mL de glicerol 99,5% (JT Baker) agregando agua destilada hasta un volumen final de 500 mL.

20 % Tween 80: se agregaron 625 µL Tween 80 (Sigma, P4780) en 2,5 mL agua Milli Q y se calentó a 56 °C para poder disolver el Tween correctamente. Se esterilizó mediante filtrado con jeringa estéril y un filtro estéril de 0.2 micras Millex-GP (Merk, SLGP033NS)

ADS 10X: se disolvieron 5 g BSA (Sigma, A7906), 2 g glucosa (Droguería Uruguay, 454337) y 8,5 g NaCl (Supelcro, 106404) en 80 mL de agua Milli Q. Se esterilizó mediante filtrado como se describe anteriormente.

Verde malaquita: se disolvieron 5 mg de verde malaquita (Sigma) en 25 mL agua Milli Q para formar un *stock* 0,2 µg/mL 1000X. Se esterilizó mediante filtrado como se describe anteriormente.

Kanamicina: *stock* 50 mg/mL (Duchefa, K0126.0025), se usa en concentración final 50 µg/mL.

Ampicilina: *stock* 100 mg/mL (Duchefa, A0104.0010), se usa en concentración final 100 µg/mL.

PBS estéril: disponible en el laboratorio, composición NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM. pH 7.0. Se esterilizó mediante filtrado como se describe anteriormente.

Solución colorante fucsina: se preparan las soluciones A y B, se mezclan en cabina de extracción de gases y se envuelve en aluminio el frasco de la solución final. La solución A consiste en 1,5 g de fucsina (Michrome) en 50 mL etanol (Carlo Erba). La solución B consiste en 2,8 mL fenol (Invitrogen, 15513-039) en 42,2 mL de agua destilada.

Solución decolorante (25% ácido sulfúrico): se mezclan en cabina de extracción 30 mL agua destilada con 10 mL ácido sulfúrico (Merk).

Solución azul: se disuelven 0,05 g de azul de metileno (Merk) en 50 mL agua destilada. Se envuelve con aluminio el frasco en el cual se preparó.

Anticuerpo primario anti-PtpA: de concentración 600 µg/mL, producido en conejo en colaboración con la Dra. Ana María Ferreira y Valeria Silva del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Higiene y purificado por miembros de nuestro equipo utilizando una matriz con la PtpA recombinante inmovilizada.

Anticuerpo secundario comercial anti-conejo (Sigma #A0545): producido en cabra, concentración utilizada 1/50000.

Buffer TAE: disponible en el laboratorio, composición Tris acetato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8.

Buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5: se mezclan 6,06 g de Tris base (Duchefa, T1501) en 700 mL de agua destilada. En un pH-metro se mide el pH de la solución y se ajusta agregando la cantidad de HCl 5 M necesaria para llegar a un pH de 7.5. Luego se agrega agua destilada hasta llegar a un volumen de 1 L.

Buffer TBS-T: Preparado en el laboratorio, composición Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.1%

Buffer Tris-HCl 1 M pH 7.5: se mezclan 121,1 g de Tris base (Duchefa, T1501) en 700 mL de agua destilada. En un pH-metro se mide el pH de la solución y se ajusta agregando la cantidad de HCl 5 M necesaria para llegar a un pH de 7.5. Luego se agrega agua destilada hasta llegar a un volumen de 1 L.

Buffer hibridación: se mezclan 1 mL de NaCl (*stock* 5 M), 0,2 mL EDTA (*stock* 0,5 M) y 5 mL Tris-HCl pH 7.5 (*stock* 1 M), agregando agua destilada hasta llegar a un volumen de 10 mL. Se esterilizó mediante filtrado con jeringa estéril y un filtro de 0.2 micras Millex-GP.

Buffer Tris-Glicina: Preparado en el laboratorio, composición Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3.

Tinción Coomassie coloidal:

Solución fijadora geles: 10% ácido acético, 40% etanol en agua destilada.

Solución coomassie coloidal stock: se mezclan 50 g de sulfato de amonio, 6 mL ácido fosfórico 85%, 10 mL de 5% Azul de Coomassie G-250 en agua y se agrega agua bi-distilada hasta llegar a un volumen de 500 mL.

Solución de trabajo: mezclar 40 mL de solución stock con 10 mL etanol.

8.2. Transformación plásmido pIRL58 con inserto

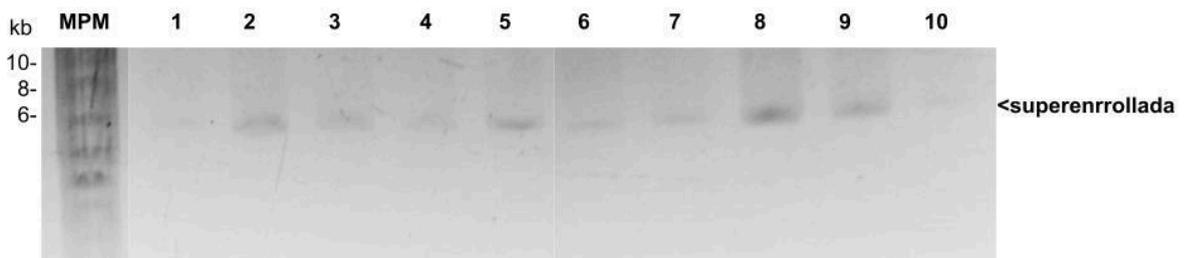


Figura A: Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos purificados a partir de los diez clones obtenidos luego de la transformación de *E. coli* con el producto ligación. De izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (SM0311, Thermo) y los productos de las purificaciones de cada uno de los diez clones.

8.3. Determinación de la concentración de los extractos proteicos obtenidos en 4.3.1 por el método BCA

Tabla A: Cuantificación proteica de los extractos con el método BCA. Para los datos de los extractos de SN se tiene un estimado obtenido extrapolando los valores en la curva de calibración cuya ecuación es $y = 0,337 \cdot x - 0,13$, con un R^2 de 0,989.

Muestra	Proteínas totales (mg/mL)
Extracto celular clon 1	1,8
Extracto celular clon 2	1,7
Extracto celular clon 3	1,7
Extracto celular inducido con ATc clon 1	1,9
Extracto celular inducido con ATc clon 2	1,3
Extracto celular inducido con ATc clon 3	1,6
Extracto SN clon 1	18,4
Extracto SN clon 2	20,3
Extracto SN clon 3	21,4

Extracto SN inducido con ATC clon 1	16,3
Extracto SN inducido con ATC clon 2	18,9
Extracto SN inducido con ATC clon 3	17,5

8.4. Evaluación de la inducción del sistema CRISPR-dCas9i por *Dot Blot* y *Western Blot*

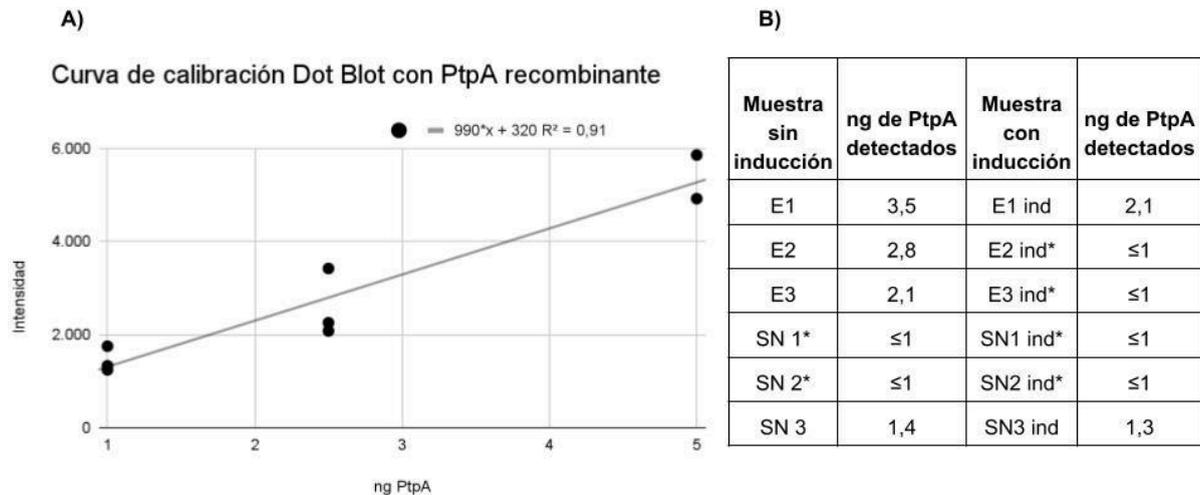


Figura B: Detección de PtpA en los extractos celulares y en los SN de *Msmeg*. (A) Gráfica mostrando la curva de calibración de DB realizada con PtpA recombinante. Los datos se ajustaron a una ecuación de primer orden $y=990*x + 320$. (B) Tabla mostrando los ng de PtpA medidos en el ensayo de DB, se resaltan con un asterisco las muestras de concentración estimada que caen por debajo de la curva.

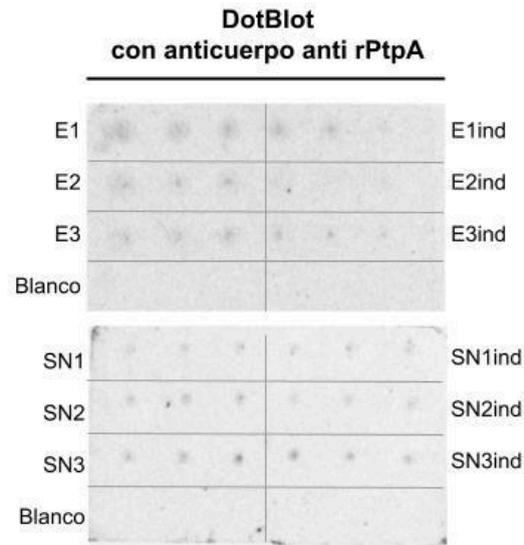


Figura C: Ensayo de DB realizado con las muestras obtenidas de *Msmeg*. En la columna izquierda se sembraron por triplicado en el orden indicado, los extractos celulares (E1, E2, E3) y los SN (SN1, SN2, SN3) correspondientes a los cultivos de los clones 1, 2 y 3 sin inducción del sistema CRISPR-dCas9i, en el cuadrante inferior se sembró medio Sauton como blanco, procesado de igual manera que el resto de las muestras. En la columna derecha se sembraron en el mismo orden anterior, los extractos obtenidos de los cultivos con inducción del sistema CRISPR-dCas9i con ATc.

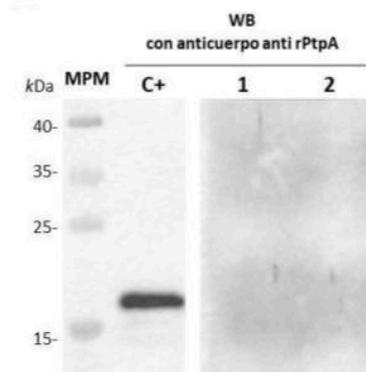


Figura D: Inmunodetección de PtpA en los extractos obtenidos. Las muestras se separaron por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12%. Posteriormente se transfirió a membrana de nitrocelulosa, se cortó verticalmente en tres partes según se indica en la figura, y se incubaron con los correspondientes anticuerpos. WB incubado con el anticuerpo primario y secundario, de izquierda a derecha: MPM pre-stained (merge), control positivo PtpA recombinante (4,7 µg), carril 1 con muestra 2 extracto celular sin inducir y carril 2 con muestra 2 extracto celular inducido.