

Estrategias para la obtención de cepas mutantes de micobacterias aplicadas a generar mutantes para el gen de la fosfatasa PtpA, reconocido factor de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

Valentina Hergatacorzian^{*1}, Gabriela Betancour¹, Marina Forrellad², Vivian Irving¹, Valeria Silva-Álvarez³, Ana María Ferreira³, Mariana Margenat¹, Gabriela Gago⁴, Fabiana Bigi², Andrea Villarino¹.

¹ Instituto de Biología, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.-² Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, Buenos Aires, Argentina.-³ Instituto de Química Biológica, Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias/Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.-⁴ Laboratorio de Fisiología y Genética de Actinomicetes, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Estrategia habitual para la generación de mutantes: Recombinación Homóloga

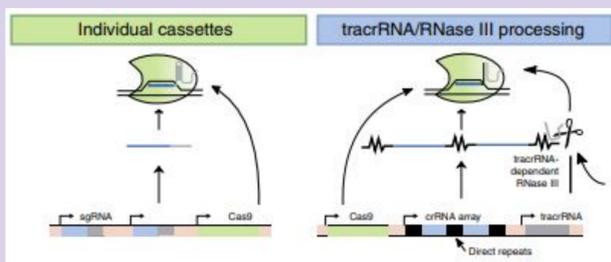
Primera etapa: se genera una cepa que expresa recombinasas mediante electroporación de la cepa bacteriana con un plásmido que contenga las secuencias de éstas y resistencia a un antibiótico.

Segunda etapa: se realiza una segunda electroporación con la finalidad de introducir el fragmento a recombinar, tratándose generalmente de fragmentos *up* y *down stream* del gen de interés a mutar y un cassette que confiere resistencia a otro antibiótico, lo que permite la selección posterior del mutante deseado. De esta forma se modifica el gen objetivo e inhibe su transcripción.

Nueva estrategia para la generación de mutantes: CRISPR/Cas9

Única etapa: electroporación de la cepa bacteriana con dos plásmidos, uno con la información para la expresión del sistema Cas9-sgRNA y el otro plásmido que codifica una integrasa L5 de expresión constitutiva.

Una de las ventajas principales de utilizar la estrategia CRISPR/Cas9 interferente es la posibilidad de modular simultáneamente la expresión de más de un gen insertando al genoma bacteriano un único plásmido que contenga la secuencia de dCas9 y diferentes sgRNAs (McCarty et al., 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15053-x).



Por otra parte, en CRISPR/Cas9i es necesario inducir al sistema de silenciamiento, por lo que se puede tener un fenotipo normal o mutado a voluntad propia. Pero también es posible quitar el plásmido CRISPR incorporado en el genoma de forma sencilla (Meijers et al., 2020, doi: 10.1016/j.tube.2020.101983).

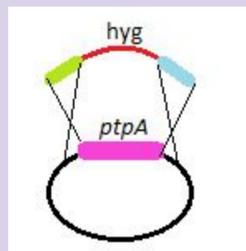
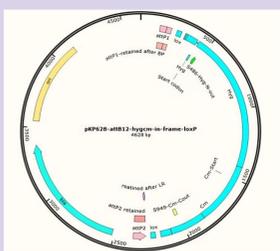
METODOLOGÍA

Recombinación Homóloga

(descrito por Murphy et al., 2015, doi:10.1007/978-1-4939-2450-9_10)

Primera etapa: electroporación de Mtb con un plásmido que expresa las recombinasas RecE y RecT, que promueven el intercambio alélico, y contiene resistencia a kanamicina.

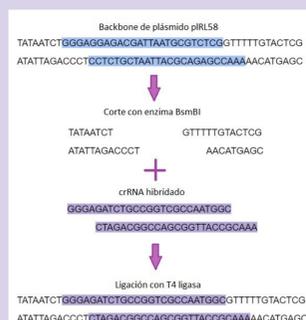
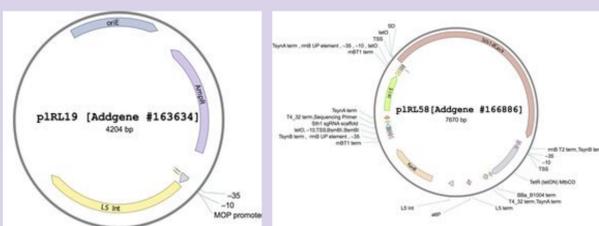
Segunda etapa: se construyó un cassette de higromicina que interrumpirá el gen de PtpA. Para ello se realizó una PCR utilizando como molde el vector pKp628, que contiene los genes de resistencia a higromicina (permitirá la selección posterior del mutante deseado), cebadores complementarios a los extremos de dicho gen de resistencia y conteniendo una secuencia adicional complementaria a las regiones (5') y (3') flanqueantes al gen de PtpA. Luego se realiza una segunda electroporación con la finalidad de introducir el fragmento a recombinar. De esta forma se modifica el gen target e inhibe su transcripción.



CRISPR/Cas9 interferente

(descrito por Rock et al., 2017, doi: 10.1016/j.tube.2020.101983)

Para ello se realizó la amplificación de los plásmidos pIRL58 (resistente a kanamicina) y pIRL19 (resistente a ampicilina) mediante transformación por shock térmico en *E. coli* DH5 α . Además se diseñó y sintetizó el crRNA que permite el reconocimiento de dCas9^{STH} en el inicio de la secuencia codificante del gen *ptpA*. Luego este crRNA se ligó con T4 ligasa al plásmido pIRL58, previamente digerido con BsmBI. Posteriormente se amplificaron los productos de ligación mediante transformación en *E. coli* DH5 α . Se eligen 10 clones de una placa, se purificó el ADN plasmídico y se analizaron por secuenciación (Macrogen).

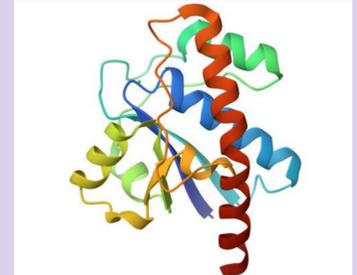
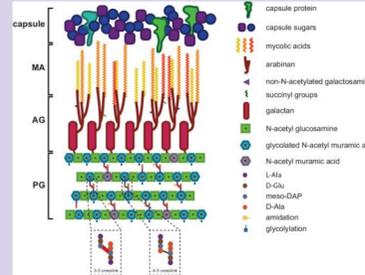


En curso: preparación de Mb BCG electrocompetentes para posterior electroporación con los dos plásmidos, uno con la información para la expresión del sistema Cas9-sgRNA inducible con Anhidrotetraciclina (ATc) y el otro plásmido que codifica una integrasa L5 de expresión constitutiva.

Luego se aíslan los clones mutantes en placas de cultivo con medio sólido 7H9 con ampicilina y kanamicina. Luego de 3 semanas de crecimiento se replican los clones en medio líquido Sauton en presencia del Atc para inducir el sistema Cas9-sgRNA. Para evaluar en los clones la presencia y secreción de PtpA por inmunodetección (utilizando un Ac. anti-PtpA) se recuperarán los SN de los cultivos y extractos proteicos totales.

Interés particular en el factor de virulencia, la fosfatasa PtpA:

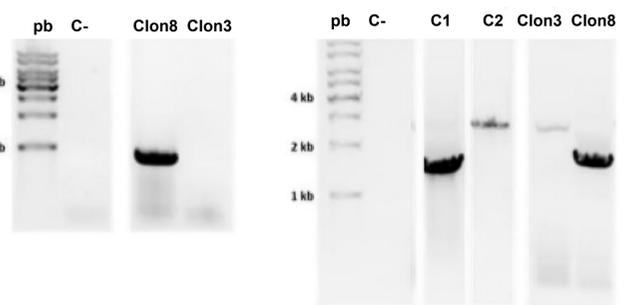
Introducida en el citosol de la células infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y *Mycobacterium bovis* BCG (Mb BCG).



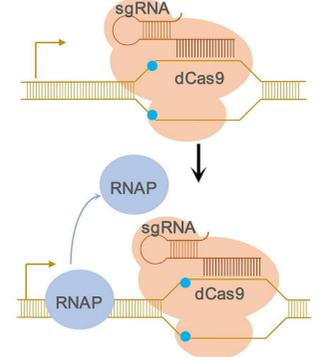
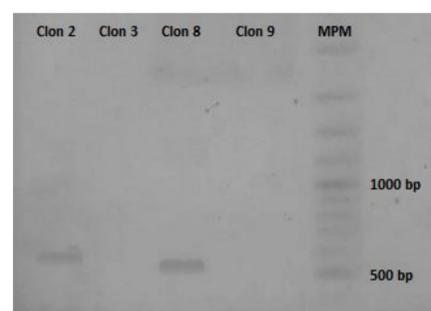
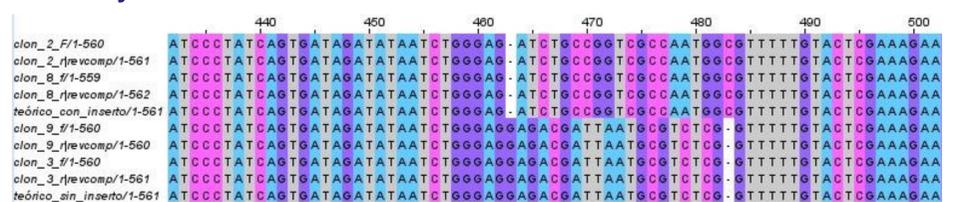
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se verificó los transformantes por PCR observando que el clon 8 es mutante para el gen de PtpA. Se lisaron las bacterias con microesferas magnéticas (inactivando a Mtb previamente incubando 1h a 90°C), se extrajo el ADN genómico.

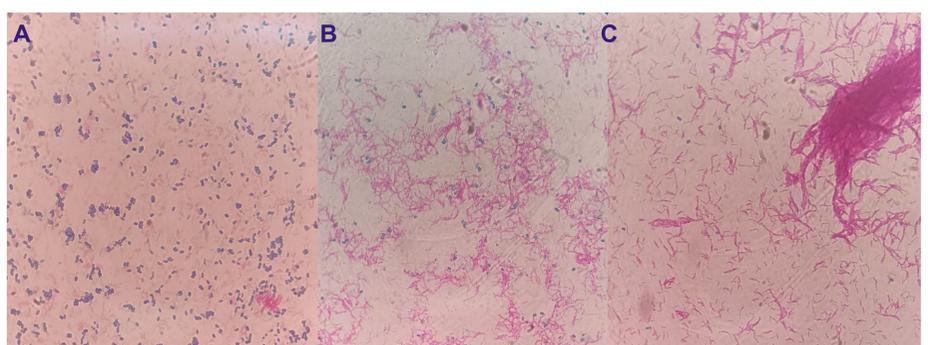
Cebador	Secuencia
Cebador río arriba gen PtpA	AGTTTCTGCTCGACCGTCAT
Cebador dentro del gen resistencia a higromicina	CGTCGGGAGTATAACTTCG
Cebador río arriba gen PtpA, con secuencia de corte para HindIII	AAGCTTATCGTATCCAGCTCCGACA
Cebador río abajo gen PtpA, con secuencia de corte para NotI	GCGGCCGCATTGGATGCCATAGGACAGG



Se verificó los transformantes por PCR y secuenciación, observando que los clones 2 y 8 contienen el crRNA.



Dificultades encontradas en el cultivo de Mb BCG



Visualización de las bacterias con la tinción Ziehl-Neelsen. En A y B se observa un alto porcentaje de contaminantes: mejora de los lotes de Mb BCG en curso.

AGRADECIMIENTOS