

16. Efecto regulador del sRNAs mcr11 sobre la expresión génica de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de CRISPRi

Karen Luisa F. Álvarez-Eraso^{1,3} y Andrés Baena^{2,3}

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), agente causal de la tuberculosis, es uno de los patógenos de mayor importancia en la salud pública mundial. Su éxito se debe en parte a que muchos de sus procesos son controlados por redes de regulación que podrían aumentar su virulencia y favorecer su adaptación al ambiente intracelular. Los “small RNAs” (sRNAs), moléculas que pueden modular la expresión génica, hacen parte de dicha red de regulación, y aunque su descripción en Mtb es pobre, poseen un enorme potencial sobre la patogénesis de la enfermedad. Planteamiento del problema: Dos aislados clínicos de Mtb, UT127 y UT205, pertenecientes a la familia LAM obtenidos en Medellín, fueron analizados dado que mostraban claras diferencias entre ellos. UT205 a diferencia de UT127, logró transmitirse al conviviente del caso índice, generaba mayor muerte por necrosis en monocitos humanos, presentaba un mejor crecimiento en el medio Sauton's (pobre en nutrientes) y producía más vesículas de membrana. Un análisis transcriptómico mostro que el sRNA mcr11 estaba expresado 2,5 veces más en UT205 relativo a UT127. Se plantea que la función reguladora de mcr11 está dentro del metabolismo del AMPc, dada su ubicación entre Rv1264, una adenilato ciclasa, y Rv1265, un factor de transcripción que controla la expresión de mcr11 y se induce en altas concentraciones de AMPc. Además, la expresión de mcr11 responde a las concentraciones de AMPc y a la presencia de la adenilato ciclasa (Rv1264), a condiciones de estrés y también a la fase de crecimiento. Importantemente, han identificado expresión de mcr11 en la infección murina activa y crónica. Queda claro que la red de regulación en la que puede estar participando mcr11 tiene el potencial de ser relevante en la patogénesis de la enfermedad. Por esto, nuestro

¹ Estudiante de Maestría Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas U. de A. (eliminar palabra “correo”)

² Tutor. Profesor Asociado-Departamento de Microbiología y Parasitología-Facultad de Medicina, U. de A. (eliminar la palabra “correo”)

³ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG) U. de A.

Correspondencia: Karen Luisa F. Álvarez: correo electrónico; Andrés Baena: correo electrónico

objetivo es determinar el papel regulador de mcr11 y si además es responsable de alguna de las diferencias observadas entre los dos aislados clínicos.

OBJETIVO

Determinar el efecto regulador de mcr11 sobre la expresión génica de Mtb.

METODOLOGÍA

A través del sistema de interferencia CRISPRi, se silenció mcr11 en UT127, UT205 y H37Rv, mediante un RNA guía (gRNA) específico. Los plásmidos con el sistema de interferencia fueron electroporados y su inducción se realiza con anhidro-tetraciclina (ATC). El experimento de interferencia de mcr11 se realiza poniendo un cultivo de la bacteria en una densidad óptica de 0.1 en presencia de ATC. La extracción de RNA para RNAseq y qRT-PCR, se realiza a las 24h. A través de los genes expresados diferencialmente entre transcriptomas de bacterias con un “knockdown” de mcr11 comparados con bacterias “Wild Type”, se realizarán diferentes análisis bioinformáticos que nos permitan determinar el efecto regulador de mcr11.

RESULTADOS ESPERADOS

Esperamos que al silenciar mcr11 en Mtb comparado con bacterias no silenciadas, se observen genes diferencialmente expresados relacionados con el AMPc. Esto permitiría generar una hipótesis para dar explicación a alguna de las diferencias fenotípicas entre los dos aislados clínicos.

RESULTADOS OBTENIDOS

La técnica de CRISPRi se estandarizó en *Mycobacterium smegmatis* y Mtb al silenciar el gen esencial mmpL3. Se observó que la interferencia de mcr11 en UT127, UT205 y H37Rv genera una deficiencia parcial en el crecimiento. A través de qRT-PCR se confirmó una caída del 75 % en la expresión de mcr11 relativo a la expresión del control.

DISCUSIÓN

Se aprecia que mcr11 es importante para el crecimiento normal de Mtb. Se ha demostrado que el AMPc regula varios procesos en bacterias como la virulencia y la replicación cromosómica. Cabe la posibilidad de que, sin este sRNA, la bacteria no sea capaz de regular sus niveles de AMPc en las etapas tempranas del crecimiento, afectando procesos esenciales para que la bacteria crezca adecuadamente.