

PROYECTO MARCO-COLCIENCIAS

Asociación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la síntesis de lípidos, con la formación de biopelículas, muerte celular y producción de vesículas de membrana, en dos aislados clínicos colombianos modificados empleando el sistema CRISPR-Cas9

PROYECTO PRINCIPAL

Efecto regulador del sRNA Mcr11 sobre la expresión génica de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de CRISPRi

Karen Luisa Fernanda Álvarez Eraso

**Universidad de Antioquia
Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas
Medellín
2019**

PROYECTO MARCO-COLCIENCIAS

Asociación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la síntesis de lípidos, con la formación de biopelículas, muerte celular y producción de vesículas de membrana, en dos aislados clínicos colombianos modificados empleando el sistema CRISPR-Cas9

PROYECTO PRINCIPAL

Efecto regulador del sRNA Mcr11 sobre la expresión génica de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de CRISPRi

Karen Luisa Fernanda Álvarez Eraso

Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas, Genética.

Asesor:

Andrés Baena García, M.Sc. PhD.

Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG)

Universidad de Antioquia

Comité tutorial:

Mauricio Rojas M.Sc.. PhD. Universidad de Antioquia, Medellín

Luis Fernando Barrera Robledo M.Sc., PhD Universidad de Antioquia, Medellín

Juan Fernando Alzate Restrepo M.Sc., PhD Universidad de Antioquia, Medellín

Universidad de Antioquia

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Medellín

2019

Agradecimientos:

A mi familia, especialmente a mi mamá, que siempre ha sido un apoyo incondicional en cada etapa dando más de lo necesario y a mi hermano que con sus consejos me ha ayudado en las dificultades.

A mi tutor, el profesor Andrés Baena, quien con su entrega y gran conocimiento me enseñó a pensar como investigadora e hizo que esto fuera posible.

A mi compañera Laura Muñoz, por su gran apoyo a través de este proceso y su colaboración con los experimentos de viabilidad celular de macrófagos.

A los profesores Luis Fernando Barrera, Mauricio Rojas y Juan Fernando Alzate por su valiosa participación.

A mi compañera Vianey Barrera por su ayuda con los análisis bioinformáticos.

A la profesora Gloria Vasquez y al grupo GICIG por darme la oportunidad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por su compañía y apoyo.

A la Universidad de Antioquia por permitirme ser parte de este proceso tan enriquecedor.

Resumen:

Conocer en detalle los mecanismos regulatorios que rigen la fisiología y adaptación de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) podrían aportar ideas en el establecimiento de nuevas formas para el control de la enfermedad. Los small RNAs (sRNAs) son transcritos que han sido implicados en la regulación de la expresión génica, principalmente al interferir con la traducción de RNAs mensajeros. En Mtb se han descrito la función de dos sRNAs, Mcr7 y MrsI. El primero implicado en la secreción tipo TatABC, relacionada con la virulencia y el segundo implicado en la adaptación anticipada de Mtb a condiciones de limitación de hierro.

En nuestro laboratorio se han venido estudiando dos aislados clínicos, UT205 y UT127, debido a que UT205 muestra características que pueden asociarse con una mayor virulencia comparado con UT127. Al caracterizar estas dos bacterias a nivel genómico y transcriptómico, encontramos que el sRNA Mcr11 está 2.9 veces sobre-expresado en UT205 con respecto a UT127. En la literatura encontramos que este sRNA, ubicado entre los genes *rv1264*, un adenilato ciclasa (AC), y *rv1265*, el factor de transcripción AbmR, está únicamente presente en micobacterias del complejo Mtb y se ha planteado que su función reguladora está inmersa en el metabolismo del AMPc. Esta idea apoyada también en reportes que muestran cómo la expresión de Mcr11 se modula dependiendo de las concentraciones de AMPc en el medio y de la presencia de la AC Rv1264. Sumado a esto, Mcr11 parece responder ante condiciones de estrés al modular su expresión en condiciones de pH bajo, hierro y nutrientes limitados, en dormancia y además responde a la fase de crecimiento, mostrando mayores niveles de expresión en la fase estacionaria. Adicionalmente, se ha encontrado que Mcr11 se expresa durante una infección en ratones. Con este panorama, 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.

Usando la técnica de silenciamiento génico CRISPRi, tratamos de determinar la función de Mcr11. Cuando silenciamos este sRNA en los dos aislados clínicos mencionados y la cepa de laboratorio H37Rv, observamos un defecto en el crecimiento principalmente en UT205. También, encontramos un fenotipo de agregación para esta bacteriana, cuando aumentamos la concentración del inductor del sistema CRISPRi. Al determinar los genes diferencialmente expresados por RNA-seq en las tres bacterias nombradas tras el

silenciamiento de Mcr11, identificamos ciertas similitudes entre UT127 y H37Rv, mientras que en el caso de UT205 se presentó un efecto mucho más profundo, con una gran cantidad de genes regulados negativamente, incluyendo en este grupo, 23 genes esenciales, genes asociados a el metabolismo y producción de energía, proteínas ribosomales, componentes de pared y membrana celular, genes asociados a virulencia, entre otros.

Uno de los genes más interesantes que mostró regulación positiva en UT127 y H37Rv (y parcialmente en UT205) y que además, nosotros postulamos como un posible candidato para ser regulado por Mcr11, es el gen *oprA*, un osmosensor que se sobreexpresa en condiciones de estrés osmótico. OprA se ha asociado a cambios en la estructura del peptidoglicano de la pared celular de Mtb, que lleva a una alteración osmótica y cambios morfológicos. Al buscar en la literatura hemos encontrado similitudes entre los perfiles transcripcionales de diferentes bacterias y Mtb, en respuesta al estrés osmótico y los encontrados en nuestras bacterias cuando silenciamos Mcr11. También, similar a nuestros resultados, el estrés osmótico genera una disminución en la tasa de crecimiento de las bacterias. La regulación del potasio es uno de los mecanismos bacterianos más importantes en respuesta al estrés osmótico, específicamente, al importar este ion del compartimento extracelular. Uno de los transportadores de potasio al interior de las bacterias es KdpD, una proteína transmembrana que también hace parte del sistema de dos componentes KdpDE. Al analizar la secuencia nucleotídica de KdpD entre las tres bacterias, encontramos que UT205 posee una delección de 13 nucleótidos que generan una proteína inactiva. Asociamos que la falta de este sistema de regulación de potasio en UT205 puede ser la responsable de la respuesta claramente distinta entre esta bacteria y UT127-H37Rv, cuando se silencia la expresión de Mcr11.

Proponemos entonces, que una de las funciones de Mcr11 se asocia con el gen *oprA*, evitando que se produzca la proteína al interferir con su traducción y de esta forma, manteniendo sus niveles bajos. Esto permite que la bacteria mantenga su regulación osmótica controlada. Por otro lado, cuando Mcr11 sufre una disminución en su transcripción, los niveles de la proteína OprA aumentan. Como consecuencia la bacteria sufre cambios estructurales a nivel de la pared celular y con ello, disminuye su capacidad para mantener controlada su regulación osmótica, llevando a que Mtb disminuya su crecimiento. En el caso de UT127 y H37Rv al poseer transportadores de

potasio funcionales, son capaces de sobrellevar el estrés. De manera distinta, UT205 con un KdpD inactivo, no es capaz de regular sus concentraciones de potasio y, en consecuencia, el estrés osmótico genera un estado fenotípico y transcripcional con un mayor nivel de afectación.

Finalmente, determinamos el nivel de viabilidad de las células THP-1 al ser infectadas con el aislado clínico UT205 con silenciamiento de Mcr11. Encontramos que, en estas condiciones, la viabilidad de las células aumenta en comparación a células infectadas con UT205 control. Este fenómeno lo asociamos a la represión de genes asociados a la virulencia de Mtb cuando existe un silenciamiento del sRNA de estudio.

Tabla de Contenido

1. Lista de figuras	9
2. Lista de tablas	10
3. Lista de abreviaturas	10
4. Introducción.....	14
4.1 La heterogeneidad de Mtb	15
4.2 Redes de regulación en Mtb	17
a. Factores sigma (σ)	18
b. Sistemas de dos componentes.....	21
c. Small RNAs	23
4.3 Generalidades de CRISPR.....	27
4.4 Antecedentes al estudio del sRNA Mcr11	31
5. Pregunta de investigación.....	32
6. Hipótesis	32
7. Objetivos	33
7.1 Objetivo general.....	33
7.2 Objetivos específicos	33
8. Metodología.....	33
8.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	33
8.2 Extracción de DNA	34
8.3 Plásmido del sistema CRISPRi-dCas9 <i>S. thermophilus</i>	34
8.4 Diseño de los RNA guías (gRNAs) y formación de los duplex.....	35
8.5 Clonación de los gRNA en el plásmido del sistema CRISPRi y su expansión en <i>E. coli</i>	35
8.6 Transformación de constructos en las cepas bacterianas y extracción de DNA para su verificación.....	37
8.7 Extracción de RNA y qRT-PCR.....	38
8.8 Experimentos de esencialidad	42
8.9 Secuenciamiento de RNA	42
a. Control de calidad de los transcriptomas, construcción de librerías, secuenciamiento y análisis bioinformático	43
8.10 Experimentos de infección a macrófagos.....	44
9. Resultados	45

9.1 Verificación del funcionamiento de CRIPRi de <i>S. thermophilus</i> en Mtb	45
a. Verificación de la inducción de la proteína dCas9	45
b. Silenciamiento del gen esencial <i>mmpL3</i>	45
c. Verificación del silenciamiento del gen <i>groEL1</i> por PCR	47
9.2 Efecto del silenciamiento de Mcr11 sobre el fenotipo de Mtb	50
9.3 Análisis transcriptómico del silenciamiento de Mcr11	53
9.4 Efecto del silenciamiento de Mcr11 sobre el perfil global de expresión de mRNA en H37Rv y UT127	59
9.5 Efecto del silenciamiento de Mcr11 sobre el perfil global de expresión de mRNA en UT205	67
9.6 El regulón de Mcr11	77
9.7 El silenciamiento de Mcr11 afecta la viabilidad de la bacteria y el macrófago	78
10. Discusión y perspectivas	86
11. Referencias	99

1. Lista de figuras

Figura 1: Red regulatoria transcripcional de Mtb

Figura 2: Mecanismo regulatorios importantes en Mtb

Figura 3: Esquema del sistema CRISPR-Cas9 tipo II

Figura 4: Mapa del plásmido 965

Figura 5: Verificación de la inducción de la proteína dCas9

Figura 6: Silenciamiento del *mmpL3* a través de CRISPRi

Figura 7: Verificación molecular del silenciamiento de GroEL1 a través de CRISPRi

Figura 8: Verificación molecular del silenciamiento de Mcr11 a través de CRISPRi

Figura 9: Efecto fenotípico del silenciamiento de Mcr11 en Mtb

Figura 10: Integridad del RNA que fue secuenciado durante el silenciamiento de Mcr11

Figura 11: Control de calidad, secuenciamiento y análisis bioinformático de los transcriptomas

Figura 12: Expresión génica de H37Rv y UT127 tras el silenciamiento de Mcr11

Figura 13: Expresión génica de UT205 tras el silenciamiento de Mcr11

Figura 14: Estructura secundaria, secuencia “seed” y posibles blancos de Mcr11

Figura 15: Viabilidad de UT205 y las células THP-1 infectadas, cuando se silencia Mcr11

Figura 16: Modelos de regulación de Mcr11

2. Lista de tablas

Tabla 1: Secuencias y PAMs de los gRNAs empleados para el silenciamiento de los genes indicados.

Tabla 2: Secuencias de los primers empleados en este estudio

Tabla 3: Genes comunes regulados positivamente en H37Rv y UT127

Tabla 4: Genes comunes regulados negativamente en H37Rv y UT127

Tabla 5: Enriquecimiento funcional para los genes regulados negativamente en UT205

3. Lista de abreviaturas

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

AS: Antisentido

ATC: Anhidrotetraciclina

ATP: Adenosín trifosfato

ABC: “ATP-binding cassette”

Ct: “Threshold cycle”

crRNAs: CRISPR RNAs

dCas: Cas9 deficiente

DE: Dormancia temprana

DEGs: Genes diferencialmente expresados

DL: Dormancia tardía

DM: Dormancia media

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DosR: “Dormancy survival response regulator”

BD: Becton Dickinson

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

Cas: Asociados a CRISPR

CDC: “Centers for Disease Control and Prevention”

cDNA: DNA complementario

Chip-Seq: Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de un secuenciamiento

CIB: Corporación para Investigaciones Biológicas

CRISPR: “Clustered regularly interspaced short palindromic repeats”

CRISPRi: CRISPR de interferencia

CRP: Proteína receptora de AMPc

CMR: Factor de transcripción sensible al cAMP

DAT: Diacil trehalosa

Factor σ : Factor sigma

FSC: “Forward Scatter”

gDNA: DNA genómico

GFP: “Green fluorescent protein”

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

GO: “Gene Ontology”

gRNA: RNA guía

HK: Histidina quinasa

KEGG: “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”

K⁺: Potasio

LM: Lipomanano

LAM: Lipoarabinomanano

Log₂ FC: Logaritmo en base 2 del “Fold change”

MDR-TB: Tuberculosis resistente a los medicamentos

MDS: “Multidimensional scaling”

MOI: Multiplicidad de infección

Mpr: “Mycobacterium persistence regulator”

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

MVs: Vesículas de membrana

Mø: Macrófago

Nt: Nucleótidos

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

OMS: Organización mundial de la salud

PAM: Motivo Adyacente al “Protospacer”

PAT: Poliacil trehalosa

PBS: “Phosphate buffered saline”

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDIM: Tioceroil dimicoserosato

PI: Yoduro de propidio

PIM: Fosfatidilinositol manosido

PGL: Glucolípido fenólico

PMA: Forbol-12-Miristato-13-Acetato

pre-crRNA: Precursor de crRNA

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa

mRNA: RNA mensajero

RBS: Sitio de unión a los ribosomas

RD1: Región de Diferencia 1

RNA: Ácido ribonucleico

RNA-Seq: Secuenciamiento de RNA

RR: Regulador de respuesta

SDS: Dodecilsulfato sódico

SL-1: Sulfolípido-1

sRNA: Small RNA

sRNA-Seq: Secuenciamiento de sRNAs

SSC: “Side Scatter”

TALENs: Nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción

TB: Tuberculosis

TCS: Sistema de dos componentes

TF: Factor de transcripción

TMM: “Trimmed Mean of M-values”

tracrRNA: RNA trans-activador

TSS: Sitio de inicio de la transcripción

UFC: Unidades formadoras de colonias

UTR: Región no traducida a proteína

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

XDR-TB: Tuberculosis extremadamente resistente a los medicamentos

ZFNs: Nucleasas de dedos de zinc

965 vacío: Plásmido 965 al que no se le clonó ningún gRNA y se usó como control

4. Introducción

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), el agente causal de la tuberculosis (TB), es una de las 10 enfermedades que más muertes causa en el mundo y es la principal causa de muerte por agente infeccioso, incluso por encima del VIH. Se estima que el 23% de la población mundial presenta TB latente, personas que podrían desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida (1). La TB dejó para el año 2017, un estimado de 1,3 millones de muertes entre personas VIH negativas y 300.000 más entre VIH positivas. En el mismo año se presentaron 10 millones de nuevos casos en todo el mundo, de los cuales 282.000 pertenecen al continente americano (2). Por otra parte, América del Sur tuvo una incidencia de 46,2 casos por cada 100.000 habitantes (2), teniendo a Colombia en el 5 lugar entre los países con mayor incidencia, presentando 16.000 casos en el 2017 (2). Antioquia y Valle del Cauca son los departamentos más afectados por la enfermedad, aportando el 18,3% y 13,3% respectivamente del total de casos. Medellín, por su parte, es el municipio que más casos de TB informa, representado el 11,1% del total (3).

Uno de los problemas relacionados con esta enfermedad es que no se cuenta con una vacuna realmente protectora. La vacuna actual, BCG (*Bacillus de Calmette y Guérin*), desarrollada en 1921 y que fue derivada de *Mycobacterium bovis* (4-5), ha mostrado protección clara para las presentaciones diseminadas de la enfermedad, especialmente la meníngea y miliar en niños (1, 6-10). Su protección en cuanto a la TB pulmonar, la forma más común de la enfermedad, ha sido muy controversial dada la presencia de discrepancias entre diferentes estudios (1, 4, 5, 11, 12), en donde se informan niveles de protección de entre 0 y 80% (4, 11). Estas inconsistencias en los resultados se han asociado a las diferencias genéticas entre las poblaciones de estudio, diferencias en las cepas evaluadas (5) y a la dosis suministrada de la vacuna, la latitud geográfica de la población de análisis (8), entre otras. A pesar de que actualmente existen 12 candidatos de vacunas, aún queda un largo camino para tener una que demuestre ser realmente eficaz (1).

Por otro lado, el tratamiento para esta enfermedad es una quimioterapia de cuatro antibióticos que deben ser suministrados al menos por 6 meses, en los cuales, es posible que las personas detengan su uso, especialmente entre personas con bajo nivel de educación (12), que irónicamente son las más afectadas por la TB. Esto puede llevar a

que estas personas desarrollen una TB latente y representar posibles focos de infección. Además, esta desadherencia al tratamiento fomenta la aparición de cepas resistentes (12), que implica un problema más en la lucha de la TB. Por ejemplo, para el año 2017 558.000 personas presentaron resistencia a la rifampicina y de estos, alrededor de 476.000 y 47.000 desarrollaron TB multirresistente (MDR-TB) y TB extremadamente resistente (XDR-TB), respectivamente (1).

Todo este panorama deja claro que se requieren estrategias que apunten al control de la TB, entre las cuales está la identificación de blancos terapéuticos, diseño de nuevas y mejores vacunas, desarrollo de tratamientos más simples y cortos para tratar la enfermedad, entre otros.

4.1 La heterogeneidad de Mtb

Para poder avanzar en estas estrategias de control, es importante conocer las cepas de Mtb que circulan en una población; esto debido a que las diferencias genéticas y metabólicas de las cepas tienen implicaciones en el desarrollo, presentación, severidad y tratamiento de la enfermedad (13-15). La estructura clonal de Mtb (16), la cual es el resultado de su incapacidad de compartir de manera horizontal material genético (17), ha llevado a que la bacteria sea dividida en diferentes linajes (13, 17) que al diferenciarse unos de otros, pueden generar un espectro variado de infecciones (18-21), incluso, observándose este fenómeno en cepas pertenecientes al mismo linaje. Ejemplos de las implicaciones que pueden existir debido a las diferencias que se presentan en las cepas, han sido algunos de los brotes de tuberculosis que se han presentado en el mundo. Uno de estos, causado por la cepa perteneciente al sublinaje W-Beijín HN878 entre los años 1995 y 1998 en Estados Unidos (19). Esta cepa mostró ser altamente virulenta e inducir menores niveles de respuesta inflamatoria (20) y, a través de un análisis posterior, fue posible asociar dicha virulencia con una mayor producción del glucolípido fenólico (PGL) (18, 19, 21), un importante inmunomodulador (21). La cepa KZM, XDR, generó un brote en Sudáfrica en la región KwaZulu-Natal, donde se reportaron 53 casos de tuberculosis de los cuales sólo una persona pudo recuperarse, mostrando ser una cepa altamente letal (22).

En Colombia, un reporte realizado por Realpe y colaboradores informaron que, como ya se conocía con anterioridad, el linaje dominante de la región es el Euro-Americano

reportando también que los sub-linajes principales son el LAM y Haarlem (23). En un estudio colaborativo realizado por nuestro laboratorio (24), se estudiaron pacientes con tuberculosis de la ciudad de Medellín. En este trabajo se buscaba evaluar la transmisión de la bacteria entre el caso índice y sus convivientes contacto. Se lograron obtener varios aislados clínicos de Mtb a partir de los casos índice, pero dos de estos, UT205 y UT127 pertenecientes al sub-linaje LAM09, cobraron interés debido a que se reportó un caso incidente entre los convivientes del caso índice infectado con UT205 en un periodo de seguimiento de dos años, y por el contrario, no se reportaron casos incidentes dentro de los convivientes del caso índice infectado con UT127, en el mismo periodo de tiempo. Esto sugería una mayor virulencia para UT205, por lo que se realizó una caracterización más detallada de estas bacterias. Se observó que cuando se infectaron monocitos humanos con los dos aislados clínicos, UT205 inducía en mayor proporción un tipo de muerte celular similar a necrosis comparado con UT127, que inducía principalmente un tipo de muerte similar a apoptosis (24). Así mismo, se observó que UT205 a diferencia de UT127, tuvo un mejor crecimiento en el medio Sauton's (pobre en nutrientes) y que producía una mayor cantidad de vesículas de membrana (MVs), las cuales pueden ser importantes inmunomoduladores (25). Este panorama pone en evidencia que la diversidad entre las cepas de Mtb es amplia y posee implicaciones biológicas importantes. Entender las bases de dichas diferencias nos permitiría abordar la enfermedad no como una sola entidad, sino como un espectro que debe tratarse de manera particular.

Una de las posibles razones por las cuales las cepas de Mtb difieren unas de otras puede provenir de variaciones a nivel genético, transcriptómico y post transcripcional. Se sabe que Mtb cuenta con diferentes mecanismos regulatorios que favorecen su adaptación a cambios ambientales tan fuertes como los que experimenta durante una infección (26, 27). Estos mecanismos se configuran en complejas redes y subredes de regulación que, de una manera u otra, modulan la virulencia de la bacteria y propician así, el establecimiento de una infección (27, 28). Estas redes de regulación, contribuyen para que Mtb siga siendo el agente infeccioso más exitoso a nivel mundial; comprender su funcionamiento en detalle permitiría, entre otras cosas, avanzar en el diseño de nuevos y mejores blancos terapéuticos que podrían impactar a futuro en la lucha contra la TB.

4.2 Redes de regulación en Mtb

Para poder establecer los determinantes claves en la patogénesis de Mtb, es necesario conocer los mecanismos reguladores que le facilitan a la bacteria relacionarse exitosamente con su hospedero. El creciente desarrollo de las tecnologías aplicadas a las ómicas, ha abierto cada vez más el campo para la comprensión de dichos mecanismos que comandan la fisiología, adaptación y virulencia bacteriana (29-33). La transcriptómica, se postula como uno de los caminos más atractivos para alcanzar este entendimiento. Técnicas como los microarreglos, dieron un empujón significativo debido a que fue posible cuantificar el nivel de expresión de los genes (30, 34-36). Esta herramienta, sería más adelante complementada por técnicas de alto rendimiento como el secuenciamiento de RNA o RNA-Seq (37-42), que supera inconvenientes como la capacidad de identificación de secuencias de novo o la cuantificación de transcritos de muy baja o muy alta expresión. Con estas metodologías fue posible observar cambios transcriptómicos cuando la bacteria era sometida a diferentes condiciones ambientales (39, 40, 43) o cuando se comparaban cepas silvestres con cepas mutantes (44); de esta forma se han identificado aquellos genes importantes para cada condición y más importante aún, se ha logrado deducir las posibles asociaciones regulatorias entre dichos genes. Otra técnica que ha aportado en gran medida al establecimiento de las redes de regulación en Mtb, ha sido la inmunoprecipitación de la cromatina seguida de un secuenciamiento o Chip-Seq (45-47), la cual ha permitido establecer los procesos regulados por los factores de transcripción (TF) *in vivo*, al determinar a qué promotores o secuencias de RNA se unen y modulan (29).

Estas y otras técnicas en su conjunto, han llevado al establecimiento de una gran red de regulación que rige la biología en Mtb (Fig. 1). De esta se desprenden subredes más pequeñas lideradas por reguladores maestros, de las que se requiere obtener mayor comprensión que permita llenar los vacíos que aún existen en dicha gran red. Como participantes en estas redes regulatorias en Mtb podemos hablar de los factores sigma (σ), los sistemas de dos componentes (TCSs), los TF y small RNAs (sRNAs) los cuales se conectan entre sí y trabajan coordinadamente para establecer el perfil de expresión que la micobacteria requiere en determinado momento (Fig. 2).

a. Factores sigma (σ)

Los factores σ son pequeñas subunidades intercambiables de la holoenzima de RNA, las cuales le permiten a la enzima reconocer promotores específicos (48-51), separar las cadenas de DNA y formar la burbuja transcripcional, facilitando entonces el inicio de la transcripción (48-50, 52-54). Poco después del inicio de la síntesis de RNA los factores σ son desasociados del complejo transcripcional (48). Los factores σ responden a señales tanto internas como externas, al controlar la expresión de un repertorio determinado de genes, con el fin de mantener la homeostasis intracelular y en algunos casos controlar la virulencia bacteriana (52, 53, 55). Las bacterias poseen un factor σ esencial, el cual se encarga del inicio de la transcripción de una gran cantidad de genes y otro grupo de factores σ que se encargan de inducir programas genéticos más específicos (48, 50, 51). Mtb codifica para 13 factores σ (51, 53, 56, 57), en donde SigA es el factor σ esencial (56) y los 12 restantes son factores σ accesorios (SigB-SigM) (51, 53). Todos estos en conjunto, forman una red regulatoria jerárquica, con factores σ generales y otros más específicos que además se encargan de regular la expresión de otros factores σ e incluso se autorregulan (26, 33, 58). Un ejemplo es SigB, el cual se considera un centro integrador de señales que median la respuesta a diferentes tipos de estrés (57). Se ha informado que la expresión de *sigB* puede ser favorecida por sí mismo y por los factores SigE, SigF, SigL y SigH, cada uno trabajando en diferentes condiciones (51). Un ejemplo de esto es la expresión de *sigB* mediada por SigE, que se observa cuando la bacteria crece en condiciones fisiológicas y en estrés de membrana; por otro lado, su expresión mediada por SigH se ha identificado en condiciones de estrés oxidativo y choque térmico (51, 57, 59). Estas mismas condiciones de estrés, sumado a la infección de macrófagos, muestran una regulación positiva de *sigE* dependiente de SigH, a través de su unión a unos de los tres promotores que posee *sigE*. De interés, se conoce que MprA, un factor de transcripción que hace parte del TCS MprAB de Mtb, favorece la transcripción de *sigB* en estados de estrés de membrana causado por SDS y en la fase de crecimiento exponencial (51, 60). SigF favorece la expresión de *sigC* (61), un factor σ encontrado sólo en micobacterias patógenas, el cual muestra alta expresión, únicamente en fase exponencial, pero muy poca en la fase estacionaria o en condiciones de estrés (53). Mutantes de Mtb para este factor generan infecciones en ratones, con un menor impacto inflamatorio y mortalidad comparado con infecciones con la cepa silvestre. Los factores σ que tienen capacidad auto-regulatoria son SigB, SigF, SigH, SigL y SigK (53, 58). En cuanto a las fases de crecimiento de la

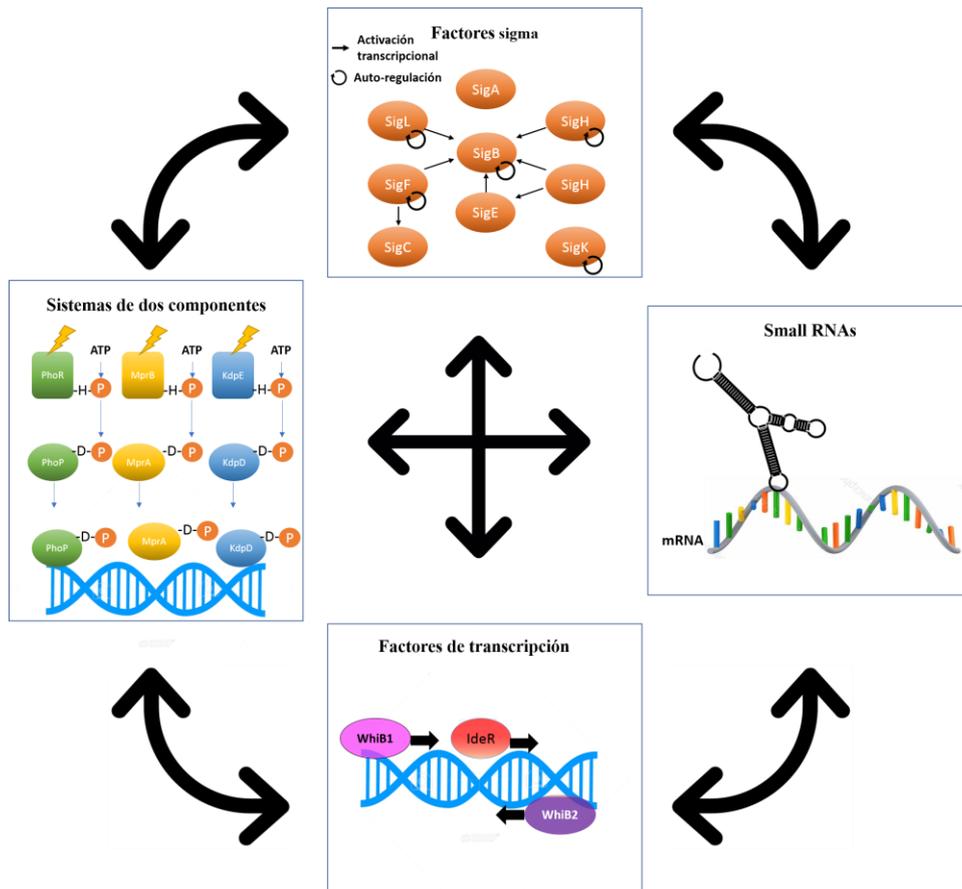


Figura 2: Mecanismos regulatorios importantes en Mtb: Se esquematiza la interrelación entre los mecanismos reguladores más destacados de Mtb. El recuadro superior muestra algunos de los factores σ de Mtb en donde las flechas indican la direccionalidad de la regulación de un factor hacia otro. La flecha concéntrica representa autorregulación. A la izquierda se esquematizan tres de los TCSs de Mtb y se indica de manera general la cascada de activación de los reguladores implicados. A la derecha se observa un sRNA interaccionando con su mRNA blanco. El recuadro inferior muestra algunos FT interaccionando con el DNA y favoreciendo la transcripción de un regulón (Adaptada de referencia 58).

micobacteria, los factores SigA, SigB, SigC, SigD, SigE y SigM son altamente expresados en la fase exponencial; SigF parece ser importante en fase estacionaria, debido a que cepas mutantes para este factor alcanzan densidades significativamente más altas en esta fase comparado con aquellas cepas silvestres. Cuando la fase estacionaria sigue avanzando, todos los factores σ son regulados negativamente a excepción de SigG, SigI y SigJ que aumentan su expresión (26, 51). Todos los factores σ de Mtb, a excepción de SigA, SigB, SigI y SigJ, poseen un factor anti σ asociado (53). Los factores anti σ funcionan como antagonistas del factor σ relacionado, al evitar su unión con la holoenzima de RNA y como consecuencia, regulan negativamente la expresión de los genes bajo el control del factor σ en cuestión (63-65), estas moléculas, por ende, aportan una capa más de complejidad a estos circuitos reguladores.

b. Sistemas de dos componentes

Los TCS, son otros mecanismos regulatorios ampliamente encontrados en bacterias (66) como Mtb (67-70), los cuales favorecen la adaptación de la bacteria a cambios ambientales (71) como por ejemplo la hipoxia (72), la limitación de nutrientes o los cambios de pH (73), entre otros siendo por tanto importantes en cuanto a la virulencia de este patógeno (74, 75). Fundamentalmente los TCSs se componen de un sensor histidina quinasa (HK) y un factor de transcripción llamado regulador de respuesta (RR) (66). En TCSs prototipo, la HK es una proteína transmembrana la cual, al detectar un cambio ambiental específico, une e hidroliza ATP a través de su dominio N-terminal de unión a ATP, momento en el cual la HK se auto-fosforila en un residuo histidina conservado en el C-terminal (66, 69). Posteriormente el grupo fosfato de la histidina es transferido al RR en un residuo de aspartato en el N-terminal lo cual activa al factor de transcripción para que este se dirija al DNA, para activar la transcripción de un regulón específico con el fin de adaptarse al cambio ambiental en cuestión (66, 69). Mtb posee 11 TCSs y 5 HK-RR sin su proteína asociada llamados reguladores huérfanos (69, 76). De gran interés 4 de los 12 TCSs participan directamente en la virulencia de la micobacteria (PhoPR, MprAB, PrrAB y SenX3/RegX3) (74-77).

En el contexto de redes de regulación de Mtb, ha sido posible describir algunas de las interacciones de los TCSs con otros reguladores como los factores σ y los sRNAs. El TCS MprAB (Mpr, del inglés “Mycobacterium persistence regulator”) es uno de estos,

el cual ha sido relacionado con la persistencia de Mtb (78) al establecer una red regulatoria con el factor SigE y su factor anti σ RseA (79). La expresión de MprA, el RR de este TCS, está mediada por SigE y que curiosamente, la expresión de SigE aumenta cuando la bacteria es expuesta a condiciones que generan un estado de persistencia como limitación de nutrientes, exposición a detergentes o estrés oxidativo. Tras la auto-fosforilación del sensor HK MprB, se lleva a cabo la transferencia del fosfato al RR MprA el cual, además de participar en un circuito de autorregulación positiva de su propio promotor, favorece la expresión de SigE, estableciéndose así, un doble “feedback” para la expresión de este TCS, la primera mediada por SigE y la segunda por el propio MprA. Esta regulación mediada por SigE sólo es posible en ausencia del factor anti σ RseA el cual une a SigE en condiciones reductoras (79). Entre los blancos de MprA está el gen de Acr2, una chaperona de la familia de las HSP (“Heat Shock Protein”) que participa en respuestas al estrés. Se cree que a altas temperaturas Acr2 fomenta la estabilización estructural de los ribosomas lo cual asegura la correcta traducción de las proteínas (69, 76). Mutantes de Mtb para MprA no logran establecer persistencia en modelos de ratón, pero curiosamente, este mutante muestra un fenotipo hipervirulento al infectar macrófagos (78, 79).

PhoPR es otro TCS de Mtb del cual se ha establecido recientemente una interacción con el sRNA Mcr7 (46). Este sistema es uno de los más descritos en la literatura, contando con PhoR como el sensor HK y PhoP como el RR, el cual, tras su activación regula positivamente su propio promotor. PhoPR se encarga del censado del pH extracelular y cuenta con un rol importante en virulencia dado que los genes que controla, hacen parte de las vías de síntesis de lípidos como sulfolípidos (SL), diacil trehalosa (DAT) y poliacyl trehalosa (PAT), moléculas importantes en la modulación del sistema inmune (80, 81). El papel de PhoPR sobre la patogenicidad de Mtb también se refleja en su capacidad de controlar genes de la Región de Diferencia 1 (RD1), la cual es conocida por codificar genes para los sistemas de secreción ESX-1 a través del cual se exporta ESAT-6 y CFP-10, dos proteínas inmunogénicas importantes (82). Mutaciones en el gen de PhoP genera fenotipos atenuados de la micobacteria los cuales muestran patrones lipídicos anormales en su pared celular, especialmente en las especies de lipoarabinomano (LAM) y menores niveles de SL, DAT y PAT (82). Otro de los blancos de PhoP que posee un interés particular en este trabajo es el sRNA Mcr7, blanco que se logró establecer a través de Chip-Seq identificando además que Mcr7

controla negativamente la función del sistema de secreción TatABC asociado con virulencia, trabajo que será discutido en detalle más adelante (46). Este hallazgo significó la primera descripción funcional de un sRNA en Mtb, hecho que despertó aún más el interés que estas moléculas venían ganando, siendo los sRNAs de Mtb el tema de mayor interés para el presente trabajo.

c. Small RNAs

Los sRNAs hacen parte de un mecanismo regulador poco conocido que ha venido ganando protagonismo recientemente. Estos fueron identificados inicialmente en *Escherichia coli* (*E. coli*) (83, 84) aunque luego se describieron en muchas más especies bacterianas. Los sRNAs son pequeños transcritos de entre 50 a 500 nucleótidos (85) que pueden proceder de una secuencia génica única o ser procesados a partir de un RNA más largo. Generalmente son no codificantes, aunque se conocen algunos que pueden codificar para pequeños péptidos (84, 86). Estos sRNAs pueden poseer funciones reguladoras sobre la expresión génica (83, 87-89) requiriendo su asociación con la chaperona Hfq principalmente en bacterias Gram negativas (87, 90, 91). Esta chaperona es necesaria para la estabilización de los sRNAs y para su eficiente interacción con los RNAs mensajeros (mRNAs) blanco (92-98). La presencia e importancia de Hfq no es igual en todas las bacterias, algunas especies no la requieren para el funcionamiento de sus sRNAs, y en géneros como las micobacterias, no se ha descrito hasta el momento ningún homólogo para Hfq. Se ha postulado la hipótesis de que tal vez, el alto contenido de GCs en los sRNAs de las micobacterias favorezca una interacción con su mRNA blanco sin necesidad de una chaperona, o la presencia de chaperonas alternativas (99).

Fundamentalmente los sRNAs regulan la expresión principalmente al interferir con la traducción de genes o alterando la función de una proteína como tal (91, 100), mediando generalmente procesos de adaptación al estrés (39, 88). Un ejemplo es el sRNA SgrS de *E. coli* y *Salmonella* el cual favorece la adaptación al estrés por acumulación intracelular de glucosa fosfatada, limitando la entrada de glucosa y aumentando su salida (86). Además, SgrS codifica para un pequeño péptido, SgrT el cual disminuye la función de EIICB^{Glc}, un transportador importante de glucosa, promueve aún más la regulación intracelular de este carbohidrato (86, 101-103).

Básicamente los sRNAs se dividen en dos diferentes categorías, los transcritos codificados en *cis* (85, 100, 104), los cuales son codificados en la cadena opuesta a la de su gen blanco, funcionando como RNAs antisentido (AS) que unen de manera perfecta a su mRNA blanco (100, 104). Por otra parte, los transcritos codificados en *trans*, son moléculas codificadas en regiones intergénicas, los cuales regulan la traducción generalmente al unir de manera imperfecta sus nucleótidos con uno o varios mRNAs blanco, siendo este tipo de sRNA los que generalmente funcionan asociados a Hfq (100, 104, 105). Los sRNAs generalmente se unen al mRNA en lugares cercanos al sitio de unión con los ribosomas (RBS), compitiendo por este sitio e interrumpiendo la traducción del gen y favoreciendo su degradación por parte de la RNAasa E o RNasa III (100).

También hay aquellos sRNAs que se unen a sitios distintos al RBS favoreciendo la traducción al evitar la formación de estructuras secundarias o eludiendo la degradación ribonucleotídica por parte de la RNasa E al formar RNA de doble cadena (106). Ejemplos de estos, es el sRNA RNAlII de *Staphylococcus aureus*, el cual evita la formación de estructuras secundarias en el extremo 5'-UTR del mRNA del gen *hla* favoreciendo su unión con los ribosomas y con esto la traducción (84). El gen *hla*, codifica para la toxina α o α -hemolisina de este microorganismo, que es importante para la supervivencia intracelular (107, 108). Aquellos sRNAs que interaccionan con proteínas se encargan de modificar su actividad principalmente evitando (secuestro) o modificando su actividad enzimática. Un ejemplo común de este tipo de sRNAs son CsrB (carbon storage regulator) y CsrC, encontrados en *E. coli* (91,100), los cuales se unen y secuestran a la proteína de unión a RNA CsrA, también llamada regulador global, que es una proteína que se une al motivo GGA en el extremo 5' de un mRNA blanco controlando su estabilidad y traducción. Generalmente su función es negativa pero también se ha descrito que puede favorecer la traducción de los mRNAs. Se conoce que sus funciones están inmersas en el metabolismo del carbono, el “quorum sensing” y la motilidad entre otros (109-111).

En cuanto a sRNAs en Mtb, se han identificado alrededor de 2000 secuencias similares a sRNAs a través de tamizajes usando técnicas como RNA-seq, de los cuales, tan sólo un 20% han sido confirmados (34, 112). Se ha observado que la expresión de estos sRNAs cambia dependiendo de la fase de crecimiento de la bacteria y en respuesta a diferentes tipos de estrés (99). En un trabajo inicial, se lograron identificar 9 sRNAs por

Northern blot, 4 de ellos fueron transcritos codificados en *cis* (AS de *desA1*, *pks12*, *Rv1726* y *Rv1890c*) y 5 fueron transcritos codificados en *trans* (B11, B55, C8, F6 y G2). Se evaluó el nivel de expresión de estos sRNAs en diferentes condiciones de estrés similares a las que la bacteria debe enfrentar durante una infección; encontrando que el estrés oxidativo generaba los mayores cambios en el nivel de expresión de B11 (1,8 veces), B55 (2,4 veces), F6 (2,0 veces) y ASpks (2,5 veces) respecto a los cultivos no estresados (99). De manera muy interesante, al sobre-expresar B11, F6 y G2 en Mtb, se observaron defectos enormes sobre el crecimiento, incluso siendo letales (B11 y G2) (99). Esta evidencia experimental inicial, sugiere que estos sRNAs tienen una regulación muy fina y juegan un papel relevante como reguladores de diferentes procesos fisiológicos y relacionados con la virulencia de la micobacteria (99). Un reporte posterior identificó más sRNAs no sólo en Mtb, sino que también en otras micobacterias como BCG y la bacteria no patogénica *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) (113). De este trabajo se destaca la presencia de sRNAs comunes en las tres micobacterias, los cuales posiblemente regulan funciones celulares conservadas, mientras que aquellos que sólo se expresaban en Mtb podrían estar relacionados con la regulación de la patogenicidad, pudiendo ser blancos terapéuticos atractivos (113). Trabajos posteriores siguieron identificando sRNAs a través de técnicas de alto rendimiento como RNA-Seq o el secuenciamiento de sRNAs (sRNA-Seq) pero a pesar de todos los esfuerzos que han sido invertidos en los últimos años en este tema, sólo se conoce, la función biológica de dos sRNAs en Mtb. El primero de estos, Mcr7 (46), se describió en el año 2014 encontrando que su expresión era controlada por el factor de transcripción PhoP. También se reportó que Mcr7 controla negativamente la secreción a través de sistema TatABC al unirse al mRNA de TatC evitando su traducción. TatC es una proteína encargada de la selección de las moléculas que van a ser exportadas a través de este sistema, por tanto, una disminución de la expresión de TatC conlleva a una disminución en los niveles de secreción dependiente de TatABC. La regulación negativa de la expresión de Mcr7 traía como consecuencia un aumento en la secreción de proteínas dependientes de este sistema (46). De importancia, el sistema de secreción TatABC juega un papel en la virulencia de Mtb (114, 115), dado que a través de éste se exportan proteínas muy inmunógenas como el antígeno 85A (Ag85A) y Ag85C (46). El segundo sRNA con función conocida para Mtb es ncRv11846 o MrsI (“mycobacterial regulatory RNA in iron”), descrito en el 2018 el cual regula la respuesta anticipatoria a la inanición de hierro (39). En este artículo, se buscaba identificar a través de sRNA-Seq

los sRNAs más importantes en Mtb que responden al estrés, sometiendo a la micobacteria a condiciones como estrés de membrana, limitación de nutrientes, estrés oxidativo, estrés ácido y limitación de hierro. El sRNA MrsI mostró ser uno de los más inducidos en tres de las cinco condiciones de estudio y con el fin de conocer cuáles genes son regulados por dicho sRNA se llevó a cabo un análisis de RNA-Seq de Mtb durante un silenciamiento de MrsI en condiciones de hierro limitado a través de la técnica CRISPRi de *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*). Uno de los genes que se mostró altamente inducidos en consecuencia al silenciamiento de MrsI fue *bfrA*, una bacterioferritina encargada de almacenar hierro para la micobacteria en condiciones en las que el hierro es abundante. A través de mutaciones puntuales en MrsI y *bfrA* en los sitios predichos para la interacción sRNA-mRNA, se logró por primera vez en Mtb, confirmar verazmente una interacción física real entre este tipo de moléculas (39). El modelo que propuso este reporte es que cuando los niveles de hierro descienden en el medio se aumenta la transcripción de MrsI, de tal forma que se limite la expresión de proteínas no esenciales que usan hierro como lo es la bacterioferritina producto del gen *bfrA* y que además, este sRNA prepara a Mtb de manera anticipada para sobrevivir a un ambiente pobre en hierro (39).

Queda claro el potencial de los sRNAs como reguladores importantes sobre la expresión génica en Mtb. Observar como su nivel de transcripción se va modificando dependiendo de la fase de crecimiento (38, 116), como su sobreexpresión pueden conducir a la letalidad (99), sumado a todos los aspectos fisiológicos en los cuales pueden estar inmersos (117), ponen en manifiesto que la regulación mediada por los sRNAs debe encontrarse en una fina sintonía que asegure que Mtb pueda hacerle frente a todos los retos ambientales que una célula hospedera pueda significar y de esta forma, ser el patógeno tan exitoso que año tras año infecta cada vez más personas en todo el mundo. Queda un largo camino para comprender las redes de regulación comandadas por los sRNAs y a través de qué mecanismos estos logran impactar la biología de la micobacteria, siendo de especial interés aquellos sRNAs asociados a virulencia. Técnicas de silenciamiento genético como la interferencia de CRISPRi parece ser una alternativa poderosa que podría mostrarnos un camino para responder a estos interrogantes.

4.3 Generalidades de CRISPR

Una de las dificultades en el estudio de la función y esencialidad de los genes, es contar con herramientas de ingeniería genética adecuadas que faciliten dicho trabajo, la técnica de CRISPR se muestra como una herramienta atractiva para este reto ya que es una técnica relativamente simple, versátil, estable y programable (118), superando en gran medida los problemas que se presentaban con las tecnologías anteriores como las nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), y las nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALENs) los cuales requieren grandes esfuerzos en ingeniería que muchas veces no brindan los resultados esperados, ofreciendo bajas eficiencias para las modificaciones deseadas (118, 119).

CRISPR, del inglés “clustered regularly interspaced short palindromic repeats”, es una secuencia no codificante encontrada en el genoma del 50% de bacterias y cerca del 90% de arqueas (119-123). Estos organismos emplean a CRISPR como un sistema inmune adaptativo heredable a través del cual logran defenderse contra infecciones por elementos genéticos extraños como lo es un bacteriófago o un plásmido (124). CRISPR se encuentra conformado por un arreglo de secuencias repetitivas, que son intercaladas por otras secuencias específicas llamadas “spacers”, los cuales al ser transcritos y procesados dan lugar a los CRISPR RNAs (crRNAs). Corriente arriba de estas secuencias, se encuentra una región rica en AT conocida como “leader”, sitio después del cual se insertan nuevos “spacers”. Además, el “leader” sirve como secuencia promotora para la transcripción de los crRNAs (125-127). Cercanas al locus de CRISPR, se encuentran los genes asociados a CRISPR, genes *cas*, que codifican para las proteínas Cas principales del sistema que, en combinación con los crRNAs, dan origen al sistema CRISPR-Cas.

Básicamente, la inmunidad mediada por el sistema CRISPR-Cas consta de tres pasos, a través de los cuales una bacteria logra combatir una infección y genera “memoria” contra esta. En un primer paso llamado inmunización o adaptación, un complejo proteico, generalmente Cas1-Cas2 también llamado “módulo de adaptación” (128) derivado de los genes *cas*, fragmentan el DNA invasor y uno de estos fragmentos es insertado en la secuencia CRISPR, corriente a bajo del “leader”, generando entonces un nuevo “spacer” específico contra el genoma recién fragmentado. Un segundo paso llamado expresión, se presenta cuando hay una reinfección, en donde a partir del “spacer” insertado, se obtiene un crRNA largo llamado precursor de crRNA (pre-

crRNA), el cual será procesado y madurado a un fragmento crRNA corto que presenta la secuencia complementaria al genoma invasor con aproximadamente 20 nucleótidos. En el tercer paso llamado interferencia, dicho crRNA guiará a una proteína Cas del “módulo efector”, una enzima con dominios helicasa y nucleasa, la cual es la encargada de realizar un corte de cadena doble (“double strand break”, DSBs) sobre el DNA invasor lo que liberaría al microorganismo de la infección. Un requerimiento que presenta la nucleasa Cas en algunos tipos de sistemas CRISPR (tipo I y II) para llevar a cabo dicho corte, es la presencia de un PAM (Motivo Adyacente al “Protospacer”) (129) que se localiza enseguida de la secuencia complementaria al crRNA en el genoma invasor. Es a través de este PAM, que la proteína Cas puede diferenciar entre el genoma celular y el genoma invasor (120, 121, 123, 130, 131).

La clasificación actual de los sistemas CRISPR-Cas se basa en dos distintas clases (clase 1 y clase 2) las cuales se diferencian por la complejidad de su módulo proteico efector. Estas dos clases se dividen en diferentes tipos los cuales a su vez se subdividen en subtipos (131, 132). Uno de los más simples y estudiados es el sistema CRISPR clase 2 tipo II, en el cual encontramos la proteína efectora Cas9, una nucleasa que realiza DSBs a través de sus dos dominios catalíticos RuvC y NHN (Fig. 3.A) En estos sistemas CRISPR tipo II, para la maduración de los pre-crRNA es necesario que estos sufran una hibridación con una secuencia de RNA trans-activador (tracrRNA) codificado en el mismo locus CRISPR, el cual es parcialmente complementaria a los pre-crRNA. Este hecho permite que el duplex que se forma sea procesado por la RNasa III en presencia también de Cas9 generando un crRNA:tracrRNA maduro (133, 134).

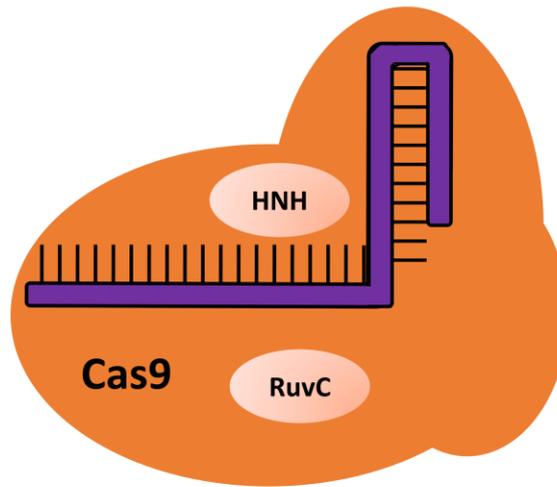
Recientemente el sistema CRISPR clase 2, en especial el tipo II de *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) ha sido implementado como la herramienta más prometedora para la manipulación del DNA en una gran variedad de células que va desde bacterias, parásitos, plantas hasta células mamíferas. Para la implementación de CRISPR como técnica de manipulación *in vivo*, se creó un RNA quimérico que fusiona el crRNA con el tracrRNA a través un “linker loop”; el producto de dicha fusión es llamado RNA guía (gRNA). El fundamento de esta técnica se basa en el diseño de un gRNA de 20 nucleótidos complementaria al locus de interés en donde se desea inducir cambios, el cual, debe estar precedido por la secuencia del PAM (NGG) (135), de esta forma, cuando dicho gRNA forma el complejo con la proteína Cas9, esta puede ser guiada de manera adecuada al sitio blanco para realizar el DSBs (Fig. 3.B). La reparación de este

corte se puede dar por recombinación de extremos no homólogos (NHEJs), proceso en el cual se agregan o pierden nucleótidos, llevando a una posible inactivación del gen blanco (135, 136), o por recombinación homóloga (HR) que permite la creación mutaciones específicas al proveer un DNA donante a la célula a editar (136-138). El sistema CRISPR-Cas9 es entregado al organismo que se desea manipular a través de diferentes métodos como por ejemplo la transformación de plásmidos, los cuales van a contener la secuencia del gRNA específico y la secuencia de la nucleasa Cas9. La herramienta CRISPR tipo II de *S. pyogenes* ha demostrado ser un sistema robusto y específico para la creación de mutaciones puntuales, inserciones y deleciones (indels), además de requerir un esfuerzo técnico relativamente simple. Dadas estas ventajas, ha sido aplicado para múltiples análisis en los diferentes campos de la ciencia, marcando así, el comienzo de una nueva era para la ingeniería genética (119).

Una adaptación de CRISPR que ha tenido mucha acogida ha sido la interferencia de CRISPR o CRISPRi, en la cual la proteína Cas9 es inactiva (119) al presentar una mutación en sus dos sitios catalíticos, lo que genera un nucleasa inactiva Cas9 deficiente o dCas que, de la misma manera que la proteína silvestre, puede ser dirigida por un gRNA hacia la secuencia blanco. En este contexto, el sistema CRISPRi asociado a la secuencia blanco, genera un bloqueo físico de la transcripción, desacoplando entonces la RNA polimerasa y silenciando el gen de interés. Esta adaptación ha sido empleada en bacterias como *Bacillus subtilis* (139), en *E. coli* también se ha trabajado ampliamente (140-143), en *Clostridium beijerinckii* (144), y de gran interés para el presente trabajo, en el patógeno humano, Mtb (145, 146, 147).

Una de las primeras investigaciones que utilizó el sistema CRISPR en micobacterias fue el desarrollado en el año 2015 por Choudhary y colaboradores (145). En este trabajo se implementó la técnica CRISPRi a partir del sistema CRISPR tipo II de *S. pyogenes* para el silenciamiento de genes en *M. smegmatis* y dos especies del complejo Mtb, H37Rv y BCG. Aquí, se empleó una estrategia en la cual se usaba un plásmido replicativo para la expresión de los gRNAs y un plásmido integrativo para la expresión de la proteína dCas9 codón optimizada, ambos vectores bajo el control del promotor myc1tetO que es inducible con ATC (145). Con esta metodología se lograron silenciar algunos genes micobacterianos para evaluar su esencialidad y se establecieron los determinantes cruciales para la aplicación óptima de la técnica, teniendo en cuenta la concentración de la ATC en el medio y los días de incubación. Se lograron niveles de silenciamiento de

A.



B.

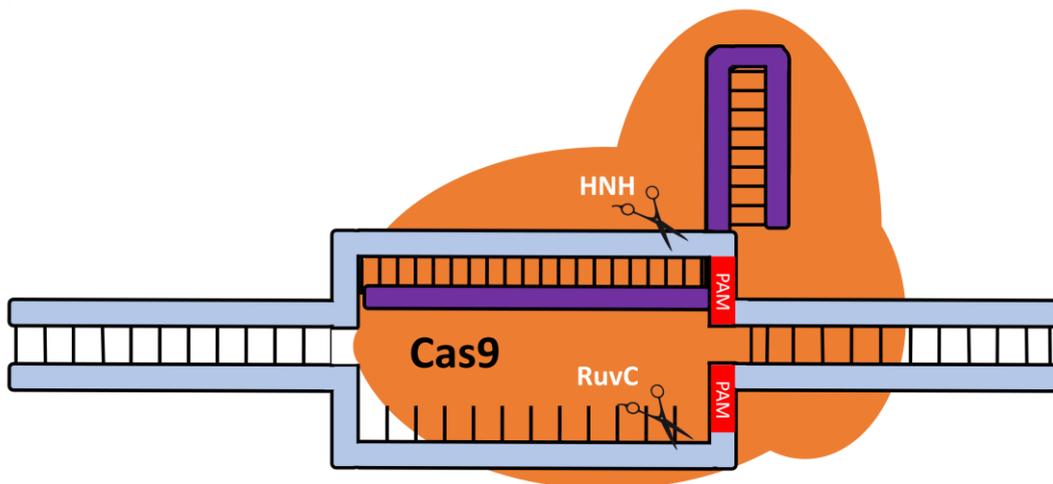


Figura 3: Esquema del sistema CRISPR-Cas9 tipo II: A. Se observa el “complejo Cas9” formado por la proteína nucleasa Cas9 unido al gRNA. B. Se esquematiza el complejo Cas9 asociado a la secuencia blanco. La proteína Cas9 identifica la secuencia PAM (en rojo) fomentando la apertura de la doble cadena de DNA, de tal manera que el gRNA pueda interactuar con la secuencia complementaria, momento en el cual se genera el corte de doble cadena sobre la secuencia de interés a través de los dominios catalíticos HNH y RuvC presentes en la proteína.

entre un 80% a 99% para los genes evaluados bajo las mejores condiciones experimentales tanto de los transcritos de RNA como también de las proteínas producto de estos genes, en comparación a una cepa control. Es importante señalar que los niveles de silenciamiento con esta técnica dependen de hacia qué cadena del DNA se dirige el gRNA y su posición, mostrando niveles de silenciamiento de bajos a nulos cuando se dirigen a la cadena molde en la región codificante de un gen, a lugares lejanos del sitio de inicio de la transcripción (TSS) o al extremo 3' de un gen. Por último, se informaron niveles de proteo-toxicidad a causa de la expresión de la proteína dCas9 en cultivos de más de dos semanas (145). Un segundo trabajo que utilizó CRISPRi en micobacterias se publicó en el año 2017 (147), en el cual se demostró que el sistema desarrollado por Choudhary (145) era sub-óptimo para el silenciamiento de genes en micobacterias y que además la sobreexpresión de la proteína dCas9 llevaba a la muerte de las bacterias por toxicidad. Iniciaron entonces, una búsqueda de alternativas de CRISPR en diferentes especies bacterianas que tuvieran un tamaño menor para la proteína Cas9 y así poder evitar la proteotoxicidad. Encontraron que el sistema CRISPR tipo II de *S. thermophilus* ofrecía mejores niveles de silenciamiento, alcanzando reducciones de hasta 216 veces la expresión normal de un gen con mínimos niveles de toxicidad (147). Cabe destacar que en esta estrategia se empleó un sólo plásmido (965), el cual posee una copia de la proteína dCas9 de Sth bajo el control de un promotor inducible por ATC y un sitio para la clonación de los gRNAs bajo el control de un promotor constitutivo, hecho que evita pasos adicionales volviendo más simple la aplicación de la técnica (147). Estas características indican que el sistema CRISPRi de *S. thermophilus* es claramente superior para el silenciamiento de genes en micobacterias siendo más simple, efectivo y menos tóxico, lo cual lo convierte en una herramienta atractiva para la ingeniería genética en Mtb.

4.4 Antecedentes al estudio del sRNA Mcr11

Con el fin de entender las diferencias fenotípicas entre los aislados clínicos UT127 y UT205 de Mtb ya mencionadas en la sección 4.1, en nuestro laboratorio (GICIG-UdeA) se realizó un análisis transcriptómico de estas bacterias en cultivos axénicos de 6 horas en medio rico 7H9 y en medio Sauton (25). Se observaron ciertas diferencias a nivel de expresión génica entre los dos aislados, pero interesantemente, se encontró que el sRNA Mcr11 se encontraba expresado 2,9 veces más en UT205 relativo a UT127. Este

sRNA, que ha sido nombrado de diferentes maneras (MTS0997 y ncRv11264c) y está presente únicamente en micobacterias del complejo Mtb (113), se encuentra ubicado entre los genes *rv1264*, una adenilato ciclasa (AC), y *rv1265* que codifica para el factor de transcripción AbmR el cual se induce en la infección, en altas concentraciones de AMP cíclico (AMPc) y bajo condiciones de hipoxia (148). Además, AbmR se autorregula y controla la expresión de Mcr11 (148). Teniendo en mente lo anterior, se plantea que la función reguladora de Mcr11 está inmersa en el metabolismo del AMPc. Esta idea es apoyada también por reportes en los que se muestra que la expresión de Mcr11 se modula dependiendo de las concentraciones de AMPc en el medio y de la presencia de la AC Rv1264 (116). Sumado a esto, Mcr11 parece responder ante condiciones de estrés al modular su expresión en condiciones de pH bajo (116), hierro (39) y nutrientes limitados (39), en dormancia (149) y además responde a la fase de crecimiento, mostrando mayores niveles de expresión en la fase estacionaria (38, 116, 150), momento en el cual los niveles de glucosa son bajos y los de AMPc son altos. Muy interesantemente, estudios han encontrado que Mcr11 se expresa durante la infección de ratones tanto en la enfermedad activa como crónica (116). Con este panorama, 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 tanto, teniendo en cuenta la expresión diferencial de Mcr11 entre los dos aislados clínicos y un posible papel relevante de este sRNA, se plantea la posibilidad de que Mcr11 sea el responsable de alguna de las diferencias fenotípicas observadas entre estas bacterias. Nos planteamos entonces la siguiente pregunta de investigación.

5. Pregunta de investigación

¿Qué papel regulador podría jugar el sRNA Mcr11 en la expresión génica de los aislados clínicos colombianos UT205 y UT127 y la cepa de laboratorio H37Rv?

6. Hipótesis

El sRNA Mcr11 participa en el metabolismo del AMPc a través de la represión, a nivel traduccional, de genes aledaños a su codificación en el genoma de Mtb.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Determinar el efecto regulador del sRNA Mcr11 sobre la expresión génica de los aislados clínicos colombianos UT205 y UT127 y la cepa de laboratorio H37Rv usando el sistema de silenciamiento CRISPRi-dCas9

7.2 Objetivos específicos

1. Verificar el silenciamiento del gen *mcr11* a través de qRT-PCR.
2. Evaluar el efecto fenotípico del silenciamiento del gen *mcr11* sobre el crecimiento de los aislados clínicos de Mtb.
3. Establecer genes potencialmente regulados por el sRNA Mcr11 en los aislados clínicos de Mtb a través de análisis por RNA-seq.
4. Determinar si existe alguna red de regulación mediada por el sRNA Mcr11 de importancia para el crecimiento de Mtb.
5. Evaluar el efecto del silenciamiento del gen *mcr11* sobre la muerte celular durante la infección por Mtb de macrófagos THP-1.

8. Metodología

8.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Mtb H37Rv (ATCC 27294) fue empleada en este estudio además de los aislados clínicos de Mtb UT127 y UT205 que fueron obtenidos del cepario registrado del Instituto Humboldt y almacenadas en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Estas bacterias fueron recuperadas de stocks preservados a -70 °C en glicerol (10%). Los cultivos bacterianos se realizaron en medio Difco™ Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson (BD)) suplementados con 10% OADC (BBL™ Middlebrook Enrichment BD) al v/v, 0,5% glicerol (99,5%) (SIGMA) al v/v y 0,05% de tyloxapol

(stock 20%) (SIGMA). Las condiciones estándar de incubación fueron a 37 °C en agitación en un agitador orbital (Thermo Fisher Scientific) (alrededor de 100 RPM). Cuando aplicaba, la bacteria se cultivó con 50 µg/mL de sulfato de kanamicina (Gibco) y 100 o 200 ng/mL de clorhidrato de anhidrotetraciclina (ATC) (Santa Cruz Biotechnology). El crecimiento de las bacterias se monitoreó al medir su densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) en cubetas de 2,5 mL (BRAND) con un espectrofotómetro SPECTRONIC 20 Genesys (Thermo Fisher Scientific). Para los experimentos de unidades formadoras de colonias se realizaron cultivos en platos con medio 7H10 Agar (Difco™ Middlebrook BD) suplementado de la misma forma que el medio 7H9 y con kanamicina a 50 µg/mL y ATC a 100 ng/mL y se incubaron a 37 °C por alrededor de 25 días.

8.2 Extracción de DNA

Este protocolo fue adaptado de uno previamente publicado (151). Brevemente, se tomaron cultivos de Mtb en fase exponencial y se centrifugaron a 3000 RMP por 10 min a 4°C para obtener un pellet de la bacteria. El pellet se resuspendió en 300 µL de agua libre de nucleasas (Ambion) y se sometió a una temperatura de 100°C por 5 minutos, para favorecer la lisis de la bacteria y que el DNA (genómico y plasmídico), fuera liberado. Se centrifugó nuevamente la bacteria en las mismas condiciones y se recuperaron 200 µL del sobrenadante. Cada DNA se almacenó a -20 °C para su evaluación por PCR.

8.3 Plásmido del sistema CRISPRi-dCas9 *S. thermophilus*

El plásmido PLJR965 (965) fue empleado para el silenciamiento genético, el cual fue obtenido del laboratorio de la investigadora Sarah Fortune de la escuela de salud pública de la Universidad Harvard. Este plásmido contiene una copia de la proteína dCas9 de *S. thermophilus*, un gen de resistencia a la kanamicina (selección), un promotor inducible por la ATC y un polilinker para la clonación de los gRNAs (Fig. 4).

8.4 Diseño de los RNA guías (gRNAs) y formación de los duplex

El diseño de los gRNAs se realizó con base a los parámetros definidos en el artículo de Rock y colaboradores (147). Las secuencias de los genes silenciados fueron obtenidas a través de la base de datos Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>) y sobre estas, se realizó una búsqueda inicial de la secuencia PAM (Motivo Adyacente al “Protospacer”), que para el caso del sistema CRISPRi de *S. thermophilus* es 5'-NNAGAAW-3' en la cadena complementaria del gen. En los casos donde no se encontró la secuencia PAM canónica, se seleccionaron PAMs alternativos definidos por Rock y colaboradores (147) que también ofrecen niveles óptimos de silenciamiento (147). A partir de la identificación del PAM, se seleccionaron alrededor de 20 nucleótidos corriente arriba (que fueran conservados entre las tres bacterias de estudio), contando a partir del siguiente nucleótido antes del PAM así: 3'-PAM→20N-5'. Estos “20” nucleótidos se nombran como el oligonucleótido “forward” (F) y su secuencia complementaria, es el oligonucleótido “reverse” (R) que juntos conforman el dúplex del gRNA. A cada uno de los oligonucleótidos se le agregó un adaptador; GGA al extremo 5' del oligonucleótido F y AAAC al extremo 5' del oligonucleótido R, con el fin de facilitar su clonación en el plásmido 965 del sistema CRISPRi. La lista de los gRNAs usados en este estudio se encuentra en la tabla 1. Cada oligonucleótido se incubó con su pareja (F y R) para generar un dúplex de la siguiente manera: Se agregaron 4 μL de cada oligonucleótido, en concentraciones de 100 μM, a 42 μL del buffer de alineamiento (conformado por 50 mM Tris (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) en tubos de PCR. El mix se incubó a 95 °C por 2 minutos y finalmente se disminuyó la temperatura de 0,1 °C/s hasta los 25 °C en un termociclador (Bio-Rad).

8.5 Clonación de los gRNA en el plásmido del sistema CRISPRi y su expansión en *E. coli*

Los gRNAs se clonaron en el plásmido 965 (Fig. 4). Inicialmente el plásmido se linealizó usando la enzima de restricción BsmBI (New England Biolabs) y se purificó a partir de un gel de agarosa al 0.8% para electroforesis de ácidos nucleicos. En un tubo de PCR se adicionó 1 μL (8.5 ng/μL) del plásmido linealizado con 2,5 μL del dúplex del gRNA específico (concentración final de 1 μM), 10 μL del buffer de la ligasa de DNA

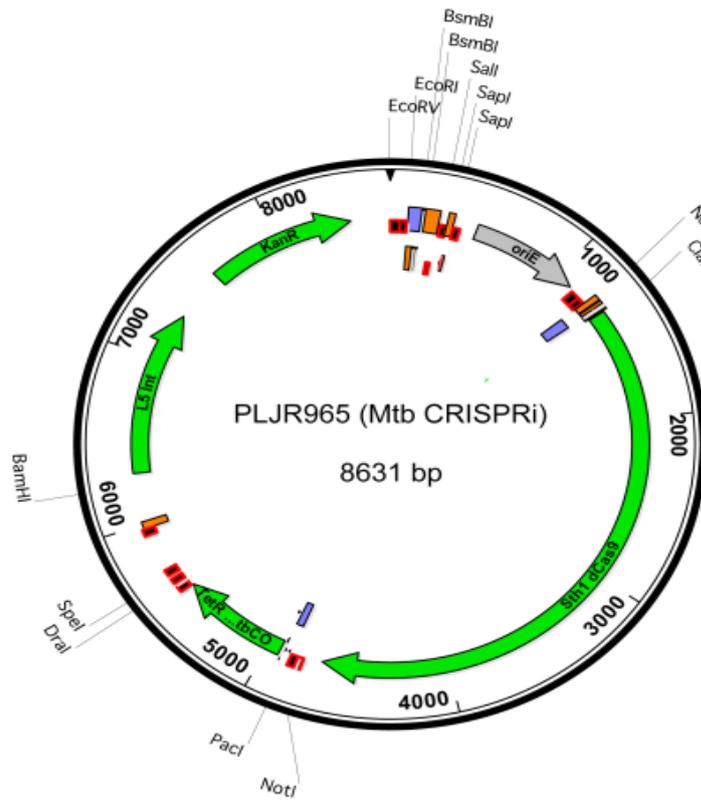


Figura 4: Mapa del plásmido 965: Se observa los componentes del plásmido 965 del sistema CRISPRi de *S. thermophilus*. Una copia de la proteína dCas9 (Sth1 dCas9), gen represor (TetR), gen de la proteína L5 integrasa (L5 Int), gen de resistencia a la kanamicina (KanR,).

T4, 1 μL de ligasa de DNA T4 (2'000.000 unidades/mL) y 5,5 μL de dH_2O , para una reacción final de 20 μL . Este mix se incubó a temperatura ambiente por 16-18 horas.

Para la expansión del constructo 965 (965-gRNA) se realizó una transformación de 2 μL del mix de ligación con 25 μL *E. coli* DH5 α (T1^R MAX Efficiency ONE SHOT de Invitrogen) a través de choque térmico por 30 segundos a 42 °C. La bacteria se seleccionó en platos de Luria Bertani (LB) agar (SIGMA) suplementado con kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron “overnight” a 37°C. Las colonias obtenidas fueron cultivadas en 7 mL de LB líquido con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) “overnight” y posterior a esto, se les realizó extracción del plásmido a través de “Miniprep” (QIAGEN). Los constructos 965-gRNA fueron sometidos a verificación por secuenciamiento SANGER con la compañía Genewiz (<https://www.genewiz.com/>) para corroborar la correcta clonación del gRNA. El DNA de los plásmidos que tenían el inserto (gRNA) correcto, fue almacenado a -20 °C.

8.6 Transformación de constructos en las cepas bacterianas y extracción de DNA para su verificación

Se prepararon bacterias competentes de la cepa de referencia H37Rv y los aislados clínicos UT127 y UT205 mediante varios lavados con PBS con 10% de glicerol y 0,05% de tyloxapol a 4 °C (47). Las células competentes se transformaron con el constructo 965-gRNA de la siguiente manera. En cubetas para electroporación de 0,2 cm (Gene Pulser/MicroPulserTM), se mezclaron 5 μL del constructo con el gRNA específico 965 (72 ng/ μL en promedio para cada constructo) con 100 μL de la bacteria. La cubeta fue sometida a un pulso de 2,5 kilovoltios, 25 μF y 1000 Ω (en el equipo para electroporación BIO-RAD GENE PULSER II). El contenido de la cubeta se transfirió a 2 mL de medio 7H9 completo fresco y se incubó por 24 h a 37 °C en agitación para que las bacterias puedan recuperarse antes de ser sometidas a la presión del antibiótico de selección (kanamicina). Al día siguiente, el volumen total de las bacterias se siembra en platos de 7H10 suplementados con kanamicina en diferentes volúmenes (500 μL , 300 μL , 200 μL y 50 μL) para la selección de las bacterias transformantes. Los cultivos se incubaron a 37 °C por ~20 días y posteriormente se seleccionaron 5 colonias las cuales se sembraron en medio 7H9 con kanamicina con el fin de generar un stock de bacterias que fue almacenado a -70 °C en glicerol al 10%. Como control para todos los

experimentos, se realizó la electroporación de las tres cepas de estudio con un plásmido 965 al cual no se le clonó ningún gRNA (al cual nos referiremos como 965 vacío). Además, se incluyó un control de electroporación que consiste en la transformación del plásmido pMV261.kan que contiene el gen GFP. Este control fue importante para confirmar que las bacterias competentes podían ser electroporadas eficazmente y además para poder establecer la multiplicidad de infección (MOI) al infectar las células THP-1 para los experimentos de viabilidad celular.

Se realizó también una extracción de DNA y amplificación por PCR de un fragmento que contenía una secuencia perteneciente al plásmido y al gRNA específico. Esto con la idea de corroborar la presencia del inserto (gRNA). Los “primers” usados para todas las PCRs confirmatorias se encuentran en la tabla 2. Los geles de agarosa al 1,5% (bromuro de etidio a 0,8 µg/mL) confirmatorios, se muestran en las figuras anexas 1.B y 2. También se realizó la confirmación por PCR de la electroporación del plásmido 965 control (plásmido vacío al que no se le clonó ningún gRNA) en las tres bacterias. Para esto se usaron primers específicos para la amplificación del gen de la proteína dCas9 dentro del plásmido (Fig. anexa 1.B) (Tabla 2).

8.7 Extracción de RNA y qRT-PCR

Para la extracción de RNA se empleó el kit RNeasy Plus Mini de QIAGEN. El pellet de la bacteria se recogió a través de centrifugación a 3000 RPM por 10 minutos a 4 °C. El pellet fue lavado 5 veces con agua libre de RNasas (2 veces) y con PBS (Gibco) (3 veces), de la siguiente forma: 2 lavados con PBS, 1 lavado con agua, 1 lavado con PBS y 1 lavado con agua. Todo esto con el fin de eliminar el antibiótico presente, el cual notamos que interfiere con la cuantificación del RNA obtenido. Luego, al pellet se le agregó 700 µL del buffer de lisis RLT suplementado con 2 beta mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) al 0,01% v/v. Se procedió entonces a realizar ciclos de congelación-homogeneización para los cuales la bacteria se transfirió a un tubo cónico Falcon de 50 ml y la parte inferior del tubo se sumergió en nitrógeno líquido por alrededor 12 segundos seguido de una homogeneización con el “Tissue Tearor Homogenizer” (BioSpec Products INC) por alrededor de 30 segundos. Este procedimiento se repitió tres veces finalizando con un lavado de la punta del homogeneizador con 300 µL del buffer de lisis usado en la primera parte. Todo el contenido del tubo cónico se transfirió

Tabla 1: Secuencias y PAMs de los gRNAs empleados para el silenciamiento de los genes indicados.

Nombre	Secuencia del duplex (oligonucleótido Forward y Reverse)	PAM	Gen a interferir
Mcr11	F-5'-GGGAAAGGCCGGCCGCGCAAGACCC-3' R-5'-AAACGGGTCTTGCGCGGCCGGCCTT-3'	GCAGAAG	<i>mcr11</i>
GroEl-1	F-5'-GGGAGTCGGTAACGAAGTATGCCGA-3' R-5'-AAACTCGGCATACTTCGTTACCGAC-3'	CAAGAAG	<i>groEl-1</i>
MmpL3	F-5'-GGGAACCCGGTTAACCAGCTTGCC-3' R-5'-AAACGGCAAGCTGGTTAACCGGGT-3'	CCAGAAG	<i>mmpL3</i>

Tabla 2: Secuencias de los primers empleados en este estudio

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Descripción
Primer 1834 (Rv)	5'-TTCCTGTGAAGAGCCATTGATAATG-3'	Usado para todas las verificaciones de bacterias transformantes en Figuras anexas 1 y 2
Oligo Fw <i>mmpL3-1</i>	5'-GGGAACCCGGTTAACCAGCTTGCC-3'	Usado para la verificación de bacterias transformantes con 965 + gRNA para silenciar <i>mmpL3</i> en Figura anexa 1.B
Oligo Fw <i>groEl-1</i>	5'-GGGAGTCGGTAACGAAGTATGCCGA-3'	Usado para la verificación de bacterias transformantes con 965 + gRNA para silenciar <i>groEl-1</i> en Figura anexa 1.B
Oligo Fw <i>mcr11-1</i>	5'-GGGAAAGGCCGGCCGCGCAAGACCC-3'	Usado para la verificación de bacterias transformantes con 965 + gRNA para silenciar <i>mcr11</i> en Figura anexa 2
Fw dCas9	5'-TACGTGCTGACCCTGAACAC-3'	Usado para la verificación de bacterias control transformadas con el plásmido 965 vacío en la Figura anexa 1.B y para la qRT-PCR de la Figura 5

Rv dCas9	5'-ACGAGGTGGTCTTCTGCTTG-3'	Usado para la verificación de bacterias control transformadas con el plásmido 965 vacío en la Figura anexa 1.B y para la qRT-PCR de la Figura 5
SigA RTF	5'-CCATCCCGAAAAGGAAGACC-3'	Control de amplificación en Figura 7
SigA RTR	5'-TCGAGGTCTGGTTCAGCGTC-3'	Control de amplificación en Figura 7
Fw SigA (qRT)	5'-CATGGTCGAGGTGATCAACAA-3'	Control de carga en Figura 5 y 8
Rv SigA (qRT)	5'-GGGTGATGTCCATCTCTTTGG-3'	Control de amplificación en Figura 5 y 8
<i>groEl-1</i> RTF	5'-TCGGTGTGCGACGTGTTCTCC-3'	Usado para verificar silenciamiento <i>groEl-1</i> en Figura 7
<i>groEl-1</i> RTR	5'-TAGTCACCTTGACCGGGTCG-3'	Usado para verificar silenciamiento <i>groEl-1</i> en Figura 7
Fw <i>mcr11</i>	5'-GTGACCAATCGAAAGTGCCG -3'	Usado para verificar silenciamiento <i>mcr11</i> en Figura 8
Rv <i>mcr11</i>	5'-GGTACACATGGGCAGACCC-3'	Usado para verificar silenciamiento <i>mcr11</i> en Figura 8

a tubos de 2 ml con zirconia y silica (Benchmark) de alto impacto (diámetro de 0,1 mm-TriplePure M-Bio grade) y se realizaron 6 ciclos de “beating” (amalgamador) a temperatura ambiente, cada uno por 30 segundos, espaciados por 1 minuto de reposo en hielo. El tubo fue centrifugado a 12000 RPM por 10 minutos a 4 °C y se tomaron 700 µL del sobrenadante los cuales fueron transferidos a un tubo de 1,5 mL. Fueron agregados 700 µL de etanol absoluto (Etanol anhidro, desnaturalizado VWR Life Science AMRESCO) y la mezcla se pasó a través de la columna de retención de RNA del kit RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN). Los pasos siguientes se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del kit (152).

Se realizó tratamiento con DNasa I (RNase-free (1 U/µL) Thermo Scientific) de la siguiente manera: Por cada microgramo de RNA a tratar, se agregó 1 µL del buffer (con MgCl₂) de la reacción, 1 µL de la enzima y se completó con agua libre de RNasas para una reacción final de 10 µL. Se incubó por 30 minutos a 37 °C y al finalizar se agregó 1 µL de EDTA (50 mM). Para todas las muestras se cargaron alrededor de 500 ng del RNA tratado para evaluar su integridad. Finalmente, a partir del RNA tratado se sintetizó cDNA con el kit SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). En este procedimiento agregamos a un tubo de PCR, 1 µL de “random hexamers, 1 µL de dNTPs (10 mM), nuestro RNA molde (entre 300 ng y 5 µg) y completamos con agua tratada con DEPC hasta alcanzar una reacción final de 13 µL. Incubamos esta mezcla por 5 minutos a 65 °C y luego por 1 minuto en hielo. Al finalizar se agrega a la mezcla, una reacción que estaba compuesta por 4 µL del buffer SSIV (5x), 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL del inhibidor de ribonucleasas y 1 µL de la enzima SuperScript IV (200 u/µL). Posteriormente, se incubó por 10 minutos a 23 °C, luego 55 minutos a 10 °C y por último 10 minutos a 80 °C. El cDNA se almacenó a -20 °C. La cuantificación de la expresión de los genes por qRT-PCRs fueron realizadas usando el kit SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen), en el equipo de PCR en tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Para determinar las veces de cambio para la expresión de un gen, inicialmente se determinó la eficiencia de la amplificación para el dicho gen de interés y del gen control, que para todos los casos fue *sigA*, esto para asegurar que dichas eficiencias no difieran en más de un 20%. La reacción se optimizó cuando se encontraron diferencias mayores entre las eficiencias. Tomando los valores del “threshold cycle” (Ct) de un gen evaluado,

se determinaron las veces de cambio aplicando el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ como se describe en la referencia (153)

8.8 Experimentos de esencialidad

Para observar los efectos del silenciamiento de ciertos genes sobre el crecimiento de Mtb, las bacterias se crecieron a OD₆₀₀ de entre 0,8 y 1,0. A estos cultivos se les realizó una dilución 1/1000 usando medio 7H9 con kanamicina y ATC a 100 ng/mL con el fin de inducir la expresión de los constructos del sistema CRISPRi (proteína dCas9 y gRNA) en las bacterias evaluadas. El crecimiento de los cultivos fue monitoreado por alrededor de 26 días, al determinar su OD₆₀₀ teniendo como control, una cepa que contenía el plásmido 965 vacío.

8.9 Secuenciamiento de RNA

Con el fin de determinar los genes regulados por Mcr11 se obtuvo RNA de las cepas H37Rv, UT127 y UT205 que tuvieran el constructo para el silenciamiento de Mcr11 y de la cepa control con el plásmido 965 vacío para cada una de las bacterias, todo esto por triplicado, de tal forma que se obtuvieron 18 transcriptomas (Fig. 10). Se siguió el protocolo previamente descrito (39). Brevemente, cultivos de las tres bacterias, con una OD₆₀₀ de entre 0,8-1,0 e incubados en presencia de kanamicina y ATC a 100 ng/mL, fueron diluidos hasta una OD₆₀₀ de 0,1 en medio 7H9 con kanamicina y ATC a 200 ng/mL y se incubaron por 48 horas tras las cuales se realizó extracción de RNA. Esta extracción de RNA se realizó de la misma manera que en la sección 8.7 con la excepción de que tras la centrifugación posterior al “beat-beating”, se realizó una eliminación del DNA genómico (gDNA) al pasar el RNA a través de las columnas de eliminación de gDNA del kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN). Terminando este paso, se continuó con el mismo procedimiento indicado en la sección 8.7, partiendo de la adición de etanol absoluto. De cada uno de los 18 transcriptomas obtenidos, se tomó un volumen total que contuviera 8 µg de RNA, que fue entonces precipitado en 0,1 volúmenes de acetato de sodio (VWR Life Science AMRESCO) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente, estas 18 muestras fueron enviadas a la compañía MacroGen (<https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>) para su secuenciamiento.

a. Control de calidad de los transcriptomas, construcción de librerías, secuenciamiento y análisis bioinformático

El control de calidad de las 18 muestras de RNA fue determinado al calcular el Número de Integridad del RNA (RIN) a través del 2100 Bioanalyzer (Agilent). La construcción de las librerías se realizó usando el kit de la empresa Illumina tipo “TruSeq stranded mRNA”, y el tamaño fue determinado usando la tecnología 2100 Bioanalyzer. El secuenciamiento se realizó en la plataforma Illumina con la máquina HiSeq 4000. Los reads fueron de tipo “Paired-end” con un tamaño de 151 pb.

Los datos crudos se alinearon con el software Bowtie 2 ([bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/](http://bio.sourceforge.net/bowtie2/)) y los conteos se realizaron usando el paquete HTseq. Se realizó una filtración de los datos para evitar el ruido que producen los genes con muy baja expresión (“1 count per million”). Usando el paquete EdgeR (Bioconductor) (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>) se realizó una normalización a través del método TMM (del inglés Trimmed Mean of M-values) por pares, es decir, las tres réplicas con silenciamiento de Mcr11 frente a las tres réplicas control de cada bacteria (H37Rv, UT127, UT205). Este paso con el fin de normalizar los tamaños de las librerías. Los genes diferencialmente expresados (DEGs) se determinaron usando el test exacto de Fisher.

Para definir la agrupación de las muestras, se utilizó el método de reducción de dimensionalidad “Multidimensional scaling” (MDS). Para esto se emplearon los conteos de las librerías normalizadas usando EdgeR. Los “heatmap” se realizaron usando los “counts per million” través del paquete pheatmap (<https://www.rdocumentation.org/packages/pheatmap/versions/1.0.12/topics/pheatmap>) y aplicando a los datos la formula Z score que le asigna el nivel de regulación a cada gen. Los Volcano plots se realizaron con el paquete EnhancedVolcano (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/EnhancedVolcano.html>) tomando el logaritmo en base 2 del “Fold change” (Log₂ FC) y el valor P.

8.10 Experimentos de infección a macrófagos

Los experimentos para evaluar la viabilidad celular tras la infección de macrófagos, fueron realizados utilizando el siguiente procedimiento. Las condiciones generales de crecimiento de las células empleadas en este estudio fueron en medio RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco) a 37 °C bajo una concentración de 5% de CO₂.

Células THP1 (ATCC TIB-202) fueron diferenciadas a macrófagos durante 48 horas en medio RPMI-1640, usando una concentración de 100 ng/mL de Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA, SIGMA) en platos de seis pozos (2 millones de células por pozo) (Corning) por dos días. Las células posteriormente se dejaron reposar en medio fresco RPMI-1640 por 24 horas, tras las cuales, fueron infectadas por 8 horas, con el aislado clínico UT205-965 (control) y UT205-Mcr11, que anteriormente habían sido cultivados en medio 7H9 con ATC (100 ng/mL) por 24 horas. La multiplicidad de infección (MOI) para esta infección fue de 10:1. Cabe señalar que pasadas las primeras 4 horas de infección se realizó un cambio del medio RPMI-1640, por un medio fresco con ATC (100 ng/mL), incubándose entonces, por 4 horas más. Al finalizar el tiempo de infección, las células fueron desprendidas de los platos usando 1 mL de Acutasa (Thermo Fisher Scientific) por 20 min a 37 °C y fueron entonces, teñidas con yoduro de propidio (PI), (0,005 µg/µL), Hoechst (0,015 µg/µL) y DIOC6 (5 µM) para evaluar su análisis de viabilidad celular por citometría de flujo en el equipo BD LSRFortessa. Este experimento se realizó tres veces de manera independiente, cada una por triplicado.

Para la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó el mismo procedimiento anterior, hasta terminar las 8 horas de infección. Luego de esto, las células fueron lisadas usando 1 mL de agua destilada con tyloxapol al 0,05%. A partir de los lisados, se generaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) y 5 µL de cada una fue plateada en medio sólido 7H10. Los cultivos se incubaron por alrededor de 25 días a 37 °C. Este experimento fue realizado por triplicado.

9. Resultados

9.1 Verificación del funcionamiento de CRISPRi de *S. thermophilus* en Mtb

Debido a que, hasta el momento, la herramienta CRISPRi de *S. thermophilus* es la que mejores resultados ofrece en cuanto al silenciamiento génico en Mtb (147), optamos por dicha técnica para el desarrollo de este trabajo. Con el fin de corroborar la funcionalidad de la técnica bajo nuestras condiciones, se realizaron los experimentos que se describirán a continuación.

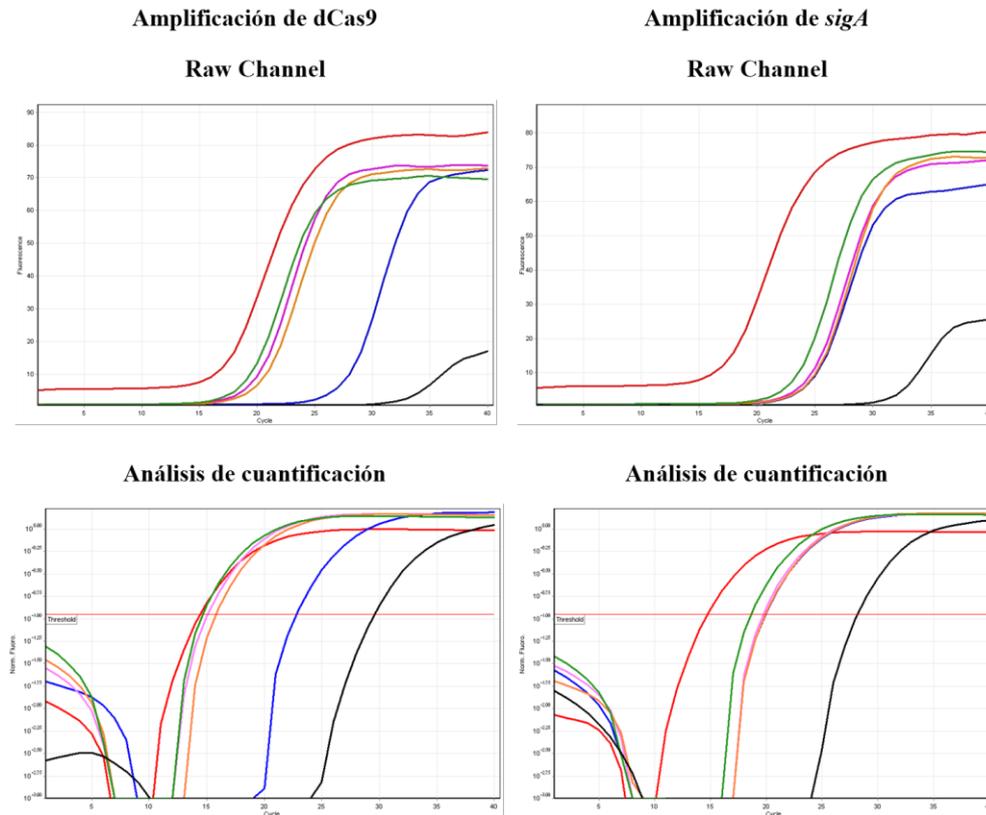
a. Verificación de la inducción de la proteína dCas9

Las cepas UT127, UT205 y H37Rv que contenían el plásmido 965 fueron cultivadas en medio 7H9 con kanamicina y ATC a 200 ng/mL y como control “sin inducción” se incluyó un cultivo de H37Rv incubado en ausencia de ATC. Se incubaron por 48 horas, tras las cuales se realizó extracción de RNA (como se indica en la sección 8.7) y síntesis de cDNA. A través de una qRT-PCR se determinó el nivel de expresión a nivel de mRNA de la proteína dCas9 en los cultivos que crecieron en presencia del inductor ATC comparados con el control sin inducción (Figura 5). UT127, UT205 y H37Rv mostraron 128, 116,16 y 181,02 veces mayor expresión del mRNA de la proteína dCas9 relativo a H37Rv sin inducción, como se observa en la figura 5.B. Estos resultados confirman que es posible controlar la expresión de la proteína dCas9 y, por ende, el silenciamiento génico.

b. Silenciamiento del gen esencial *mmpL3*

El transportador de membrana MmpL3 es una proteína esencial para el crecimiento de Mtb, debido a que facilita la salida de los ácidos micólicos que van a ser parte de la estructura de la pared celular de la micobacteria (154). Un silenciamiento de este gen a través de la técnica CRISPRi sería fácilmente identificable, debido a que la bacteria no lograría crecer en el medio de cultivo, siendo esto, una prueba de que la herramienta es funcional. Por tal razón, decidimos diseñar un experimento para poner a prueba la técnica al silenciar el gen *mmpL3*. Dos colonias de la cepa UT205 que albergan el

A.



B.

Inducción de la proteína dCas9

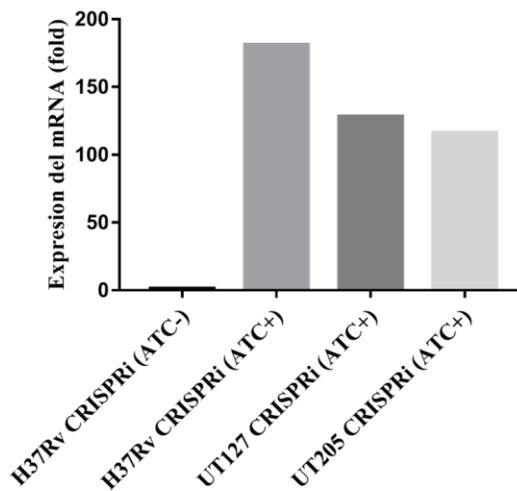


Figura 5: Verificación de la inducción de la proteína dCas9: A. qRT-PCR para la amplificación de dCas9 (izquierda) y el “housekeeping gene” *sigA* (derecha). Las gráficas de la parte superior muestran la amplificación en valores crudos y las de la parte inferior muestran el análisis de la cuantificación, tanto para dCas9 como para *sigA*. Para cada gen, las líneas roja y negra representan la amplificación del control positivo (plásmido 965) y del control negativo (agua) respectivamente. El cDNA de cada bacteria fue agregado en una dilución 1/10 que albergara cantidades iguales de ácido nucleico. La línea azul representa la amplificación para H37Rv que creció en ausencia de ATC (ATC⁻) y las líneas rosada, anaranjada y verde representan la amplificación en H37Rv, UT127 y UT205 que crecieron en presencia de ATC (ATC⁺) respectivamente. B. Cuantificación relativa del nivel de expresión del mRNA de dCas9 en las bacterias indicadas.

constructo con el gRNA para el silenciamiento del gen esencial *mmpL3* (965-1 y 965-2) y dos colonias control con el plásmido 965 vacío (*mmpL3*-1 y *mmpL3*-2) fueron sembradas en medio 7H9 con kanamicina. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de entre 0,8-1,0, fueron diluidos 1/1000 en medio 7H9 con kanamicina y ATC a 100 ng/mL. Los cultivos se incubaron y el crecimiento bacteriano fue monitoreado por varios días a través de la medición de OD₆₀₀ (Fig. 6.A). Se encontró, que cuando la bacteria crece en presencia del inductor del sistema ATC (ATC+) y posee el gRNA específico para el silenciamiento del gen esencial *mmpL3*, la bacteria es incapaz de crecer (Fig. 6.A y 6.B) a diferencia los controles, los cuales tanto en presencia como en ausencia de ATC eran capaces de crecer de manera normal (Fig. 6.A). Se realizó un experimento similar para H37Rv, en el cual se incluyó un cultivo de la cepa con el gRNA para el silenciamiento de *mmpL3* y el control 965 vacío, ambos en presencia de ATC (ATC+) arrojando resultados similares al de UT205 (Fig. 6.C).

c. Verificación del silenciamiento del gen *groEL1* por PCR

La proteína GroEL1 de Mtb es una chaperona tipo Hsp60 que no es esencial para el crecimiento de la bacteria. Esta característica es útil si se quiere corroborar a nivel molecular el silenciamiento de un gen usando la técnica de CRISPRi, debido a que, si este fuese esencial, la obtención del RNA se vería limitada por el defecto en el crecimiento bacteriano. El aislado clínico UT127 que albergaba el gRNA específico para el silenciamiento del gen *groEL1* fue cultivado en medio 7H9 con kanamicina en presencia del inductor ATC a 100 ng/mL (ATC+) y en ausencia de este (ATC-) por 2, 3 y 4 días, tras los cuales se realizó extracción de RNA. El RNA fue tratado con DNasa I para eliminar el gDNA y a partir de este se sintetizó cDNA para el montaje de una PCR semicuantitativa (Fig. 7). Se usaron primers específicos para la amplificación de *groEL1* y *sigA*, como control de carga (“housekeeping”) (Tabla 2). Los productos de PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Se realizó un registro fotográfico de los geles para su análisis por densitometría a través del software ImageJ. Los picos que se generaron a partir de las bandas de los dos genes amplificados (*groEL1* y *sigA*) en los diferentes días y bajo las dos distintas condiciones permitieron obtener valores de áreas bajo la curva. La cuantificación de la expresión del mRNA de GroEL1 en cada una de las condiciones se realizó a través de la siguiente fórmula: Área del pico de GroEL1/ área del pico de *sigA*.

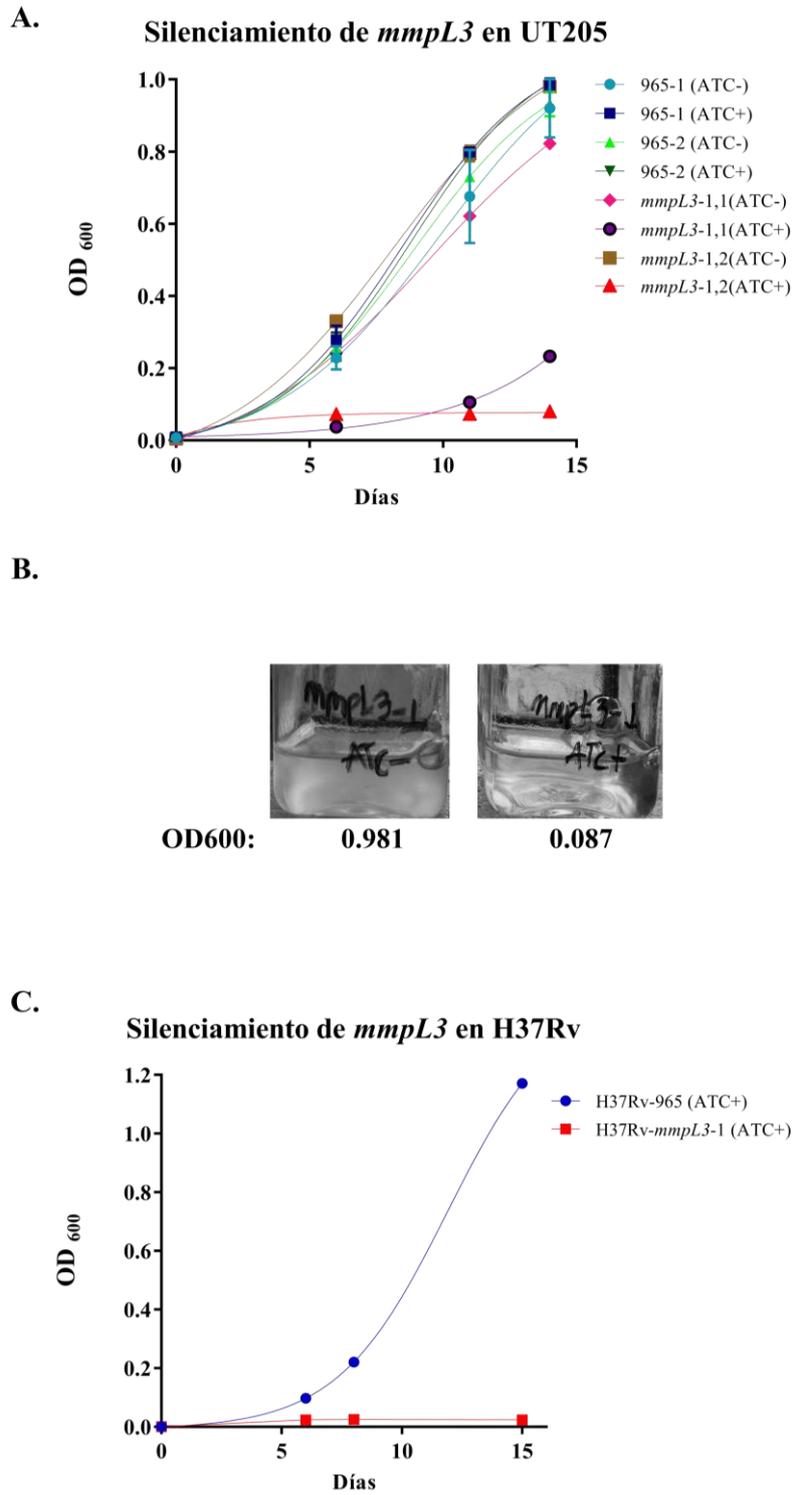


Figura 6: Silenciamiento del *mmpL3* a través de CRISPRi: A. Silenciamiento de *mmpL3* en el aislado clínico UT205. Se observa el crecimiento de dos colonias control (965-1 y 965-2) y dos colonias que albergan el gRNA específico para el silenciamiento de *mmpL3* (*mmpL3*-1.1 y *mmpL3*-1.2) en presencia (ATC+) y en ausencia (ATC-) de ATC. **B.** Fotografía representativa de dos cultivos de UT205 que albergan el gRNA para el silenciamiento de *mmpL3*, a la izquierda se observa esta bacteria en ausencia (ATC-) y a la derecha en presencia (ATC+) de ATC. Bajo los cultivos se anota las OD₆₀₀ de los cultivos a 15 días de incubación. **C.** Silenciamiento de *mmpL3* en H37Rv. Se observa el crecimiento una colonia control (H37Rv-965) y una colonia que alberga el gRNA específico para el silenciamiento de *mmpL3* (H37Rv-*mmpL3*-1), ambas en presencia (ATC+) de ATC.

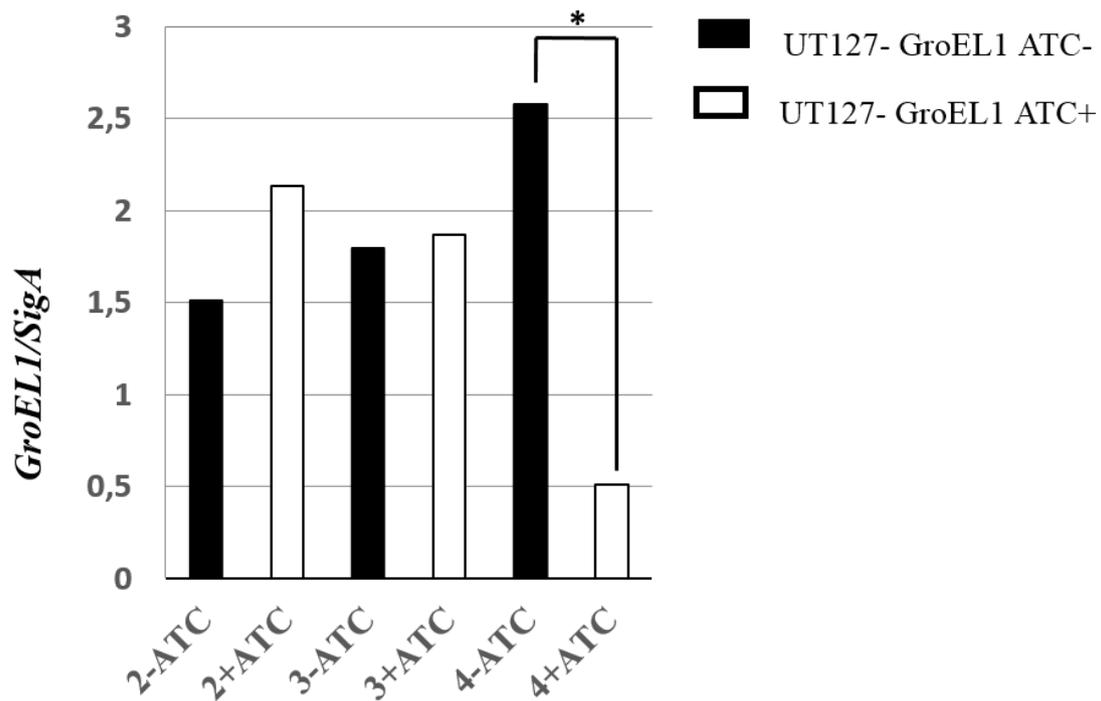


Figura 7: Verificación molecular del silenciamiento de GroEL1 a través de CRISPRi: Semicuantificación del silenciamiento de GroEL1 relativo al gen *sigA* en UT127. Se observa al cuarto día de silenciamiento, una disminución significativa de la expresión del gen *groEL1*, cuando la bacteria se cultivó en presencia de ATC (UT127- GroEL1 ATC+), comparada con su expresión en ausencia de la misma (UT127-GroEL1 ATC-) para el mismo periodo de tiempo. El * señala una tendencia significativa.

Los resultados de esta cuantificación se muestran en la figura 7 e indican que la técnica de CRISPRi es capaz de silenciar genes en Mtb.

En conjunto estos resultados manifiestan que la técnica de CRISPRi de *S. thermophilus* funciona adecuadamente para el silenciamiento de genes en H37Rv y en los aislados clínicos UT127 y UT205 bajo nuestras condiciones experimentales.

9.2 Efecto del silenciamiento de Mcr11 sobre el fenotipo de Mtb

Tras la verificación de la funcionalidad de la técnica de CRISPRi de *S. thermophilus* en estas bacterias, pudimos empezar a estudiar el papel del sRNA Mcr11 en la fisiología de Mtb. Para esto, diseñamos el gRNA Mcr11 específico para su silenciamiento. En la figura 8.A se esquematiza la región de *mcr11* que es asociada con el gRNA. Se confirmó el silenciamiento de este gen a través de qRT-PCR en las bacterias UT205 y UT127. Para cada bacteria se incluyó la cepa control 965 (UT127-965 y UT205-965) y la cepa que albergaba el gRNA específico para el silenciamiento de *mcr11* (UT127-Mcr11 y UT205-Mcr11), las cuales fueron cultivadas en medio líquido 7H9 en presencia de 100 ng/mL de ATC por 24 y 48 horas para UT205 y por 24 horas para UT127 (de manera circunstancial, no se realizó análisis a 48 horas para este aislado clínico). El silenciamiento por 24 y 48 horas en UT205, generó una reducción de la expresión de Mcr11 del 75% y el 83.85% respectivamente, para la cepa que albergaba el gRNA específico comparado con el control. En el caso de UT127, se alcanzaron niveles de reducción del 50.25% la expresión del gen, comparado el control en 24 horas de silenciamiento (Fig. 8.B).

Después, determinamos el efecto del silenciamiento de Mcr11 sobre el crecimiento axénico de la bacteria en un medio líquido. Para esto, las cepas control 965 y las que tenían el gRNA para el silenciamiento de Mcr11 en las tres bacterias de estudio, fueron cultivadas en medio 7H9 en presencia de 100 ng/mL del inductor ATC y seguimos su crecimiento por alrededor de 26 días. Para las tres bacterias se observó una disminución parcial en el crecimiento, mostrando un efecto distinto para cada bacteria. El defecto en el crecimiento se observó muy marcado en UT205, seguido de UT127 y por último H37Rv (Fig. 9.A). Con el fin de observar este fenómeno con mayor claridad realizamos el mismo experimento usando el doble de concentración de ATC, es decir, 200 ng/mL.

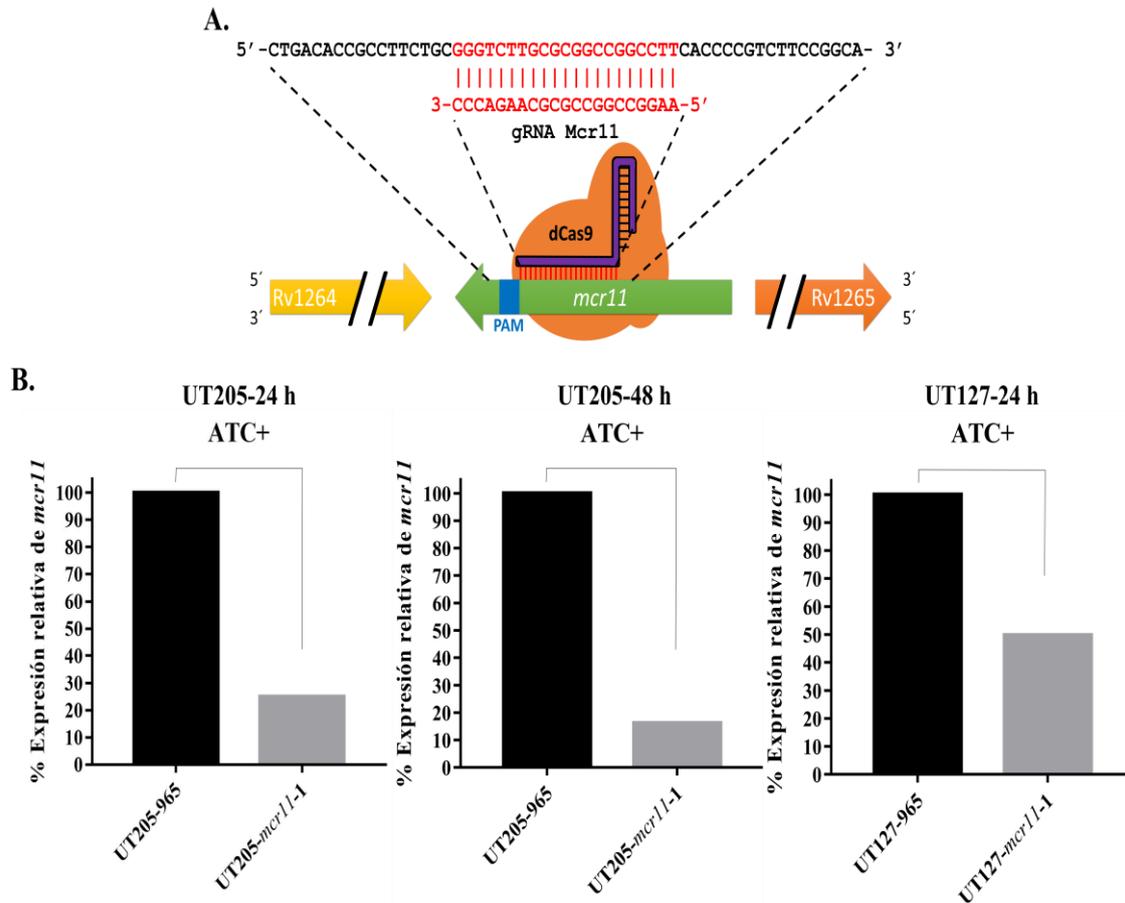
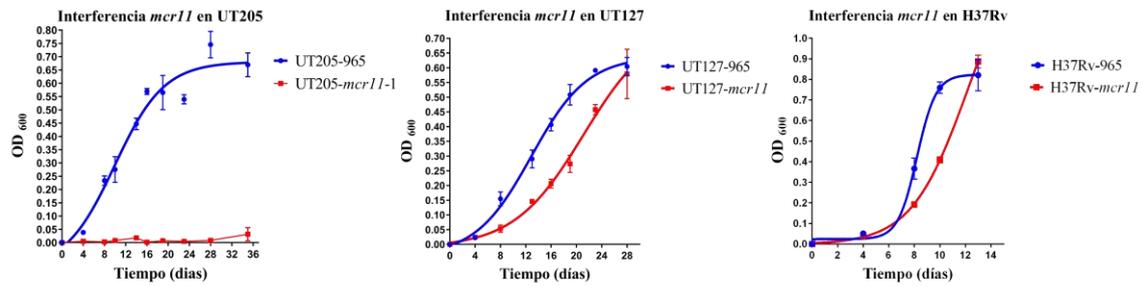


Figura 8: Verificación molecular del silenciamiento de Mcr11 a través de CRISPRi: A. Se esquematiza el gRNA Mcr11 formando un complejo con la proteína dCas9, los cuales se posicionan sobre el gen *mcr11* con el fin de silenciarlo. En rojo se muestra la secuencia del gRNA Mcr11 que interacciona con la secuencia complementaria en *mcr11*. **B.** Cuantificación relativa (*sigA*) de la expresión de Mcr11 en UT205 (24 y 48 horas) y en UT127 (24 horas) al silenciar el sRNA en presencia de 100 ng/mL de ATC. Controles: UT205-965, UT127-965. Bacterias con silenciamiento de Mcr11: UT205-*mcr11-1*, UT127-*mcr11-1*

A.



B.

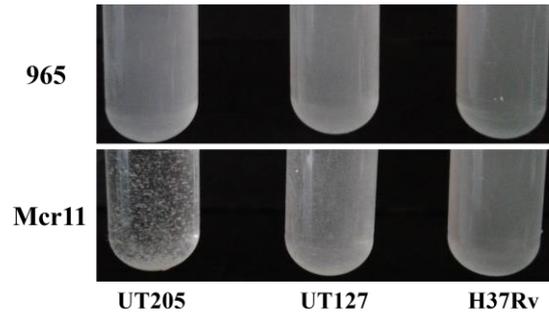


Figura 9: Efecto fenotípico del silenciamiento de *Mcr11* en *Mtb*: A. Curvas de crecimiento obtenidas a través de la medición de la OD₆₀₀ de las bacterias indicadas, las cuales se sembraron en medio líquido 7H9 en presencia de 100 ng/mL de ATC. Experimento realizado por triplicado para cada cepa analizada **B.** Fotografía de los cultivos indicados sembrados en medio líquido 7H9 en presencia de 200 ng/mL de ATC. Controles: UT205-965, UT127-965, H37Rv-965 Bacterias con silenciamiento de *Mcr11*: UT205-*mcr11-1*, UT127-*mcr11*, H37Rv-*mcr11*.

En estas condiciones no fue posible medir la OD₆₀₀ debido a que UT205 tomó un fenotipo muy interesante de agregación, en donde las bacterias no lograban resuspenderse a pesar de la agitación por medio de vortex aplicada al cultivo (Fig. 9.B). Estos resultados sugieren fuertemente que Mcr11 cumple un papel relevante sobre el crecimiento de la micobacteria, por consiguiente, un análisis transcriptómico podría ayudarnos determinar a través de qué mecanismo este sRNA logra dichos efectos.

9.3 Análisis transcriptómico del silenciamiento de Mcr11

Con el fin de conocer la función reguladora de Mcr11 en Mtb, identificar sus posibles blancos regulatorios y tratar de definir las posibles causas de las diferencias fenotípicas cuando es silenciado en cada una de las bacterias de estudio, decidimos realizar un análisis por RNA-Seq de las tres cepas de Mtb (H37Rv, UT127 y UT205) durante el silenciamiento del sRNA por 48 horas, usando el gRNA Mcr11 (Fig. 8.A) y comparándolo con los controles (965 en cada bacteria) por triplicado para cada una de las bacterias (18 transcriptomas en total). Tras la extracción del RNA, 500 ng de cada una de las muestras fueron cargados en un gel de agarosa al 1,2% (bromuro de etidio a 0,8 µg/mL) para evaluar su integridad (Fig. 10), en donde de manera general, se observó una buena integridad del material extraído.

Al determinar el RIN de las muestras de RNA se observó una contaminación de DNA genómico que afectó el RIN (Fig. 11.A y 11.B) pero al realizar un análisis posterior (mapeo de los “reads” sólo a una cadena del cromosoma) determinamos que muy posiblemente se trataba de DNA plasmídico (constructo del sistema CRISPRi), por lo cual no hubo una mayor afectación del conteo de “reads”. En cuanto a la construcción de las librerías, se generaron fragmentos de alrededor de 400 pb, tamaño que fue determinado usando la tecnología 2100 Bioanalyzer. Todas las muestras se mostraron satisfactorias en este paso (Fig. 11.C). El total de reads generados tras el secuenciamiento de RNA para cada muestra se puede observar en la figura 11.D. Las puntuaciones de calidad (Q20 y Q30) para la secuenciación se presentan en la figura 11.E. Se observó que la calidad del secuenciamiento fue óptimo al encontrar que, para todas las 18 muestras, más del 90% de las bases secuenciadas poseen una puntuación Q30, lo que quiere decir que la precisión del secuenciamiento fue de un 99,9% (155).

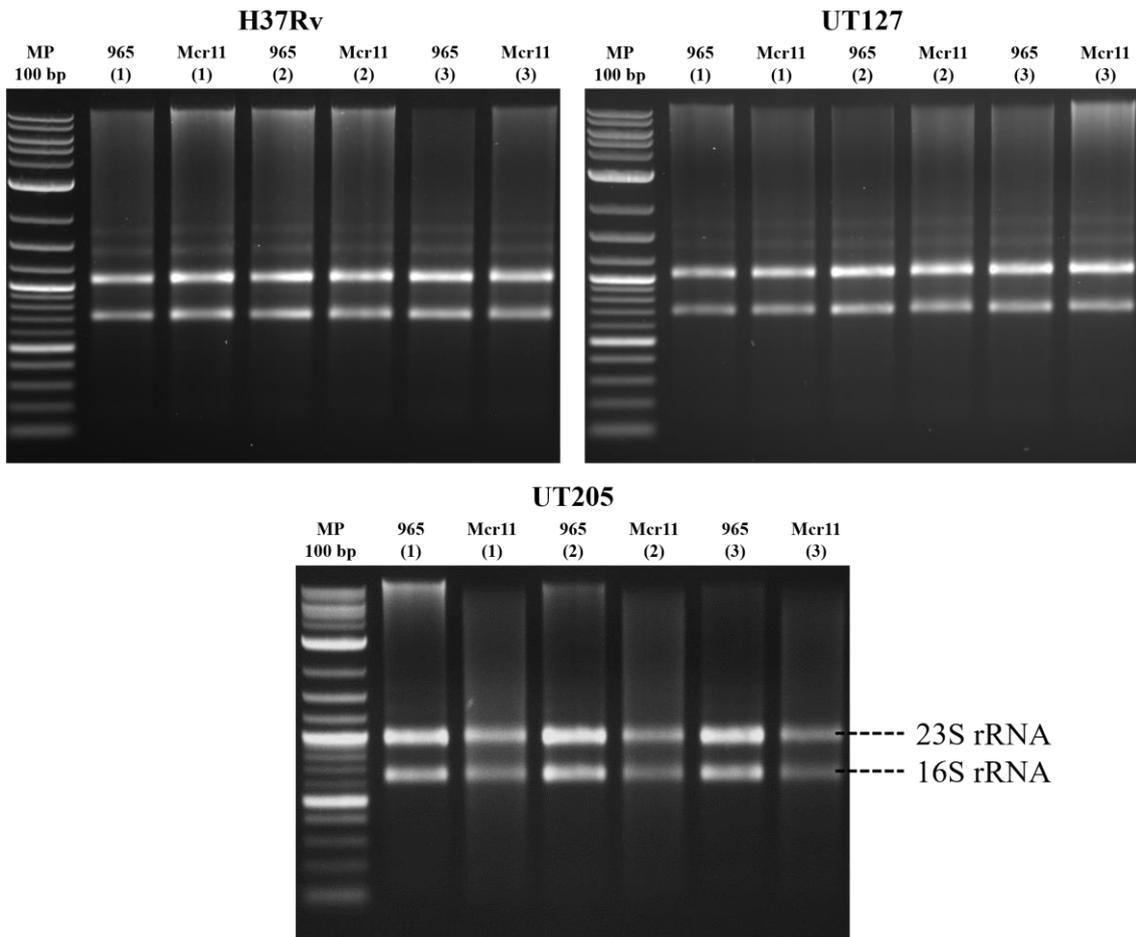
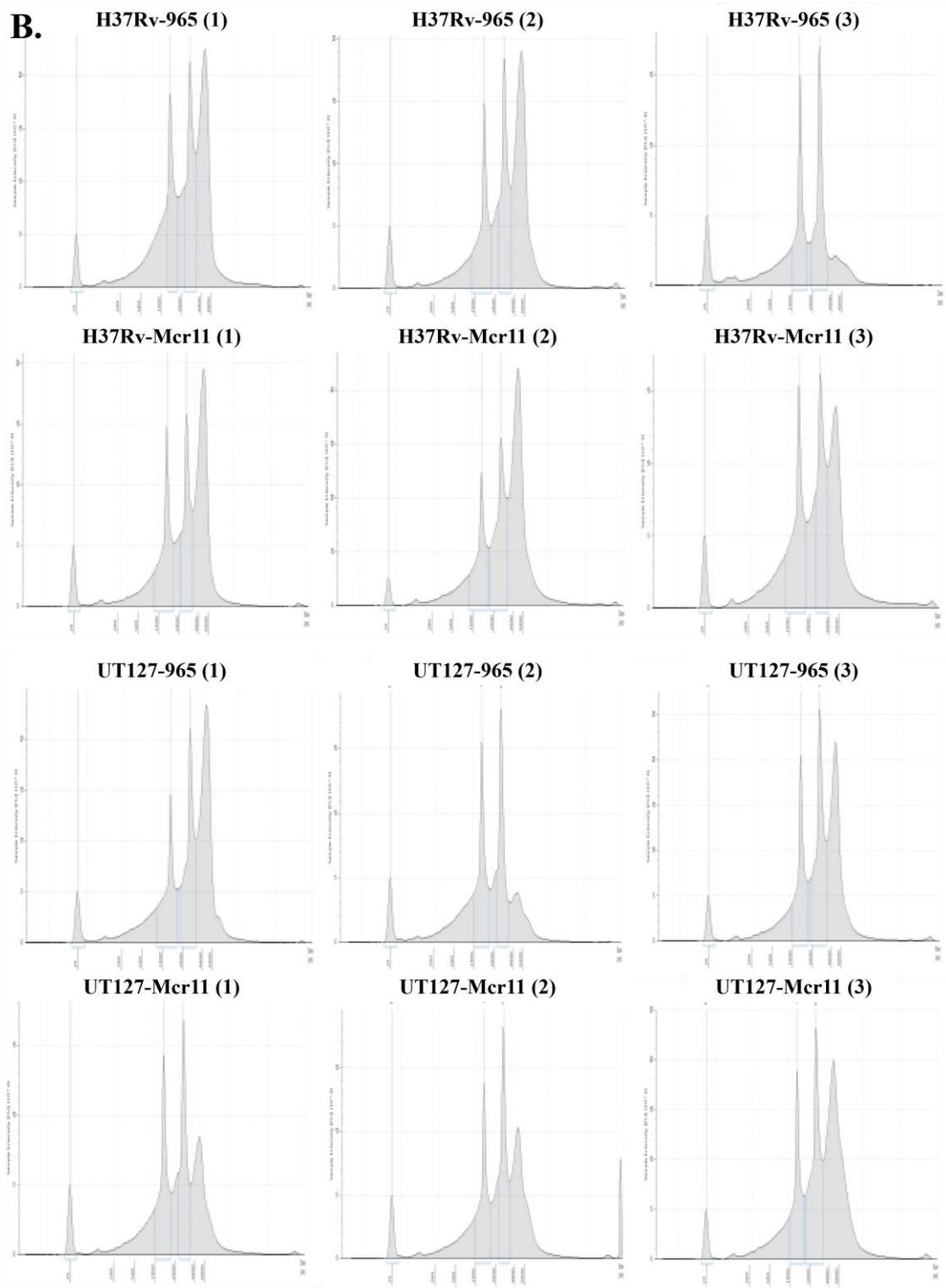
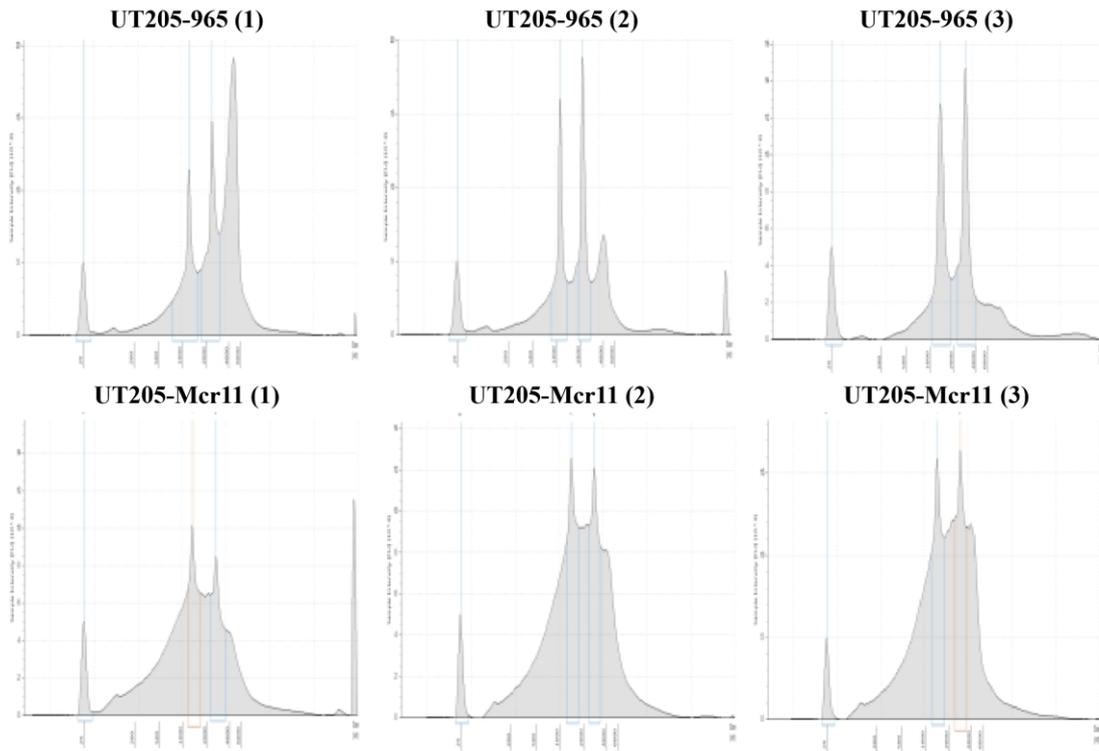


Figura 10: Integridad del RNA que fue secuenciado durante el silenciamiento de Mcr11: Fotografías de los geles de agarosa en donde se cargó 500 ng de RNA extraído de la bacteria indicada. Por cada bacteria se realizó extracción de RNA de bacterias control (965) y bacterias con el silenciamiento de Mcr11 (Mcr11). Se observan las bandas generadas por el RNA ribosomal 23S y 16S para cada muestra.

A.

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	rRNA Ratio		Result*
1	Rv-965-1	201.077	36	7.239	5.8	1.4	Hold	RIN, DNA contam
2	Rv-mcr11-1	151.712	33	5.007	6.8	1	Hold	RIN, DNA contam
3	Rv-965-2	143.946	37	5.326	7	1.1	Hold	DNA contam
4	Rv-mcr11-2	342.216	32	10.951	6.4	1.5	Hold	RIN, DNA contam
5	Rv-965-3	164.041	37	6.070	7.4	1.2	Pass	
6	Rv-mcr11-3	158.774	33	5.240	6.1	1	Hold	RIN, DNA contam
7	127-965-1	129.837	34	4.414	6.2	1.4	Hold	RIN, DNA contam
8	127-mcr11-1	163.850	41	6.718	6.8	1.1	Hold	RIN, DNA contam
9	127-965-2	165.774	40	6.631	6.7	1	Hold	RIN, DNA contam
10	127-mcr11-2	150.038	36	5.401	6.7	1.1	Hold	RIN, DNA contam
11	127-965-3	271.783	40	10.871	7.2	1.5	Hold	DNA contam
12	127-mcr11-3	263.333	36	9.480	7	1.7	Hold	DNA contam
13	205-965-1	165.512	34	5.627	6.4	1.2	Hold	RIN, DNA contam
14	205-mcr11-1	205.816	43	8.850	4.3	1	Fail	RIN
15	205-965-2	168.838	35	5.909	7.5	1.1	Hold	DNA contam
16	205-mcr11-2	200.009	37	7.400	4.4	1	Fail	RIN
17	205-965-3	146.821	41	6.020	7.7	1	Pass	
18	205-mcr11-3	215.213	37	7.963	4.4	1	Fail	RIN

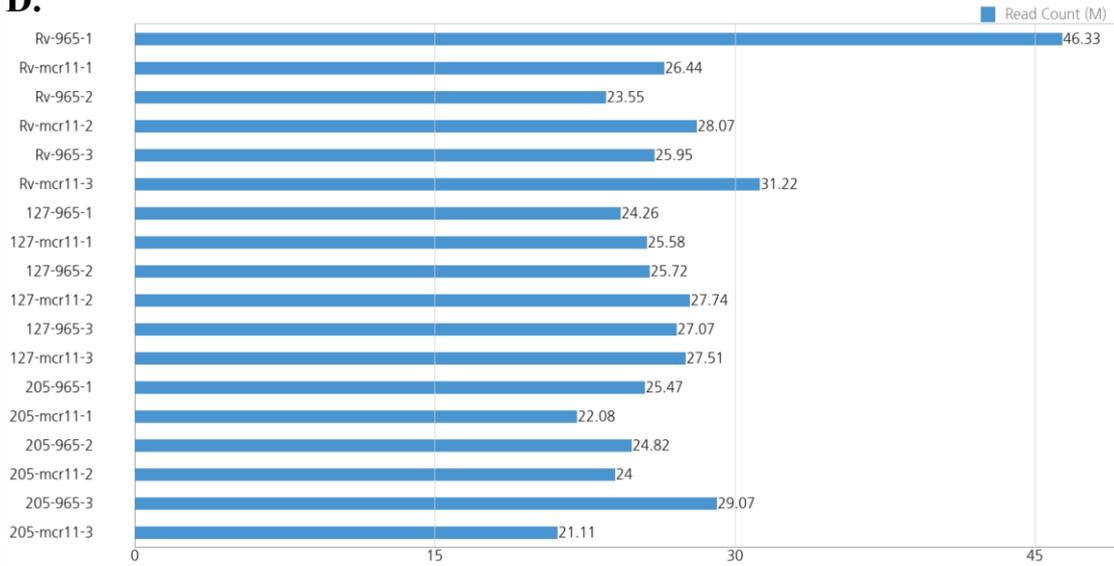




C.

#	Library Name	Library Type	Conc. (ng/ul)	Conc. (nM)	Size (bp)	Result*	
1	Rv-965-1	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	71.20	283.77	386	Pass	
2	Rv-mcr11-1	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	88.46	343.66	396	Pass	
3	Rv-965-2	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	84.11	330.09	392	Pass	
4	Rv-mcr11-2	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	87.09	347.12	386	Pass	
5	Rv-965-3	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	82.27	334.83	378	Pass	
6	Rv-mcr11-3	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	87.20	350.25	383	Pass	
7	127-965-1	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	94.36	383.03	379	Pass	
8	127-mcr11-1	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	91.96	370.35	382	Pass	
9	127-965-2	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	85.00	339.64	385	Pass	
10	127-mcr11-2	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	80.61	325.51	381	Pass	
11	127-965-3	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	87.46	346.78	388	Pass	
12	127-mcr11-3	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	64.06	244.55	403	Pass	
13	205-965-1	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	66.71	259.18	396	Pass	
14	205-mcr11-1	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	54.28	214.66	389	Pass	
15	205-965-2	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	66.02	265.19	383	Pass	
16	205-mcr11-2	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	65.48	245.12	411	Pass	
17	205-965-3	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	74.64	303.00	379	Pass	
18	205-mcr11-3	TruSeq stranded mRNA (Microbe)	40.09	138.60	445	Pass	

D.



E.

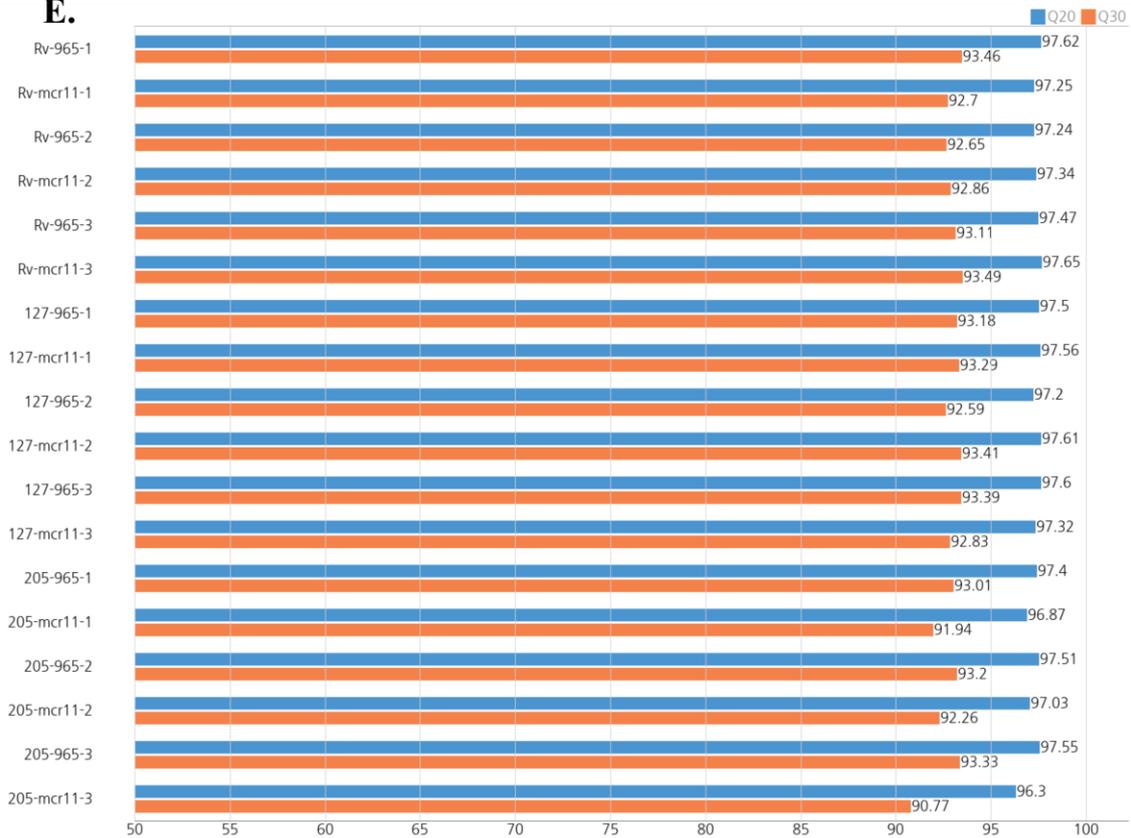


Figura 11: Control de calidad, secuenciación y análisis bioinformático de los transcriptomas: A. y B. Determinación del RIN para las 18 muestras. **C.** Construcción de librerías. **D.** Gráfica que representa el total de “reads” obtenidos tras el secuenciación de RNA para cada una de las 18 muestras analizadas. **E.** Gráfica que indica las puntuaciones calidad Phred, Q20 y Q30 del secuenciación, para las muestras indicadas.

9.4 Efecto del silenciamiento de Mcr11 sobre el perfil global de expresión de mRNA en H37Rv y UT127

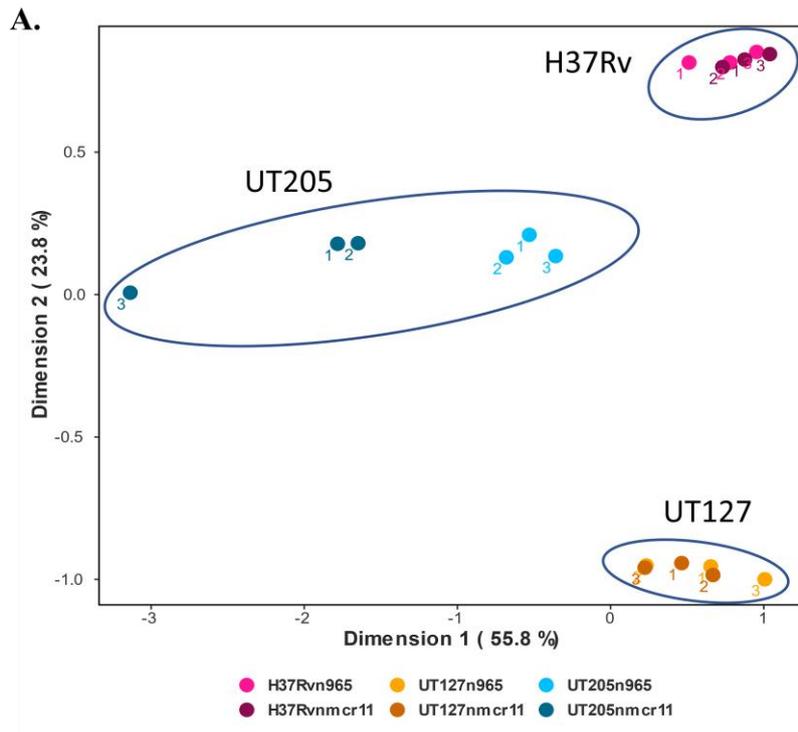
En el transcriptoma buscamos identificar aquellos genes comunes que son modulados en las bacterias tras el silenciamiento de Mcr11, debido a que son esos genes, los que podrían estar indicando un patrón acerca de la función del sRNA de estudio. Inicialmente realizamos un análisis por “Multidimensional scaling” MDS, que es una herramienta que permite visualizar el nivel de similitud o de diferencia entre un grupo de datos. En este caso, el algoritmo fue alimentado con los datos transcripcionales de las tres réplicas control y con silenciamiento de Mcr11, de cada una de las cepas evaluadas. A través de este análisis se observó que las tres bacterias (H37Rv, UT127 y UT205) se separan claramente entre ellas (Fig. 12.A). La dimensión 1 explica el 55,8% de las diferencias entre los grupos y separa claramente a H37Rv y UT127 en un lado de la dimensión, mientras que UT205 queda separada del otro lado de la dimensión. Esto se asemeja a los resultados observados a nivel fenotípico en el crecimiento de las bacterias cuando silenciamos el sRNA, donde UT205 se muestra claramente distinta a UT127 y H37Rv. Debido a estas diferencias, quisimos hacer un análisis entre UT127 y H37Rv separado del análisis para UT205. Estos resultados en conjunto, teniendo en cuenta las dos dimensiones del MDS, demuestran la existencia de diferencias transcriptómicas entre las tres bacterias siendo UT205, la más distinta a nivel transcripcional.

Cuando iniciamos a analizar en detalle cuáles fueron los genes diferencialmente expresados, notamos que UT205 mostraba un panorama transcriptómico considerablemente distinto al de H37Rv y UT127. Estos dos últimos, por el contrario, tenían ciertas similitudes en cuanto al número y la identidad de los genes diferencialmente expresados. Esta fue otra de las razones que nos llevó a realizar un análisis bioinformático común para H37Rv y UT127 y otro separado para UT205.

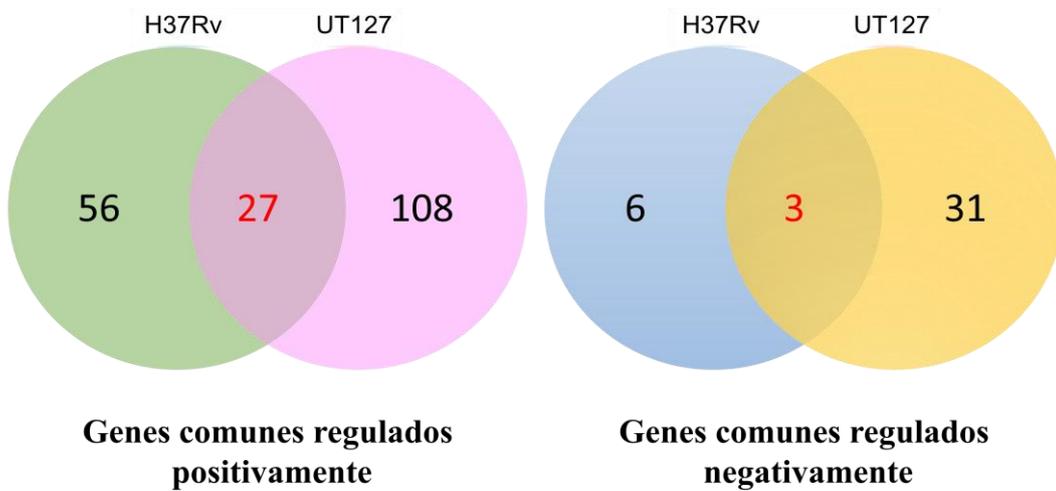
Como consecuencia del silenciamiento de Mcr11 en H37Rv y UT127, se encontraron 27 genes comunes regulados positivamente (Tabla 3) y 3 genes comunes regulados negativamente (*mcr11*, *rv1264* y *rv1266c*) (Tabla 4) (Fig. 12.B y 12.C). En los volcano plot para estas dos bacterias (Fig. 12.C) se aprecia que principalmente los genes diferencialmente expresados son genes regulados positivamente tras el silenciamiento de Mcr11; además se observa como los tres genes *mcr11*, *rv1264* y *rv1266c* caen en la región de genes regulados negativamente, esta coincidencia indica que posiblemente

Mcr11 de manera directa o indirecta puede regular su expresión. Teniendo en cuenta un $\text{Log}_2 \text{FC} > 0,5$ y $< -0,5$ (elegido al tener en cuenta el número de genes regulados) y un valor $P < 0,05$, en el heatmap (Fig. 12.D), buscamos identificar aquellos genes que, como en el análisis anterior, fueran comunes para las dos bacterias y que mostraran un claro patrón de regulación como consecuencia del silenciamiento de Mcr11. Pudimos observar que, de los 27 genes comunes regulados positivamente (Tabla 3), 10 de ellos [*oprA* (*rv0516c*), *rv0999*, *dagK* (*rv2252*), *rv2591*, *rv2721c*, *serU*, *rv2253*, *rv2734*, *rv2014* y *citE2* (*rv3075c*)] forman un “cluster” muy claro para las dos bacterias, los cuales podrían estar siendo controlados directa o indirectamente por Mcr11. Estos genes pueden estar afectando así, uno o varios procesos que pueden estar relacionados y controlados por Mcr11, aunque hasta el momento es muy poco lo que se conoce acerca de su función. De este grupo de genes, sólo tres han sido parcialmente descritos, *oprA*, *dagK* y *citE2*. El primero y más interesante es el gen *oprA* (osmosensory protein A) que codifica para la proteína OprA, un sustrato de PknD. Stavroula y colaboradores (156) observaron que OprA posee alta expresión en condiciones de estrés osmótico, un contexto donde parece tener un papel importante. La eliminación de OprA en Mtb llevó a un aumento en la resistencia de la bacteria al estrés osmótico, a una disminución en el grosor del peptidoglicano y a un aumento de la resistencia a algunos antibióticos. Estos efectos sobre la fisiología de Mtb parecen ser alcanzados a través de la regulación ejercida por OprA sobre SigF, un factor σ que se ha implicado con cambios morfológicos y de arquitectura de la pared celular. Algo muy interesante en este trabajo es que cuando la bacteria se somete a estrés osmótico, muestra un fenotipo de agregación similar al que pudimos observar nosotros cuando silenciamos Mcr11 en UT205 (Fig. 9.B). También se ha informado la sobreexpresión de *oprA* en bacterias mutantes para *mmpL3* (154) y expuestas a distintas concentraciones de vancomicina (157), un antibiótico del grupo de los glucopéptidos que afectan la síntesis de la pared celular (158, 159). Una regulación negativa de la expresión de este gen se ha descrito en la fase estacionaria temprana de crecimiento de Mtb con delección de SigF (160).

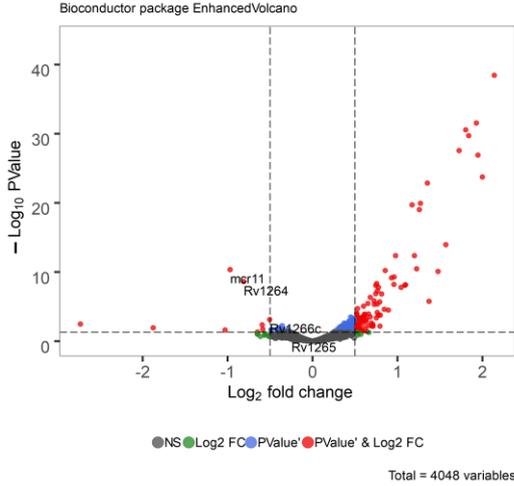
Por otro lado, tenemos el gen *dagK* que codifica para una diacilglicerol quinasa involucrada en la biosíntesis de fosfatidilinositol manosidos (PIM) (161). Estas moléculas son importantes factores de virulencia de Mtb debido a que participan como inmunomoduladores cuando la bacteria está en el contexto de una infección, además, su



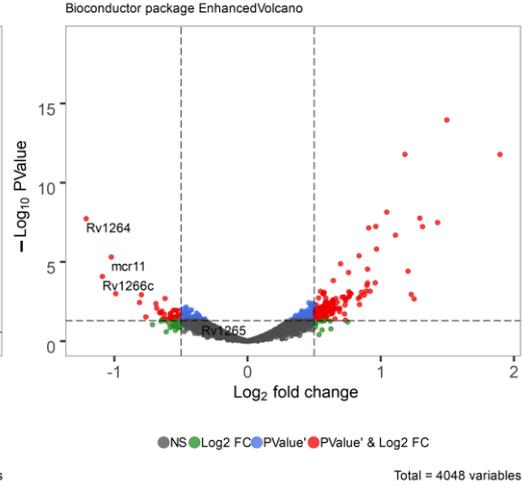
B.



C. Volcano plot H37Rv



Volcano plot UT127



D

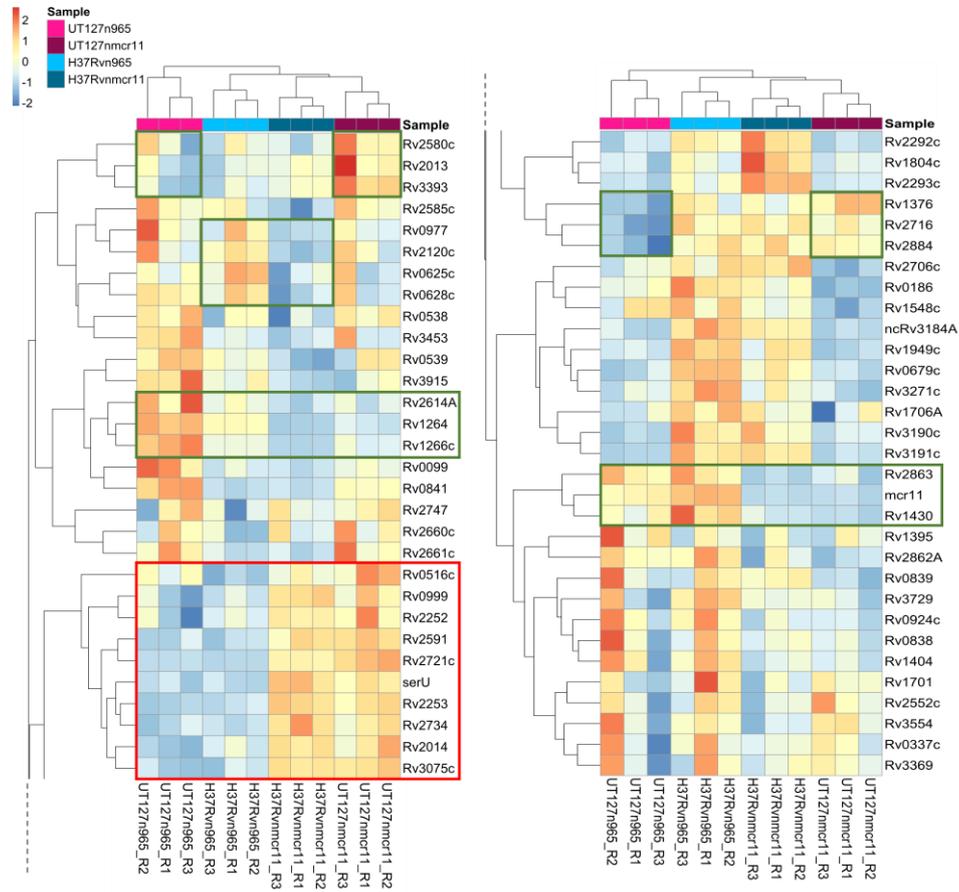


Figura 12: Expresión génica de H37Rv y UT127 tras el silenciamiento de Mcr11: **A.** “Multidimensional scaling” (MDS) para H37Rv, UT127 y UT205, tanto de sus controles 965 (tres réplicas) como de las bacterias con el silenciamiento para Mcr11 (tres réplicas) **B.** Diagrama de Venn de genes regulados positiva (izquierda) y negativamente (derecha) en H37Rv y UT127 tras el silenciamiento de Mcr11 por 48 h. Para este análisis se determinó un punto de corte para el Log2 FC de + y - 0,5 y un valor $p < 0,05$ **C.** Volcano plot del transcriptoma de los controles 965 y cepas silenciadas por 48 h de H37Rv (arriba) y UT127 (abajo). Los puntos rojos indican los genes regulados positiva y negativamente (Log2 FC de + y - 0,5, valor p menor a 0,05). **D.** Heatmap de los genes modulados tras el silenciamiento de Mcr11 (3 réplicas) comparado con sus controles (tres réplicas) en H37Rv y UT127. Los recuadros verdes señalan agrupaciones de genes con una regulación común (sea inducción o represión) tras el silenciamiento de Mcr11 en una de las bacterias o en ambas. El recuadro rojo señala un agrupamiento de 10 genes que se observaron inducidos tras el silenciamiento de Mcr11 en las dos bacterias. A los datos se les aplicó la fórmula del z-score para determinar el nivel de regulación para cada gen.

Tabla 3: Genes comunes regulados positivamente en H37Rv y UT127

Gen	Función	Producto	Esencial	Comentario
<i>rv2721c</i>	Desconocido	Desconocido	No	Posible proteína transmembrana conservada rica en alanina y glicina
<i>serU</i>	tRNA-Ser (TGA)	tRNA-Ser (TGA)	No	tRNA-Ser, anticodon tga, Benjak A et al. [2016]
<i>rv2734</i>	Proteína hipotética conservada	Proteína hipotética conservada	No	Proteína hipotética conservada, muy similar a varias proteínas e.g. Q984J2 MLR7981 ABC transporter ATP-binding protein from <i>Rhizobium loti</i> (<i>Mesorhizobium loti</i>)
<i>rv2591</i> (<i>PE_PGRS44</i>)	PE-PGRS family protein	PE_PGRS44 familia de proteínas PE-PGRS	No	Miembro de la familia PE de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>rv3075c</i> (<i>citE</i>)	Proteína conservada	Subunidad de Citrato liasa	No	Esencial para establecer infección en macrófagos y conejillos de indias
<i>rv2253</i>	Desconocida	Posible proteína secretada desconocida	No	Posee un posible péptido señal en el N-terminal. Posible proteína de membrana externa (Ver Song et al., 2008).
<i>rv0516c</i> (<i>oprA</i>)	Posible represor de SigF. Osmoregulador	Proteína OprA	-	Sustrato de PknD e inducido en estrés osmótico. (Hatzios SK Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)
<i>rv2293c</i>	Proteína hipotética conservada	Proteína hipotética conservada	No	Posible lipoproteína: Péptido señal en el N-terminal
<i>rv1804c</i>	Desconocida	Proteína conservada	No	Posible proteína secretada: identificada en los filtrados de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv; péptido señal predicho y secuencia señal escindible confirmada experimentalmente (ver Malen et al., 2007).
<i>rv0999</i>	Desconocida	Desconocida	No	Posible proteína transmembrana (ver Song et al., 2008).
<i>rv2252</i> (<i>dagK</i>)	Participa en la síntesis de Fosfatidil inositol manosidos (PIMS)	Diacilglicerol quinasa	No	Envuelta en el metabolismo lipídico Los niveles de diacil-PIM2 y diacil-PIM6 se reducen en CDC1551 Rv2252 mutante (Ver Owens et al., 2006). Mutante de crecimiento lento por mutagénesis de transposón basada en Himar1 en la cepa H37Rv (ver Sasseti et al., 2003)
<i>rv2014</i>	Transposasa, requerido para la transposición de	Transposasa	No	Transposasa, similar a los elementos de inserción; Generado posiblemente por

	un elemento de inserción.			frameshifting con respecto a Rv2013.
<i>rv2013</i>	Transposasa, requerido para la transposición de un elemento de inserción.	Transposasa	No	muestra similitud con la parte N-terminal de las proteínas hipotéticas transposasa
<i>rv3393 (iunH)</i>	Posible hidrolasa de nucleósidos IunH (nucleosidasa de purina)	Posible hidrolasa de nucleósidos IunH (nucleosidasa de purina)	No	Participa en el rescate de purina. Cataliza la hidrólisis de las purinas y pirimidinas comunes en ribosa y la base asociada, y podría tener una preferencia por la inosina y la uridina como sustratos
<i>rv2884</i>	Envuelta en el mecanismo transcripcional	Probable proteína regulatoria	No	Posiblemente regulado por SigF (Ref)
<i>rv2716</i>	Desconocida	Proteína conservada	No	
<i>rv1376</i>	Desconocida	Proteína hipotética conservada	No	Reprimido frente a la exposición a lupulona (Ref)
<i>rv2580c (hisS)</i>	Envuelta en mecanismos traduccionales	Probable tRNA-HisS histidil sintetasa	Si	tRNA aminoacil sintetasa (biosíntesis proteica)
<i>rv3191c</i>	Participa en la transposición de una secuencia de inserción	Probable transposasa	No	-
<i>rv3369</i>	Desconocida	Proteína conservada	No	-
<i>rv3190c</i>	Desconocida	Proteína hipotética	No	-
<i>rv0337c (aspC)</i>	Genera oxalacetato y L-glutamato a partir de L-aspartato y 2-oxoglutarato	Probable aspartato aminotransferasa AspC (transaminasa A)	Si	-
<i>rv3554 (fdxB)</i>	Desconocida	Posible proteína de transferencia de electrones FdxB	No	C-terminal probablemente involucrado en la transferencia de electrones en una o varias reacciones metabólicas
<i>rv2098c</i>	Desconocida	PE_PGRS36 de la familia de proteínas PE-PGRS	No	-
<i>rv2552c (aroE)</i>	Posiblemente involucrado en síntesis de corismato dentro de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos	Posible shikimato 5-deshidrogenasa AroE	No/Si*	-
<i>rv1701</i>	Recombinación/integración de secuencias	Probable integrase/recombinase	No	-
<i>rv0847 (lpqS)</i>	Desconocida	Probable lipoproteína LpqS	No	Delecionado (parcial o completamente) en uno o más aislamientos clínicos

Tabla 4: Genes comunes regulados negativamente en H37Rv y UT127. * En algunos estudios el gen se observó esencial, pero en otros no.

Gen	Función	Producto	Esencial	Comentario
<i>rv1264</i>	Implicada en la síntesis de cAMP	Adenilato ciclasa	No	Parece responder a cambios de pH
<i>rv1266c</i> (<i>pknH</i>)	Participa en la transducción de señales (a través de la fosforilación).	Proteína quinasa serina/treonina transmembrana H (PknH) (protein kinase H)	No	Se cree que está involucrado en el metabolismo del arabinano, fosforilando quizás EMBR
<i>mcr11</i>	Desconocida	sRNA	No	-

presencia tanto en micobacterias patógenas como no patógenas sugiere que estos lípidos también tienen importancia como componentes estructurales y estabilizadores de la membrana celular. Por último, el gen *citE2* es una subunidad de la enzima citrato liasa, que junto con *rv2498c*, *citE1*, son necesarias para la adaptación de la bacteria a condiciones de estrés como el estrés oxidativo y de membrana; además estas dos subunidades en conjunto son indispensables para el crecimiento óptimo de Mtb en macrófagos humanos y en conejillos de indias, teniendo entonces un rol importante en la patogénesis (162).

En cuanto a los genes comunes regulados negativamente en H37Rv y UT127 (*mcr11*, *rv1264* y *rv1266c*), es importante señalar que a través del “heatmap” estos 3 genes se muestran también reprimidos lo cual, por un lado, valida nuestra metodología de silenciamiento para Mcr11 en estas dos cepas de Mtb, y por otro, resulta interesante que *rv1264* y *rv1266c*, ambos codificados en el genoma muy cerca de *mcr11* sean también silenciados en las dos bacterias, lo que pudiese mostrar que estos genes hacen parte de un mismo regulón en Mtb.

La lista de los genes inducidos y reprimidos tras el silenciamiento de Mcr11 para H37Rv y UT127 se encuentra en la tabla anexa 1.

9.5 Efecto del silenciamiento de Mcr11 sobre el perfil global de expresión de mRNA en UT205

A diferencia de H37Rv y UT127, el aislado clínico UT205 mostró una respuesta transcripcional más afectada como consecuencia del silenciamiento de Mcr11. En el volcano plot podemos evidenciar la gran cantidad de genes diferencialmente expresados, especialmente genes silenciados, entre los cuales se puede observar a Mcr11 (Fig. 13.A). Realizamos un análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados, tanto positiva como negativamente a través de la herramienta STRING (Fig. 13.B y 13.D), la cual es una base de datos que almacena interacciones físicas y funcionales de proteínas, identificando además, procesos significativamente enriquecidos en una lista de genes, gracias a sus sistemas de clasificación como GO, Pfam y KEGG. Para este análisis incluimos los genes que tuvieran un valor de $\text{Log}_2 \text{FC}$ de $1,3 > \text{Log}_2 \text{FC} < -1,3$, y un valor $P < 0,05$. Para el análisis, decidimos excluir

aquellos genes totalmente desconocidos y que fueran huérfanos, es decir, que no tuvieran ninguna relación con cualquier otro gen seleccionado, y de esta forma, logramos generar una lista de genes enriquecidos con un mayor significado biológico (Fig. 13.D y Tabla 5). En cuanto a los genes regulados positivamente (Fig. 13.B y 13.C) se observan dos integrantes del sistema toxina-antitoxina, *rv2653c* y *vapC7*, ambas toxinas, en donde la primera se ha asociado con la inhibición del crecimiento de *M. smegmatis* (163, 164) y la segunda, una ribonucleasa, se ha observado regulada positivamente tras 24 y 72 horas de tratamiento con etambutol e isoniazida (165). También encontramos un gen que codifica para una posible sulfotransferasa, *sseC2*, que parece estar implicado en la biosíntesis de los sulfolípidos de trehalosa (166) y un gen que se cree está asociado a el metabolismo del azufre, *sseC1*, el cual, de manera interesante, se ha visto sobreexpresado bajo el estrés osmótico (156). Además, en cuanto al heatmap de genes regulados positivamente en UT205 al silenciar Mcr11 (Fig. 13.C), se aprecia el gen *rv3117* (*cysA3*), que al igual que *sseC2*, parece participar en la biosíntesis de los sulfolípidos de trehalosa. Se observan genes integrantes del sistema toxina-antitoxina *rv0662c*, *rv0661c*, *rv2760c*, *rv2526* (*vapB7*, *vapC7*, *vpB42* y *vapB17* respectivamente).

Por otro lado, el análisis de enriquecimiento funcional para los genes regulados negativamente mostró una gran red en la cual se resaltan las categorías de Gene Ontology (GO) para procesos biológicos con hidrólisis de uniones fosfodiéster de RNA, función molecular con actividad ribonucleasa y componentes celulares integrales de membrana (Tabla 5). Además, entre las palabras claves UniProt destaca la membrana celular y los sistemas toxina-antitoxina (Tabla 5). Es importante mencionar que en esta red se encontraron 23 genes esenciales (regulados negativamente) que podrían explicar de algún modo la exacerbada modificación transcripcional observada en UT205. A continuación, se describe en detalle los resultados del análisis de enriquecimiento funcional para los genes regulados negativamente.

Análisis de enriquecimiento funcional para los genes regulados negativamente en UT205 usando STRING (Fig. 13.D):

Región 1: En esta región se observaron genes importantes en los sistemas secretores Sec de Mtb, como el gen esencial *secY*, el cual codifica para una subunidad del

complejo secretor SecYEG (167). Encontramos también el gen esencial *sodA* que codifica para una superóxido dismutasa, necesaria para la adaptación al estrés oxidativo (168, 169).

Se observan genes que intervienen en procesos de duplicación, transcripción y traducción celular. El gen esencial *dnaN*, codifica para la subunidad beta de la DNA polimerasa III, implicada en la iniciación de la replicación (170). El gen *greA* codifica para un factor de transcripción necesario para la correcta elongación de los transcritos de RNA. Mutaciones en este gen generan defectos en el crecimiento de Mtb (171). El factor de transcripción esencial WhiB1 que también hace parte de esta región, se sabe que regula sólo en presencia de óxido nítrico (172) y parece reprimir la expresión de la chaperona esencial GroEl-2 (173). Encontramos 5 genes de proteínas ribosomales (*rplE*, *rplK* y *rpsT*, *rpmJ* y *rpsR2*), de las cuales tres, *rplE*, *rplK* y *rpsT*, son esenciales para el crecimiento *in vitro* de Mtb y la mutación *rpmJ* genera un crecimiento reducido. Por último, encontramos dos genes esenciales relacionados con procesos metabólicos, *ribG*, implicado en la biosíntesis de riboflavina y *clpP2*, un gen que da origen a la proteasa ClpP2 que junto a su homólogo ClpP1 degradan péptidos anormales, siendo ambas esenciales para el crecimiento de Mtb tanto *in vitro* como en una infección (174).

Región 2: Aquí encontramos genes relacionados con síntesis y transporte de aminoácidos siendo dos de ellos esenciales (*aroD* y *trpG*). El gen *aroD* se ha implicado en la síntesis aminoácidos aromáticos y *trpG* es necesario para la síntesis de triptófano. Otro gen presente en esta región, es *ansP1*, que codifica para un transportador de membrana que facilita la obtención de aspartato para usarlo como una fuente de nitrógeno durante una infección. Mutaciones en este gen generan un fenotipo atenuado cuando de la bacteria al infectar ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos.

Región 3: Se observa una alta representación de los sistemas toxina-antitoxina (TA), que aunque no se conoce con detalle cuál es su función en Mtb, sus integrantes han sido identificados ampliamente en el genoma de la micobacteria (17). respondiendo a condiciones de estrés. Los sistemas constan de dos proteínas codificadas en un mismo operón en donde una de ellas representa a la toxina, que se encarga de detener el crecimiento de la bacteria y una antitoxina, la cual inhibe la acción de su contraparte, restableciendo el crecimiento (175, 176). En nuestro análisis de enriquecimiento funcional encontramos principalmente integrantes de la familia VapBC (16 genes, 2

antitoxinas y 14 toxinas), que son las más abundantes en el cromosoma de Mtb caracterizándose por tener el dominio PIN que funcionan como nucleasas de RNA y parecen responder a perturbaciones relacionadas con el hospedero como la hipoxia. Los genes del sistema MazEF3 (*mazE3* y *mazF3*) también aparecen en esta región, esta familia de sistemas TA posee actividad de RNasas y parecer ser secretadas durante una infección e interactuar con el RNA del hospedero (175).

Región 4: encontramos el gen esencial, *galE1*, involucrado en la del arabinogalactano de la pared celular de Mtb, además de genes implicados en metabolismo lipídico (*idsB* y *erg3*).

Región 5: Destacan los componentes proteicos y lipídicos de la pared y membrana celular de Mtb. Se aprecian 9 lipoproteínas (*lprO*, *lppA*, *lppJ*, *lppR*, *lpqN*, *lpqT*, *lpqX*, *lprI* y *lprP*), de las cuales no se conoce una función definida, aunque se ha observado que la expresión *lprO* parece disminuir cuando hay expresión del operón SigG (177). Por último, se observan genes de proteínas de membrana con función desconocida, pero una de estas, *nanT*, disminuye su expresión cuando Mtb entra a un estado de dormancia (bacteria no cultivable) inducido por la ausencia de potasio en el ambiente (156).

Región 6 y 7: En estas dos regiones destacan los transportadores de membrana, especialmente los sistemas tipo ABC (ATP-binding cassette). En la región 6 se encuentran dos genes esenciales *cysA1* y *cysT*, los cuales participan en sistemas tipo ABC para la importación de sulfato que se inducen bajo estrés oxidativo o privación de nutrientes (178, 179). También en esta región 6 está *cpdA*, gen que posee en su secuencia promotora de unión para el FT CRP (180) y codifica para una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (181) que hidroliza el AMPc en GMPc *in vitro*. De manera interesante su sobreexpresión parece reducir los niveles intracelulares de AMPc (181).

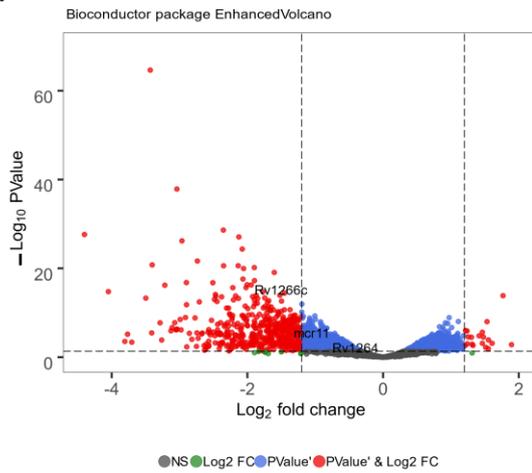
En la región 7, los genes *drrB* y *drrC* codifican proteínas que forman parte de una bomba de eflujo tipo ABC (182,183) encargada de facilitar la exportación de lípidos como el tiocerol dimicoserosato (PDIM) a la pared celular (184). Además, se cree que podrían conferir resistencia a los antibióticos (185, 186). Encontramos también transportadores de fosfato codificados por los genes *phoT* (sistema ABC) (187), *phoY2* y *pstS2* que se encargan de ingresar fosfato a la bacteria con el fin de mantener su homeostasis (188). Por otro lado, *phoY2* se ha relacionado con la persistencia de Mtb (189, 190). Se observan genes asociados a procesos del metabolismo energético, *gltA2*

(citrato sintasa I asociada al ciclo del ácido tricarboxílico TCA) (191, 192), y de transferencia de electrones en la respiración, *ctaE* (192), *ctaF* (193), *cydA* (194) y *qcrA*, de los cuales *gltA2*, *ctaE* y *qcrA* son esenciales. Por último, la respiración y producción energética asociada al cofactor NADPH hacen parte de esta región (*icd2* (195), *pntAb* y *sthA* (196)).

Región 8: Encontramos genes asociados con la síntesis glucolípidos, *papA2*, *papA3*, *papA4*, *chp2*, *pimE*, *pimF* y *rv2181*. Las enzimas aciltransferasas PapA2, PapA3 participan en la biogénesis del SL-1 (197), DAT y PAT (198). Chp2 se ha implicado en la síntesis del PAT (199). Por otro lado, PapA4 se ha relacionado con la síntesis de oligopolisacáridos en *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*) una micobacteria patógena del pez cebra que es muy cercana a Mtb (200). PimE, PimF y Rv2181 son tres manosiltransferasas implicadas en la formación del fosfatidil–inositol manosido (PIM) y el lipoarabinomanano (LAM) (201-203). Todas estas moléculas lipídicas nombradas, hacen parte de la pared celular de Mtb y se han asociado fuertemente con su capacidad patogénica (81). Encontramos en esta región, genes asociados a la síntesis de ácidos micólicos (*mmaAI*, *umaA*), moléculas también importantes para la virulencia de Mtb y al gen no caracterizado *rv0479c* que es esencial. *rv1490*, *fadD30* y *rv3277* son tres genes esenciales que hacen parte de esta región, pero su función no ha sido aún definida a excepción de *fadD30* que parece participar de la degradación de lípidos.

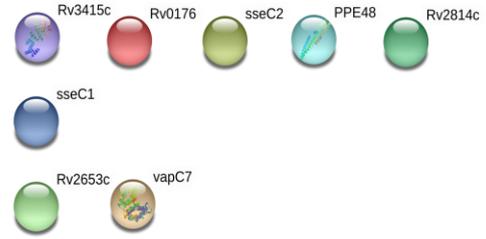
Región 9: Destacan los genes asociados a componentes de membrana celular. El gen esencial *ino1*, que codifica para la inositol fosfato sintasa que está involucrada en la síntesis de inositol, una molécula precursora del tiol y el micotiol que son importantes para la virulencia, resistir al estrés oxidativo, mantener el estado redox de la célula (204, 205). También el inositol es necesario para la síntesis de lípidos el fosfatidilinositol, el cual, a su vez, es la base para la generación de glucolípidos como los PIM y el LM, entre otros (206). *plcA* y *plcC*, dos genes aquí presentes, codifican para una fosfolipasa C que actúa sobre la hidrólisis de la esfingomielina y la fosfatidilcolina (207), este tipo de proteínas parecen ser importantes en la patogénesis de Mtb (207), además de tener un rol sobre la inducción de muerte celular (208). Finalmente, dos genes esenciales, *pgsA2* y *gcvH*, hacen parte de esta región. El primero se ha relacionado con la síntesis de cardiolipina y el segundo con el catabolismo de la glicina (209).

A. Volcano plot UT205

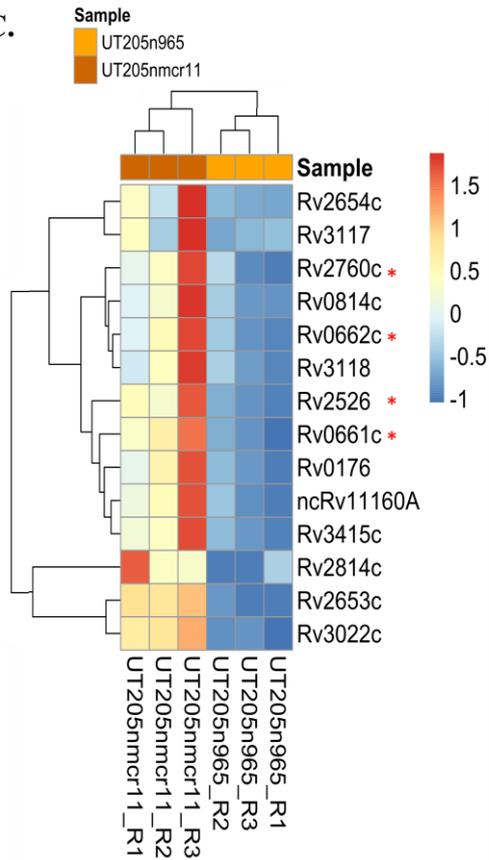


Total = 4040 variables

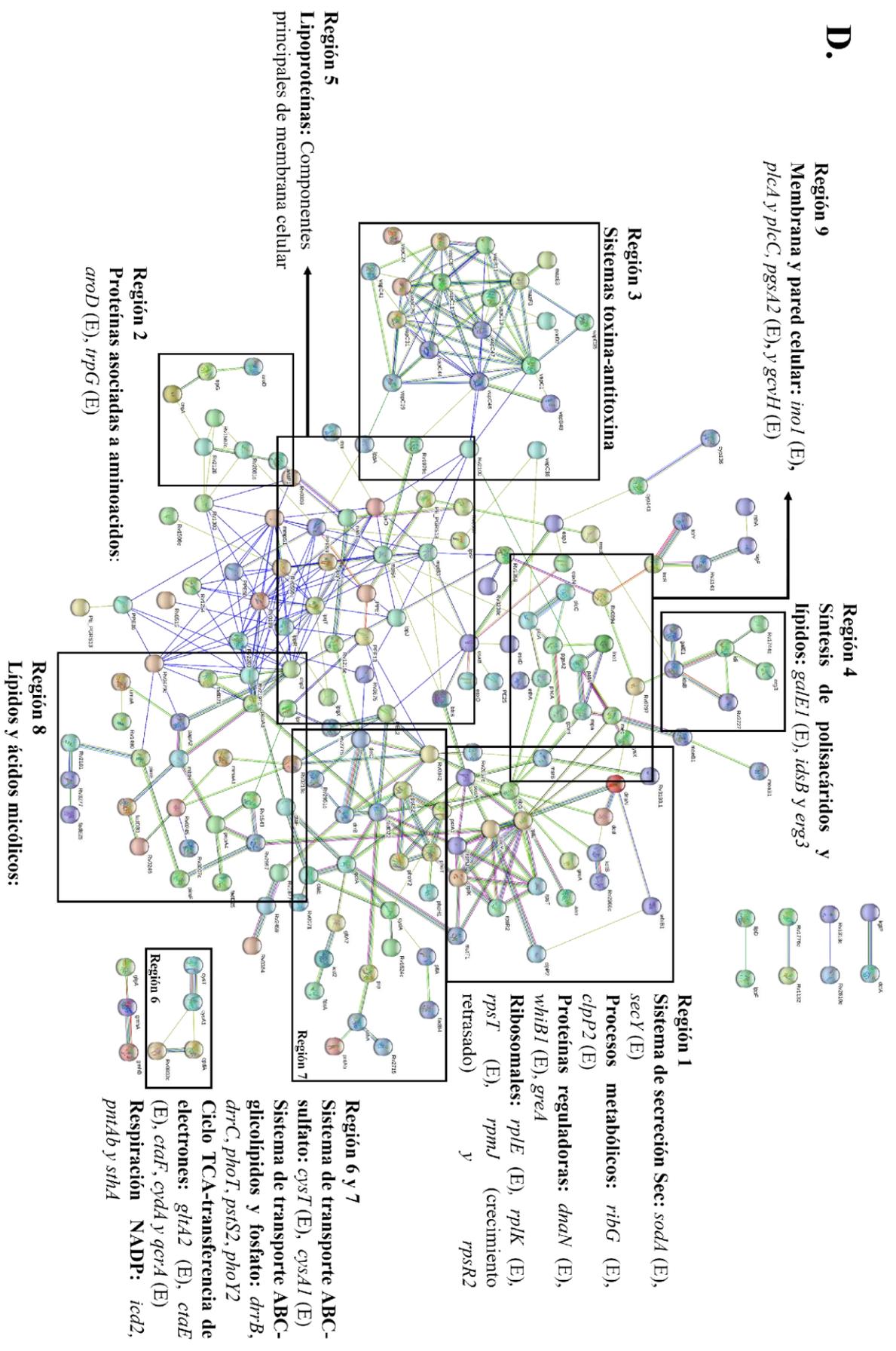
B. Genes regulados positivamente en UT205



C.

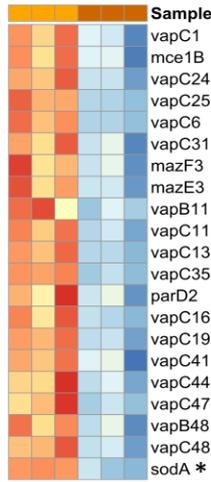


D.

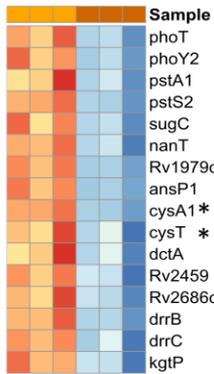


E.

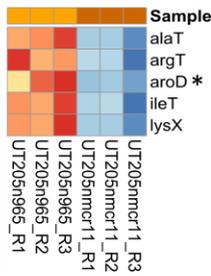
Sistemas toxina-antitoxina, Adaptación



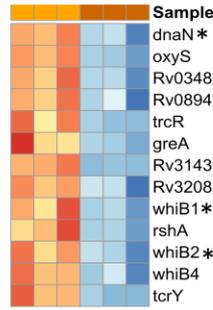
Transporte



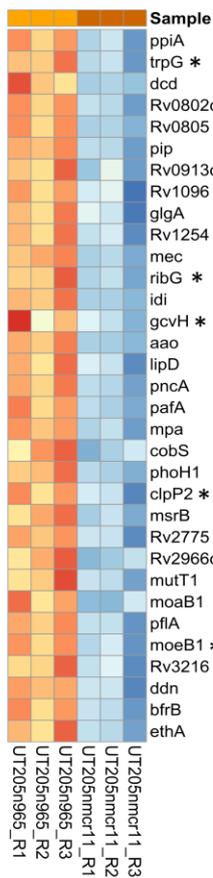
Aminoácidos



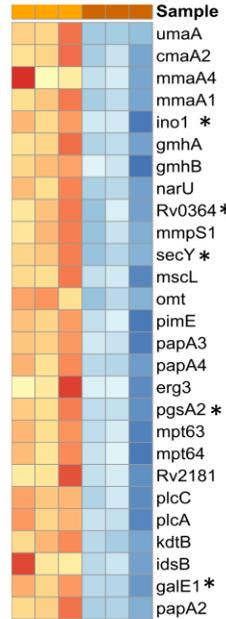
Proteínas regulatorias



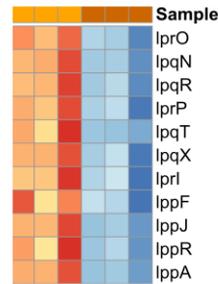
Metabolismo intermedio



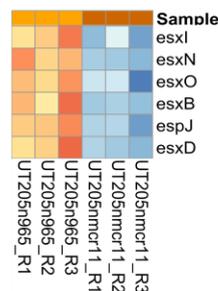
Componentes de pared y membrana celular- proteínas asociadas



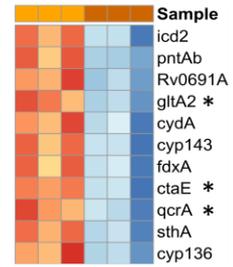
Lipoproteínas



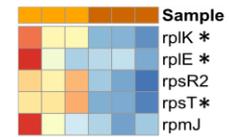
Virulencia



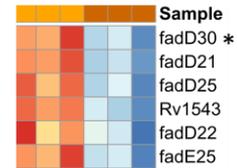
Respiración y vías energéticas



Proteínas ribosomales



Proteínas asociadas a metabolismo lipídico



Locus Mer11

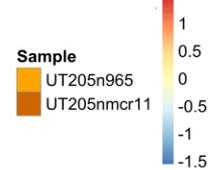
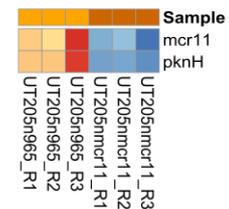


Figura 13: Expresión génica de UT205 tras el silenciamiento de Mcr11: **A.** Volcano plot del transcriptoma de UT205-965 comparado con UT205-Mcr11 por 48 h de incubación con 200 ng/mL de ATC. Los puntos rojos indican los genes regulados positiva y negativamente (Log2 FC de + y - 0,5, valor p menor a 0,05) **B.** Análisis de enriquecimiento funcional a través de la herramienta STRING para los genes regulados positivamente en UT205 tras el silenciamiento de Mcr11 por 48 h en presencia de 200 ng/mL de ATC. (Log2 FC mayor a 1,3 y un valor p menor a 0,05) **C.** Heatmap de los genes regulados positivamente en el transcriptoma de UT205 (se aplicó la fórmula del z-score para la determinación del nivel de regulación de cada gen). Los asteriscos rojos señalan los genes que codifican integrantes de los sistemas toxina-antitoxina. Se observan las tres réplicas de UT205-965 y UT205-mcr11. **D.** Análisis de enriquecimiento funcional a través de STRING por regiones, para los genes regulados negativamente en UT205 tras el silenciamiento de Mcr11 por 48 h en presencia de 200 ng/mL de ATC (Log2 FC mayor a 1,3 y un valor p < 0,05). Para la generación de esta red se eliminaron los genes pertenecientes a la categoría de función desconocida **E.** Heatmap de los genes regulados negativamente en UT205 como consecuencia del silenciamiento de Mcr11 ordenados por procesos fisiológicos o componentes celulares comunes. Se observa las tres réplicas de UT205-965 y UT205-mcr11. Los asteriscos señalan los genes esenciales. A los datos se les aplicó la fórmula del z-score para determinar el nivel de regulación para cada gen.

Tabla 5: Enriqueciendo funcional para los genes regulados negativamente en UT205
(entregada por la herramienta STRING)

	Término GO	Descripción	Genes incluidos en el grupo	False discovery rate (FDR)
Procesos biológicos (GO)	GO:0090501	Hidrólisis de uniones fosfodiéster de RNA	15 de 60	0,0063
Función molecular (GO)	GO:0004540	Actividad ribonucleasa	15 de 60	0,0021
Procesos biológicos (GO)	GO:0016021	Componentes integrales de membrana	39 de 384	0,0443
Palabra clave UniProt	Descripción	Genes incluidos en el grupo	False discovery rate (FDR)	
KW-0472	Membrana	76 de 796	0,00070	
KW-1003	Membrana celular	48 de 442	0,0018	
KW-0812	Transmembrana	62 de 698	0,0178	
KW-1133	Hélice transmembrana	60 de 680	0,0202	
KW-1277	Sistema toxina-antitoxina	19 de 142	0,0288	
KW-0540	Nucleasa	15 de 99	0,0288	

Algo muy similar se observa en el heatmap derivado de los genes “down-regulados”. En total se observan 25 genes esenciales y destacan los grupos relacionados con pared y membrana celular, metabolismo intermedio, transporte y sistemas toxina-antitoxina. Además, encontramos proteínas de la familia ESAT-6 que se han asociado con la virulencia de la bacteria (Fig. 13.E).

La lista de los genes inducidos y reprimidos tras el silenciamiento de Mcr11 en UT205 se encuentra en la tabla suplementaria 1.

9.6 El regulón de Mcr11

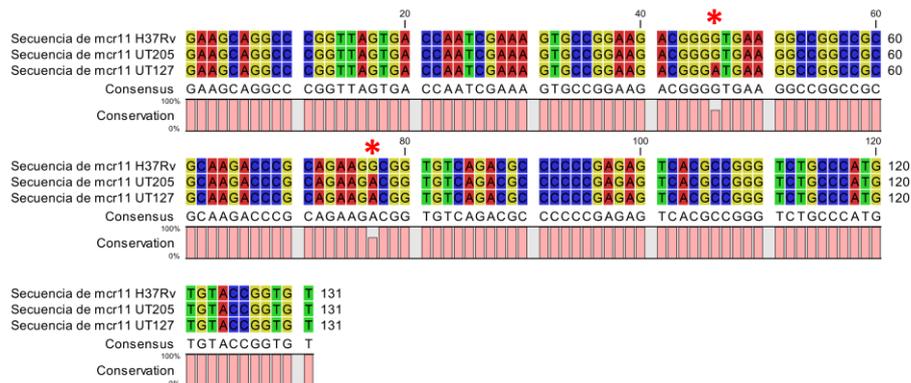
La diferencia en la respuesta transcriptómica frente al silenciamiento de Mcr11 entre H37Rv y UT127 con UT205 nos llevan a pensar que este sRNA podría estar regulando distintos genes entre estas bacterias o que su impacto sobre la regulación de sus blancos tiene un nivel distinto entre estas. Realizamos un alineamiento de la secuencia de Mcr11 de las tres bacterias, estos datos se obtuvieron a través de un secuenciamiento del genoma las mismas (25, 210), que luego se confirmó con el transcriptoma. En la figura 14.A se esquematiza el alineamiento del sRNA con coordenadas 1410978 a 1411107 en el genoma de Mtb, siendo un transcrito de 130 nucleótidos (nt). UT127 presenta dos cambios de una guanina por una adenina en los nt 45 y 77. Este último cambio en el nt 77 se encuentra en el aislado UT205 (Fig. 14.A). La predicción de la estructura secundaria de Mcr11, que fue realizada usando la herramienta mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>), muestra un RNA con dos horquillas, de las cuales, una de estas, se ve afectada por el cambio en el nt 77 en UT127 y UT205, provocando que dicha horquilla aumente su tamaño. El cambio del nt 45 en UT127 cae en la otra horquilla, pero aparentemente no cambia su estructura (16.B). A partir de estas predicciones buscamos identificar los posibles blancos de Mcr11, y teniendo en cuenta que por lo general los sRNAs actúan como represores de la expresión de un gen, realizamos una búsqueda manual por una secuencia de apareamiento entre Mcr11 y los genes comunes regulados positivamente en el transcriptoma de H37Rv y UT127 cuando se silenció el sRNA Mcr11 (Tabla 3). Esta secuencia, también conocida como “seed” es preferiblemente encontrada en las horquillas, por ser de cadena sencilla, aunque también se ha reportado que con ayuda de proteínas chaperona, los sitios de cadena doble del sRNA pueden abrirse e interactuar con el mRNA blanco. Seis genes fueron

identificados como posibles candidatos, *rv0516c* (*oprA*), *rv0999*, *rv2252* (*dagK*), *rv2591*, *rv2721c* y *rv2014*, los cuales podrían estar interactuando con Mcr11 al unirse a una secuencia “seed” 11 nt de largo (Fig. 14.C). Para cada interacción calculamos la energía libre mínima, la cual nos habla de que tan estable es la estructura que formaría Mcr11 con el mRNA específico (Fig. 14.C). En la figura 14.D se muestra un heatmap de UT205 para estos seis genes, datos derivados del transcriptoma obtenido al silenciar Mcr11 en esa bacteria. A pesar de la tercera réplica de UT205-Mcr11 no coincide, se muestra un patrón de regulación positiva de dichos genes cuando se presenta una disminución en la expresión de Mcr11. Este resultado refuerza la idea de que posiblemente estos genes mencionados, sean blancos regulatorios de Mcr11, dada su regulación positiva en las tres bacterias (H37Rv, UT127 y UT205) en respuesta al silenciamiento del sRNA. Finalmente, con excepción de *oprA* y *dagK* (mencionados en la sección 9.4), poco es lo que se conoce acerca de estos genes. Del gen *rv2014* se sabe que su expresión se ve aumentada cuando Mtb es sometida a estrés oxidativo (42) y de *rv2721c* se sabe que es un antígeno que es capaz de desencadenar una respuesta inmune en células T (211).

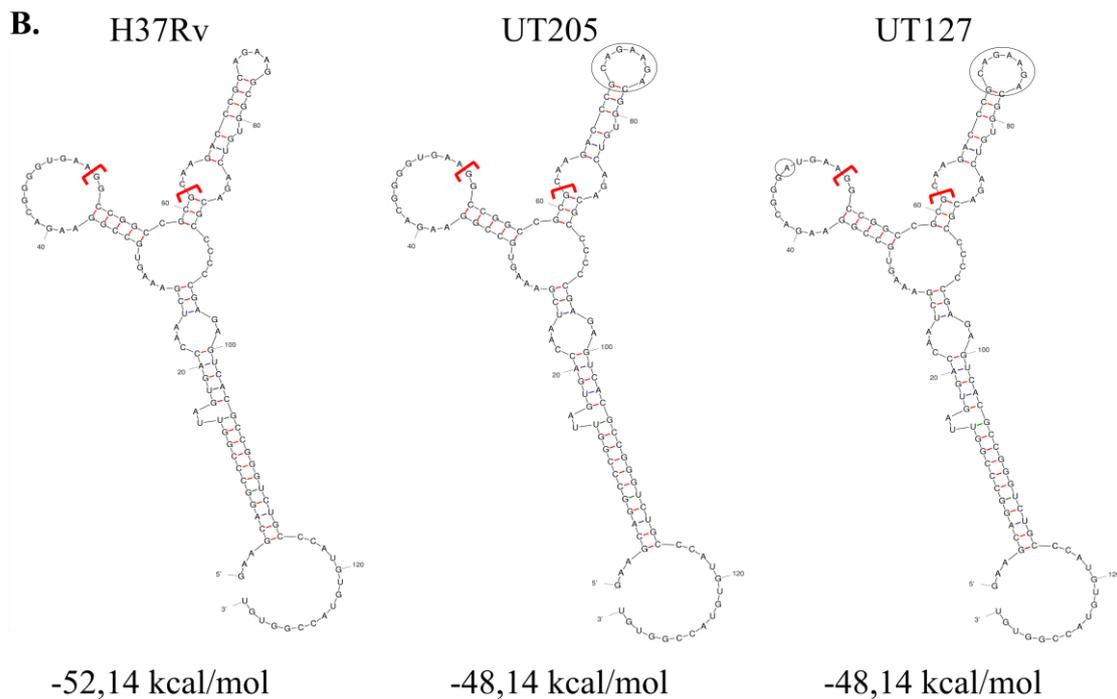
9.7 El silenciamiento de Mcr11 afecta la viabilidad de la bacteria y el macrófago

Teniendo en cuenta los efectos de Mcr11 sobre el crecimiento y el transcriptoma de Mtb, nos preguntamos cómo este silenciamiento podría afectar el crecimiento de UT205 en medio sólido. Para esto realizamos cultivos por triplicado de este aislado clínico, tanto el control 965 (UT205-965) como la cepa con silenciamiento (UT205-Mcr11), en medio sólido 7H10 con 100 y 200 ng/mL de ATC. Se realizaron diluciones seriadas de las bacterias y se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) tras 24 días de incubación a 37 °C (Fig. 15.A). Para los cultivos con la concentración de 100 ng/mL de ATC, en promedio se observaron $4,66 \times 10^7$ UFC y 2×10^7 UFC para UT205-965 y UT205-Mcr11 respectivamente. Similarmente, en la concentración de 200 ng/mL de ATC, en promedio se observaron $5,33 \times 10^7$ UFC y $6,7 \times 10^6$ UFC para UT205-965 y UT205-Mcr11 respectivamente (Fig. 15.A). Estos resultados estadísticamente significativos, indican que, como consecuencia al silenciamiento de Mcr11, esta bacteria no alcanza la misma tasa de replicación que cuando posee niveles normales de

A.

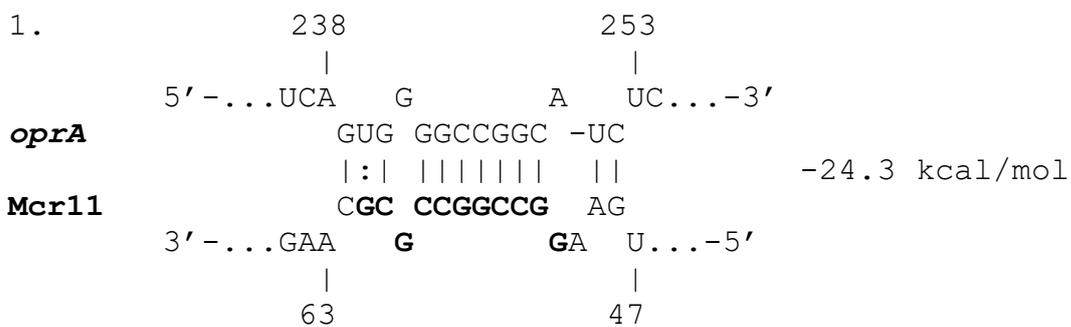


B.

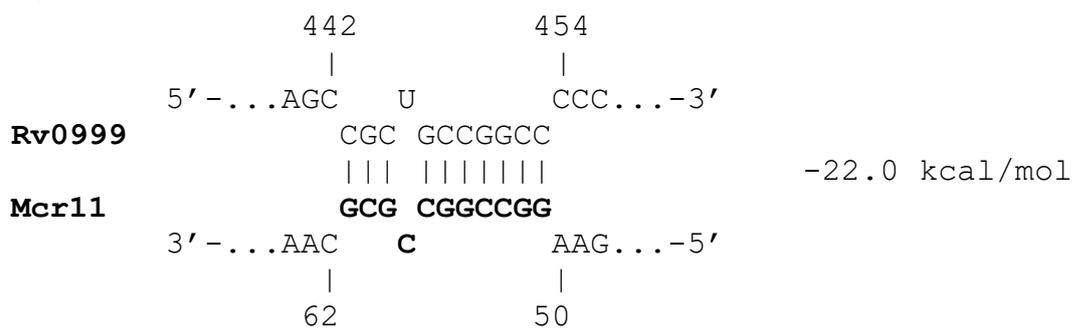


C.

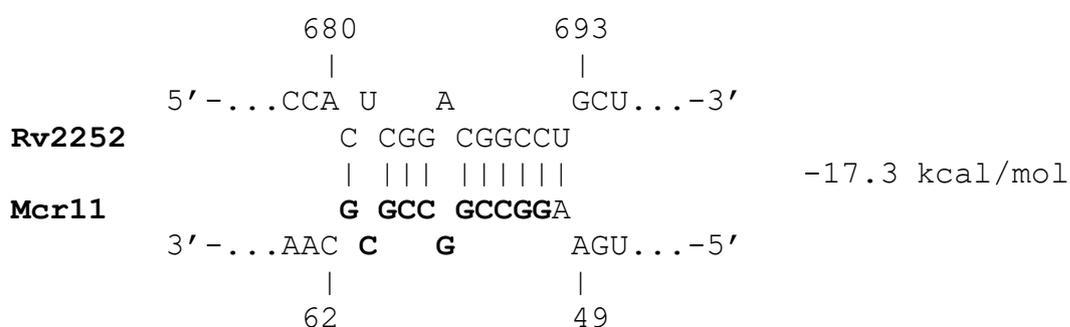
Secuencia "Seed": 5'-GGCCGGCCGCG-3'



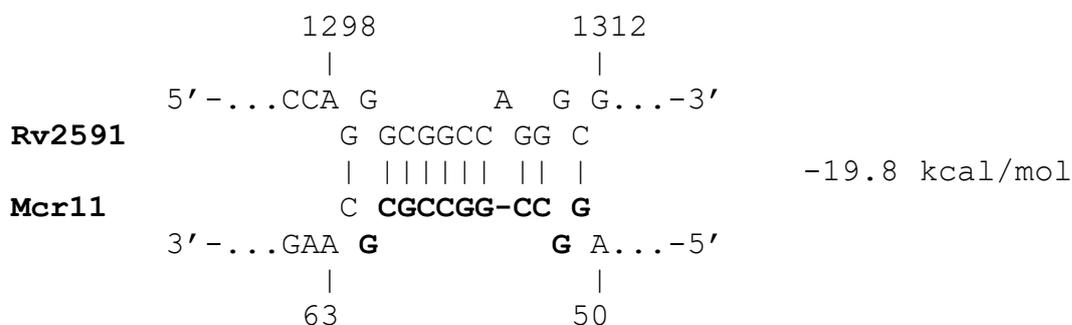
2.



3.



4.



5.



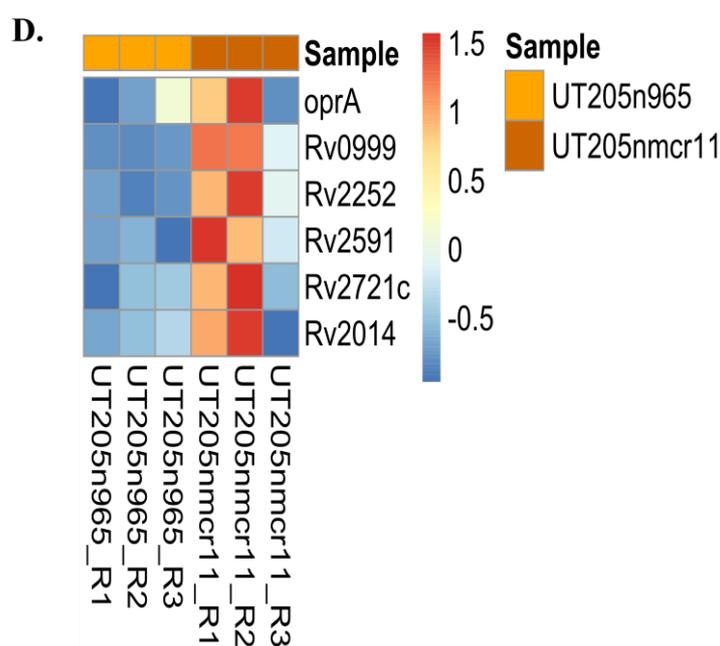
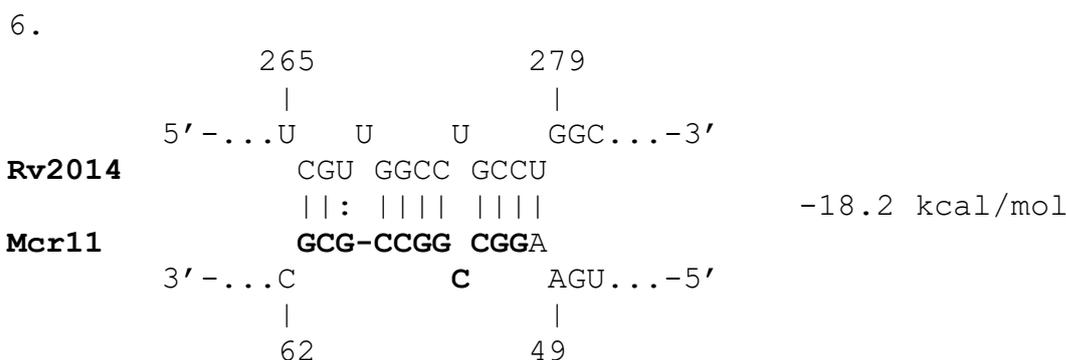


Figura 14: Estructura secundaria, secuencia “seed” y posibles blancos de Mcr11: A. Alineamiento de los 130 nt de Mcr11 para las bacterias H37Rv, UT127 y UT205 obtenidas a partir del secuenciamiento del genoma y transcriptoma de UT127 y UT205. La secuencia de Mcr11 para H37Rv se obtuvo de la base de datos Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>). Los asteriscos señalan la posición de un cambio de nucleótido **B.** Predicción de las estructuras secundarias a través de mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>). En los círculos se encierra los cambios de nucleótido de la secuencia de Mcr11 para cada bacteria y los corchetes rojos flanquean la secuencia “seed”. En la parte inferior de cada estructura secundaria se observa su energía libre mínima **C.** Genes candidatos para ser blancos de regulación por parte de Mcr11. La secuencia “seed” se resalta en negrilla. Se esquematiza el apareamiento entre el sRNA y el mRNA de cada gen su respectiva energía libre mínima **D.** Heatmap de los genes candidatos a ser los blancos de Mcr11 en UT205. Se observa las tres réplicas de UT205-965 y UT205-965 (aplicación del z-score)

dicho sRNA.

Nos preguntamos también cuál sería el papel de Mcr11 durante una infección a la línea celular humana THP-1 diferenciada a macrófagos. Estas células fueron infectadas por 8 horas con UT205-965 y UT205-Mcr11 y se evaluó a través de citometría de flujo su nivel de viabilidad. En la figura 15.B, muestra una citometría representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado, en donde se observan los macrófagos sin infectar, usados como control (panel superior), macrófagos infectados con UT205-965 (panel central) y aquellos infectados con UT205-Mcr11 (panel inferior). Para cada condición se analizó el tamaño y la granularidad de las células y las tinciones Hoechst, que tiñe los núcleos y yoduro de propidio (PI), que es un colorante impermeable a la membrana y que se intercala en el DNA al penetrar la célula cuando esta ha sufrido un daño en la membrana. En cuanto a tamaño y granularidad se observó que las células infectadas con UT205-965 mostraban un mayor cambio morfológico con respecto al control sin infección, comparado con las células infectadas con UT205-Mcr11 (Fig. 15.B, panel de la izquierda). En cuanto a las tinciones se observó que los macrófagos infectados UT205-965 mostraban un porcentaje menor de células viables (panel de la derecha: PI- y Hoechst-) comparado con los macrófagos infectados con UT205-Mcr11. También evaluamos la tinción DIOC6, que indica el potencial de membrana mitocondrial junto con PI y encontramos resultados similares (datos no mostrados). La figura 15.C, resume los datos cuantitativos de viabilidad de los tres experimentos independientes, teniendo en cuenta las tinciones PI y Hoechst, en donde se confirma que los porcentajes de viabilidad de los macrófagos se reduce significativamente si son infectados con UT205-965 que cuando se infectan con UT205-Mcr11. Estos resultados indican que cuando hay una reducción de este sRNA, la bacteria no es capaz de inducir los mismos niveles de muerte en una célula hospedera.

Finalmente, quisimos observar cuanta bacteria era recuperada tras la infección en los macrófagos y de esa manera, determinar si la bacteria estaba siendo eliminada por las células de una manera más eficiente cuando Mcr11 estaba en bajos niveles. Para esto, realizamos un experimento de infección por triplicado de los macrófagos (8 horas), con las bacterias UT205-965 y UT205-Mcr11. Posterior a la infección, se realizó una lisis de las células con 1 mL de PBS con tyloxapol al 0,05%, a partir de cual se realizaron diluciones seriadas que fueron entonces sembradas en medio sólido 7H10 para cuantificar las UFC. Tras varios días de incubación a 37 °C, se evidenció una reducción

moderada de los conteos de las UFC obtenidas de los lisados de macrófagos infectados con UT205-Mcr11 comparado con los lisados de células infectadas con el control (Fig. 15.D). De manera muy interesante notamos que la cepa UT205-Mcr11 generaba colonias fenotípicamente distintas a las de la cepa control, mostrando colonias cremosas, opacas y con bordes irregulares comparadas con las colonias de UT205-965 (Fig. 15.E). Este fenotipo podría indicar que la reducción de Mcr11 podría estar afectando la composición de la pared de la bacteria, tal vez a nivel lipídico.

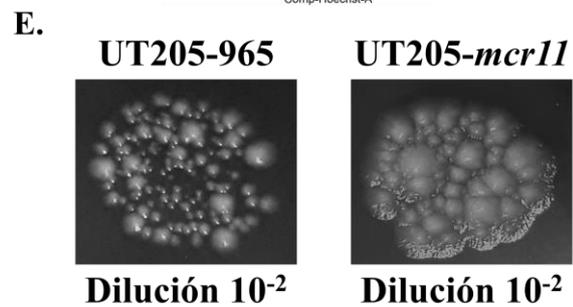
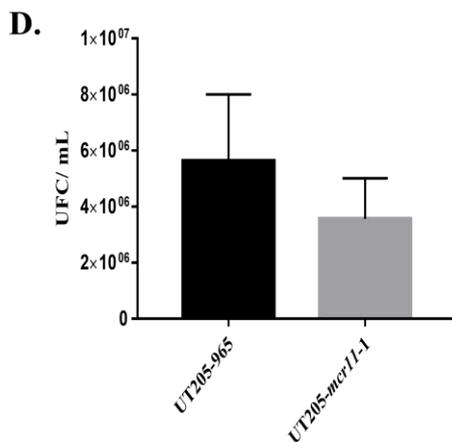
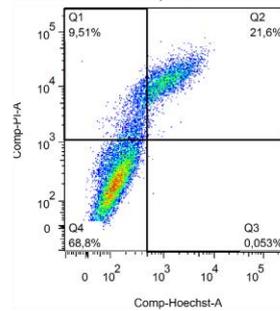
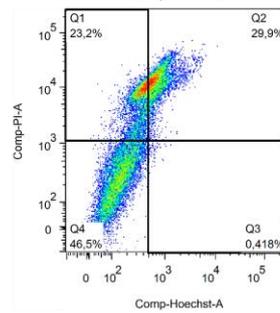
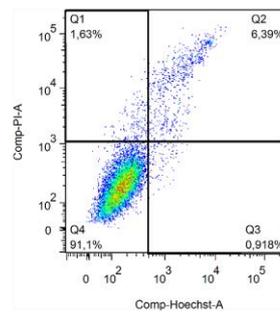
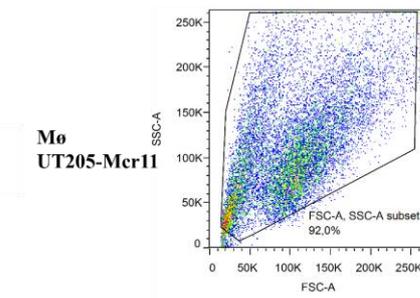
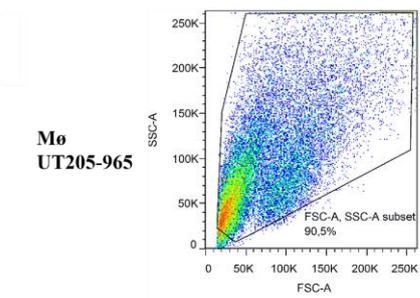
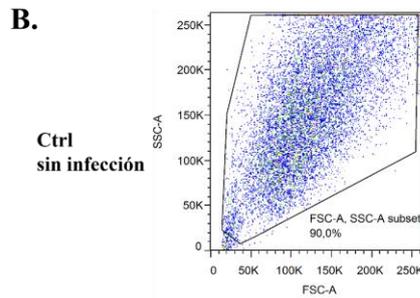
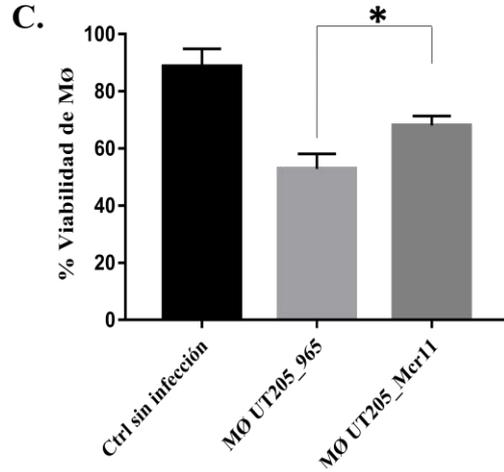
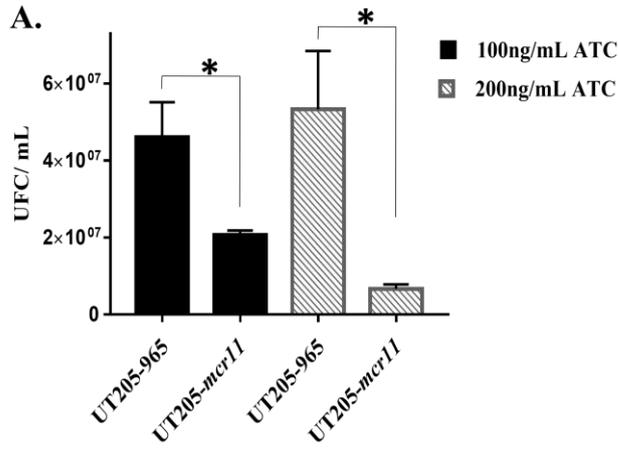


Figura 15: Viabilidad de UT205 y las células THP-1 infectadas, cuando se silencia Mcr11:

A. Cuantificación de las UFC de UT205-965 y UT205-Mcr11 cultivadas en medio sólido 7H10 en presencia de 100 y 200 ng/mL de ATC. Los asteriscos representan la significancia estadística con un valor $p < 0,05$ determinado por una prueba de T de Student **B.** Imagen representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado para la determinación de los porcentajes de viabilidad de los macrófagos sin infección (control), infectados con UT205-965 (M \emptyset -UT205-965) e infectados con UT205-Mcr11 (M \emptyset -UT205-Mcr11). En el panel de la izquierda se evaluó el tamaño y granularidad de las células a través del detector frontal (FSC) y lateral (SSC de la derecha se evaluó las tinciones PI-Hoechst. Células definidas como viables: PI (-) – Hoechst (-). **C.** Cuantificación promedio del porcentaje de células viables de tres experimentos independientes realizados por triplicado, para el control sin infección (Ctrl sin infección), M \emptyset -UT205-965 y M \emptyset -UT205-Mcr11. * valor $p < 0.05$ (determinado por una prueba de ANOVA de una vía) **D.** Cuantificación de las UFC de UT205-965 y UT205-Mcr11 recuperadas tras la lisis de los macrófagos sometidos a una infección de 8 horas por triplicado en presencia de 100 ng/mL de ATC. **E.** Fotografía representativa de las colonias de UT205-965 y UT205-Mcr11 obtenidas en la dilución 10^{-2} , sembradas a partir del lisado de macrófagos infectados por 8 horas en presencia de 100 ng/mL.

10. Discusión y perspectivas

Mtb como causante de la TB, continúa siendo un problema de salud pública global, por lo cual es muy importante seguir comprendiendo los mecanismos que rigen su patogenicidad con la idea de poder desarrollar mejores tratamientos. Las redes de regulación hacen parte de estos mecanismos de patogenicidad, pero su comprensión aún es escasa, especialmente aquellas redes de la que hacen parte los sRNAs. Es este estudio nosotros ampliamos el conocimiento que se tiene acerca del sRNA Mcr11 empleando la técnica de CRISPRi de *S. thermophilus*. Con dicha técnica logramos silenciar el gen *mcr11* en tres cepas de Mtb a través de un gRNA específico, lo que llevó a que la bacteria tuviera un defecto en el crecimiento, y en el caso de UT205, se observó una agregación bacteriana en el medio líquido y un cambio en la morfología de la colonia. Esto evidencia una vez más la importancia de los sRNAs en Mtb, puesto que también se conoce que algunos sRNAs parecen ser esenciales para el crecimiento *in vitro* de la bacteria como el ncRv0810c, ncRv0897, ncRv11315, ncRv1329, ncRv12783c, ncRv13418cA, ncRv13418cB y ncRNA3583A, los cuales se analizaron por mutagénesis con transposones (212). Más aun, la sobreexpresión de los sRNAs B11 y G2 son letales para Mtb mientras que la de F6 afecta en gran medida su crecimiento (98). MrsI, otro sRNA de Mtb, parece ser necesario para la adaptación óptima de la bacteria a ambientes bajos en hierro (39). Bacterias con un silenciamiento de este sRNA crecen a niveles subóptimos cuando se cultivan en ausencia de hierro, comparado con bacterias silvestres.

El mecanismo a través del cual estos sRNAs pueden mediar procesos fisiológicos tan importantes, es por medio de la regulación de la expresión génica. Se ha descrito que, por lo general, sRNAs codificados en trans como Mcr11, funcionan como represores al unirse a un mRNA blanco evitando su traducción o promoviendo su degradación como GcvB y RyhB presentes en enterobacterias, VrrA en el patógeno *Vibrio cholerae* (213), *Mcr7* (46) y *MrsI* (39) en Mtb.

Mcr11 y su posible efecto sobre la regulación osmótica en Mtb

A través de un análisis transcriptómico durante un silenciamiento de Mcr11, identificamos 10 genes regulados positivamente en H37Rv y UT127, los cuales también presentaban una tendencia a incrementarse en UT205. De este grupo, sólo tres genes,

oprA, *dagK* y *citE*, poseen cierta descripción funcional la cual fue detallada en los resultados. Es interesante, que la regulación del gen *oprA*, el cual es conocido por sobreexpresarse significativamente cuando Mtb es sometida a estrés osmótico, presente además, cambios morfológicos y agregación de la bacteria, fenotipos observados también durante el silenciamiento de Mcr11. Como se señaló en los resultados, este gen, que además es un posible blanco de Mcr11, codifica para la proteína osmosensora OprA, la cual participa en la adaptación de Mtb a los cambios osmóticos del medio al parecer alterando el peptidoglicano de la pared celular de Mtb (156, 214). El peptidoglicano se sabe que además de mantener la morfología celular, provee a las bacterias una barrera mecánica que ayuda a resistir los retos osmóticos del ambiente (215). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible hipotetizar que bajo una inducción de OprA (como en nuestro caso, cuando silenciamos Mcr11), Mtb podría estar teniendo dificultades para regular su homeostasis. Se ha descrito que el estrés osmótico lleva a la alteración en el crecimiento de otras bacterias (216, 217) y de Mtb (218), además de la disminución en la síntesis de oligosacáridos y alteración de transportadores de membrana (217) fenómenos que estamos observando al silenciar Mcr11. También se ha observado como las altas salinidades en el medio extracelular llevan a una alteración de lípidos de membrana de Mtb, como los PIMs (218). De igual forma, estas alteraciones se han observado en otras bacterias (219) y resulta interesante que al silenciar Mcr11 se observe una represión de genes que codifican para proteínas implicadas en la biosíntesis de dichos lípidos. La respuesta general de muchas especies bacterianas al estrés osmótico se ve reflejada en cambios en las concentraciones de iones como el potasio (220-222), además de la generación de osmoprotectores como la trehalosa y el manitol (221, 223). Hemos encontrado semejanzas entre la respuesta transcripcional de otras bacterias al estrés osmótico y la respuesta Mtb al silenciamiento de Mcr11. Por ejemplo, la exposición de *E. coli* (K-12, MC4100) a un estrés osmótico resulta en la reducción de genes que codifican para proteínas ribosomales, del metabolismo energético, genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos y también se ha observado una disminución en la tasa de replicación (224, 225). Se sabe que *E. coli* responde rápidamente al estrés osmótico importando grandes cantidades de potasio, disminuyendo la respiración y además se observa un cambio importante del pH intracelular (225). El bacilo Gram positivo *Jeotgalibacillus malaysiensis*, en respuesta al estrés osmótico, también muestra una represión de proteínas inmersas en la síntesis de aminoácidos, producción de energía (por ejemplo, el ciclo TCA), biosíntesis de carbohidratos, lípidos y un cambio

morfológico (222). Esta información apoya la hipótesis en la cual al silenciar Mcr11, se ve afectada la capacidad osmorreguladora de Mtb, posiblemente desencadenada por un aumento de la expresión de OprA.

La respuesta de UT205 al silenciamiento del sRNA es notablemente distinta a la de las otras dos cepas de Mtb (H37Rv y UT127). Como consecuencia del silenciamiento de Mcr11, UT205 no logra crecer y a nivel transcriptómico se observa una gran cantidad de genes regulados negativamente, encontrándose entre estos varios genes esenciales, moléculas asociadas a la envoltura celular (membrana y pared) y a procesos metabólicos. La respuesta diferencial de las tres bacterias al silenciamiento del mismo sRNA, nos llevó a preguntarnos ¿qué factores podría estar condicionando a UT205 para que se viera afectada a tal magnitud? Encontramos entonces que UT205 posee, a diferencia de las otras, una delección de 13 nucleótidos que generan un cambio en el marco de lectura y la generación de un codón de parada de la transducción del gen *kdpD* (Fig. 16.A). Este gen codifica para la proteína de membrana KdpD que hace parte del TCS KdpDE. Mutaciones en este sistema llevan a un aumento en la virulencia de Mtb al infectar ratones SCID comparado a la cepa silvestre (28). Además de esto, KdpDE responde a diferentes estímulos, principalmente a cambios en los niveles de potasio (K^+), pero también a los niveles de ATP y a la presión osmótica y de turgencia, entre otros (221). Podríamos especular, que la carencia de este sistema de regulación, sea una posible explicación a la diferencia fenotípica y transcriptómica de UT205, en respuesta al silenciamiento de Mcr11.

En cuanto al K^+ , podemos decir que este ion ha sido ampliamente asociado a procesos de regulación osmótica (227-229), esto debido a que funciona como un osmolito que se acumula en el citoplasma, con el fin alcanzar un estado osmótico controlado. La ausencia del K^+ , lleva a que las células sean incapaces de responder a un estrés osmótico (227) y además es importante para la regulación del pH (156, 230, 231) debido a que favorece un gradiente electroquímico (231). En un trabajo realizado por Salina y colaboradores (156), evaluaron el efecto que tenía la deficiencia de K^+ en la fisiología de Mtb. En este contexto, encontraron que la micobacteria era incapaz de crecer, adoptando un fenotipo al que llamaron bacterias no cultivables (NC). Se determinó que estas bacterias NC eran viables, pero se entraban en un estado similar a la dormancia, del cual, lograban recuperarse rápidamente si se sembraban de nuevo en un medio con K^+ . La relación con un estado similar a la dormancia se determinó a través de un

análisis a nivel transcriptómico al comparar las bacterias NC sembradas en medio sin K^+ con bacterias control sembradas en medio con este ion (156). Interesantemente, en el transcriptoma de estos bacilos NC, se observan varias similitudes con nuestros resultados transcripcionales. Los bacilos NC mostraron una regulación negativa de genes asociados a la producción energética, en el ciclo del ácido cítrico (*icd2* y *gltA2*) y el transporte de electrones (citocromos, NADPH), además de componentes de la pared celular (*umaA*), vías metabólicas, proteínas ribosomales y transportadores de membrana, lo cual ocurre de manera similar en UT205 cuando silenciamos Mcr11. En un siguiente trabajo publicado por los mismos autores, buscaron modelar el estado de dormancia en Mtb inducido por la ausencia de K^+ , para lo cual, dividieron esta fase de crecimiento en dormancia temprana (DE), media (DM) y tardía (DL) (149). En sus análisis transcriptómicos se pueden observar también grandes similitudes en cuanto a los genes regulados negativamente comparados con nuestros resultados de silenciamiento de Mcr11. Por ejemplo, se observa una represión de genes asociados a la cadena de transporte de electrones (citocromo c y NADH), de transporte de fosfato, procesos metabólicos, proteínas ribosomales y alteraciones en los sistemas toxina-antitoxina en las diferentes etapas de la dormancia. Notablemente, los autores encontraron que varios RNAs no codificantes presentaban una variación transcripcional en el estado de quiescencia, entre los cuales está Mcr11 (en este estudio es nombrado como MTS0997) (149). Los niveles de expresión de Mcr11 se determinaron en la fase logarítmica y las tres etapas de la dormancia, mostrando un nivel de expresión similar entre a fase logarítmica y la DE con una caída significativa en las etapas DM y DL (149), postulando un posible rol regulador de este sRNA Mcr11 durante la dormancia.

En resumen, toda esta información sumada a nuestros resultados fenotípicos y transcriptómicos, nos llevan a proponer que el silenciamiento de Mcr11 ocasiona una falla en la capacidad osmorreguladora de Mtb, desencadenada posiblemente por el aumento en la expresión de OprA y con esto su efecto deletéreo sobre la homeostasis bacteriana. Este escenario de afectación osmótica en la pared de la bacteria podría desencadenar una desregulación de las concentraciones de K^+ . El estrés osmótico y el desbalance del K^+ podrían explicar el retraso en el crecimiento de las bacterias al silenciar Mcr11. Es importante aclarar que esta hipótesis requiere de experimentación adicional para establecer el papel de Mcr11 y su relación con el estrés osmótico.

El sistema de dos componentes KdpDE podría jugar un papel relevante en este punto dadas sus funciones regulatorias, a través de las cuales las cepas H37Rv y UT127 pudiesen estar sobrellevando en alguna medida el estrés. Por otro lado, la ausencia de KdpD en UT205 causaría un estrés mayor respecto al K⁺ como en las bacterias NC (156), similar a la dormancia. A pesar de que hay una disminución importante de la actividad metabólica, las bacterias NC no mueren, debido a que lograron crecer cuando las concentraciones de K⁺ aumentaron en el medio, esto es similar a nuestros resultados en UT205 cuando las bacterias volvieron a crecer en ausencia de ATC después de la infección de los macrófagos. Por otro lado, la envoltura celular de UT205 se vio fuertemente afectada, debido a que se encontraron disminuidos genes asociados a componentes lipoproteicos, glicolípidos, transportadores de membrana (Fig. 13.D y Fig. 13.E), por lo cual postulamos que tales efectos, sean la consecuencia de un desbalance osmótico e iónico, al cual UT205 intenta adaptarse al buscar ingresar K⁺, pero se encuentra con un problema debido su KdpD no funcional, que lleva a que la bacteria afronte un fallo en la regulación de las concentraciones de dicho ión (Fig. 16.B). Todas estas características podrían entonces ser una hipótesis explicativa del por qué el silenciamiento de Mcr11 en UT205 afecta en gran medida su crecimiento y su transcriptoma.

Regulón de Mcr11

Mcr11 se encuentra codificado en el cromosoma de Mtb en medio de el gen *rv1264* que codifica para una adenilato ciclasa (AC) y *rv1265*, que codifica para el factor de transcripción AbmR, además seguido de este se encuentra el gen *rv1266c*, que codifica para la proteína quinasa PknH. Una característica de la regulación génica en bacterias, es que su genoma contiene regulones, los cuales son estructuras de co-regulación y en donde generalmente la función de los genes integrantes está relacionada a una vía común.

En el caso de Mcr11, se ha postulado que el locus donde se encuentra codificado, está inmerso en el metabolismo del AMPc. En la literatura se ha informado que Mcr11 disminuye su expresión cuando el pH disminuye (116). Por el contrario, su expresión aumenta cuando la bacteria alcanza la fase estacionaria de crecimiento (42, 116). En cuanto a la función de los genes cercanos a Mcr11, se sabe que la AC Rv1264 sólo es activa a un pH más bajo, debido a su dominio N-terminal auto-inhibitorio sensible al pH

(232-235). Este ambiente ácido se encuentra generalmente dentro del fagosoma. Muy importante, la AC Rv1264 es necesaria para la expresión de Mcr11. Rv1265 o AbmR, es un FT que une ATP, genera una regulación negativa hacia su propio promotor y positiva hacia Mcr11 (235). En la región promotora de AbmR se ha descrito la presencia de dos sitios canónicos para la unión de los FTs Cmr y CRP_{Mt}, los cuales responden los niveles de AMPc (148). PknH (Rv1266c), una serina/treonina quinasa clase II (al igual que PknD y PknE), fosforila a AbmR (148). Además, esta enzima, se ha relacionado con la activación del FT EmbR el cual favorece la transcripción de EmbA y EbmB, dos glicosiltransferasas implicadas en la síntesis del arabinogalactan (236, 237) y se sugiere que podría controlar la síntesis de LM y LAM también a través de EmbR (236). Asimismo, se ha sugerido que PknH podría estar involucrado en el proceso de latencia.

Nuestros resultados transcripcionales en cuanto a estos genes mostraron que cuando silenciamos Mcr11, a través de CRISPRi, la AC Rv1264 y PknH (Rv1266c) sufrían una regulación negativa en las tres bacterias (Tabla 4) (Fig. 12.D y Fig. 13.E).

Teniendo en cuenta toda la información encontrada en la literatura, el efecto que tuvo el silenciamiento de Mcr11 sobre sus genes vecinos y el probable papel represor de los sRNAs sobre la expresión génica, planteamos el siguiente modelo: El sRNA Mcr11 participa en el control de la osmorregulación de Mtb mostrado a través de su silenciamiento, lo que trae consigo una sobreexpresión de OprA que posiblemente modifica las características de la pared celular, cambiando su grosor. Una vez esto ocurre, la bacteria empieza a sufrir de estrés osmótico y para sobrellevarlo uno de sus mecanismos es la toma de K⁺ del medio. La regulación de OprA puede entonces dificultar la toma de dicho ion, con lo cual se podrían empezar a necesitar transportadores de potasio como CeoBC (homólogo de TrkA) y KdpDE. Por un lado, como es conocido, CeoBC tiene la capacidad de mover hidrogeniones a través de la membrana celular, con lo cual, al intentar entrar K⁺, podría también estar induciendo una disminución del pH. Es conocido que los genes que hacen parte del locus donde se encuentra codificado Mcr11 en el genoma responden a cambios en el pH. Respecto a PknH, se sabe que disminuye su expresión a pH bajo, en cuanto a *rv1264* a nivel proteico posee un dominio que censa el pH e incluso el mismo Mcr11 disminuye su expresión cuando el pH es bajo. Teniendo en mente esto, una posibilidad por la cual *rv1264* y *pknH* se hayan visto regulados negativamente en las tres bacterias tras el

silenciamiento de *Mcr11*, sea provocado por un cambio en la pared celular y una variación del pH. En el caso de UT205 que tiene un sistema deficiente de transporte de K^+ (*KdpD*), tendría una capacidad reducida para controlar los niveles de este ión, llevándola a manifestar un perfil transcripcional similar a los descritos para microorganismos que se someten a un estrés osmótico o deprivación de K^+ . Sería interesante poder complementar a UT205 con un plásmido que produzca una proteína *KdpD* funcional para ver si responde como H37Rv o UT127 cuando se silencia *mcr11*.

A pesar de la evidencia que apoya la hipótesis planteada, los antecedentes de los que partimos, señalan que la función de *Mcr11* se relaciona con el metabolismo del AMPc. A través de nuestros resultados no fue posible determinar un mecanismo a través del cual, el AMPc conecta a todos los genes en el locus de *Mcr11* (*rv1264*, *rv1265* y *rv1266c*). Existe evidencia que *Mcr11* disminuye su expresión cuando la AC *Rv1264* está ausente. Además, deleciones del FT *CRP*, que responde al AMPc, lleva también a una disminución en la expresión de *Mcr11*, tanto en fase exponencial como estacionaria (148). Teniendo en cuenta lo anterior, y que en la región intergénica entre *Mcr11* y *AbmR* (*Rv1265*) existe motivos de unión para *CRP* y *Cmr*, cabe la posibilidad de que esté FT, y tal vez *Cmr*, se activen a través del AMPc producto de *Rv1264*, se unan a la región intergénica y favorezcan así, la expresión del *Srna* (Fig. 16.C). Siendo esta una propuesta del posible mecanismo en el cual, *Mcr11* está inmerso en el metabolismo del AMPc, la cual requiere ser demostrada con evidencia experimental adicional. En la figura 16.C se observa un esquema local de la regulación en presencia (arriba) y ausencia (abajo) de *Mcr11*.

Silenciamiento de *Mcr11* en *Mtb* y el aumento en la viabilidad de macrófagos infectados

Por mucho tiempo se ha creído que la contención de la micobacteria en las células fagocíticas hospederas, principalmente macrófagos alveolares, y su eliminación intracelular, es muy importante para limitar la progresión de la infección y con ella de la enfermedad (238, 239). Para este fin, las células infectadas activan diferentes mecanismos de defensa, pero se sabe que *Mtb* es capaz de evadirlos y con ello continuar con su replicación intracelular. La carga bacteriana aumenta y se induce una muerte celular principalmente por necrosis y necroptosis que implica lisis celular y liberación de las micobacterias para su diseminación, lo cual es importante para mantener la fase

crónica de la enfermedad (240, 241). Esta capacidad de evadir los mecanismos de defensa se ha relacionado con el nivel de virulencia de la micobacteria, así pues, bacterias como *M. smegmatis*, BCG o cepas atenuadas como H37Ra son eliminadas eficientemente por los mecanismos protectores mientras que aquellas cepas virulentas se vuelven persistentes y favorecen la progresión de la enfermedad (242-245).

Nuestros resultados de viabilidad al infectar macrófagos con UT205-Mcr11, indican que su capacidad de inducir muerte celular se ve reducida (Fig. 15.B y Fig. 15.C) por lo cual es posible pensar que este sRNA pudiese estar regulando de cierta manera la virulencia de la micobacteria. Es claro en nuestros resultados que, por un lado, estos resultados pudiesen ser consecuencia de la reducción en la actividad metabólica que sufre la bacteria a causa del silenciamiento del sRNA pero, por otro lado, los resultados transcriptómicos muestran la represión de varios genes que se han implicado en la patogenicidad de Mtb pudiendo ser una razón importante para el fenómeno que observamos.

Entre los genes asociados a virulencia que se reprimieron en UT205 al silenciar Mcr11 están las proteínas de la familia ESAT-6 (*esxI*, *esxN*, *esxO*, *esxB*, *esxD*, *espJ*) (Fig. 13.D y Fig. 13.E). De esta familia se conoce su papel sobre la virulencia de Mtb al ser reconocidos como inmunógenos importantes. Dos integrantes de esta familia, ESAT-6 y CFP-10, desencadenan una respuesta por parte de células T y se encuentran presentes sólo en cepas virulentas (246, 247), además de que se han relacionado con el escape de Mtb del fagolisosoma (248, 249) y con la inducción de muerte celular (250). Se ha reportado que los niveles de expresión de ciertos integrantes de esta familia son significativamente menores en cepas avirulentas comparada con cepas virulentas (251). También se encuentran regulados negativamente genes implicados en la síntesis de glucolípidos y lípidos como el SL-1 (PapA2), PIM y LAM (*ino1*, *rv2252*, *pimE*, *pimF* y *rv2181*), DAT (*papA3*), PAT (*chp2*) (Fig. 12.E y Fig. 12.F), todos estos ampliamente asociados a virulencia. Por ejemplo, el SL-1 se ha relacionado con la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma y reduce la producción de especies reactivas del oxígeno en el contexto de una infección a macrófagos, encontrándose sólo en Mtb (81, 252). Los glicerofosfolípidos PIM y el LAM que hacen parte de la envoltura celular y se sabe que cumplen un papel relevante en la interacción de la bacteria con el huésped, además, se conoce que el LAM participa en la inhibición de la maduración del fagosoma (252, 253). Los ésteres de trehalosa como el DAT y PAT también hacen parte de la envoltura

externa y sólo están presentes en micobacterias virulentas (252). Cabe la posibilidad de que una de las razones por las cuales observamos una disminución de estos lípidos, SL-1, DAT y PAT específicamente, se deba a una represión de WhiB3 en UT205, el cual, a pesar de que no alcanzó el punto de corte en nuestros análisis transcriptómico, posee una tendencia a reducirse (Log₂ FC -1,06 y valor P 6,41E-03) cuando se silencia Mcr11. Se ha descrito que este factor de transcripción fomenta la síntesis de estos lípidos y su disrupción genera una clara disminución de su presencia en la envoltura de Mtb (254).

Dos genes implicados en las modificaciones de los ácidos micólicos (*mmaA1*, *umaA*) estaban disminuidos en UT205 cuando se silenció Mcr11. En cuanto a los ácidos micólicos podemos decir que son los mayores constituyentes de la pared celular (40 al 60% del peso seco de la bacteria) y cumplen papeles importantes en la interacción con la célula hospedera. Alteraciones en la estructura o la síntesis de los ácidos micólicos se ha observado que afectan a la virulencia de la micobacteria (81, 255) como cuando se eliminan los ceto-micolatos que lleva a un crecimiento limitado de la bacteria en macrófagos (256). El gen *mmaA1* codifica para una de las metiltransferasas implicadas en la ciclopropanación de los metoxi y cetomicolatos de Mtb (257). La pérdida de estas enzimas genera cepas fuertemente atenuadas en ratón y con mayor estímulo inflamatorio (258). Cabe la posibilidad de que la represión de todos estos genes asociados a virulencia, expliquen en parte la incapacidad de UT205 de inducir muerte celular en los macrófagos después del silenciamiento de Mcr11 (Fig.16.D). Es importante destacar, con respecto a este resultado, los antecedentes que se tienen acerca de UT205, que como se nombró al inicio, parece tener una mayor virulencia al compararlo con UT127, dado que inducía en mayor proporción muerte celular similar a necrosis en monocitos humanos. A pesar del aumento en la viabilidad de los macrófagos cuando se infectaron con UT205-Mcr11, la cantidad de UFC recuperadas en estas células comparadas a las infectadas con el control UT205-965 no difiere significativamente (Fig. 15.D). Es posible que el silenciamiento de Mcr11 en Mtb durante la infección, se asemeje al efecto de un antibiótico bacteriostático, que no elimina en realidad a la bacteria, sino que, en su lugar la introduce en un estado similar a latencia. Sería interesante determinar si el silenciamiento de Mcr11 en Mtb durante una infección, lleva a las bacterias a tener una mayor resistencia contra antibióticos bactericidas.

Finalmente, en este trabajo se buscó describir con más detalle la función reguladora de Mcr11 en dos aislados clínicos y la cepa de referencia H37Rv. Nuestros resultados nos llevan a proponer que el sRNA Mcr11 parece estar implicado en procesos osmorreguladores importantes teniendo en cuenta los fenotipos observados y su regulación transcripcional. Sería interesante analizar la expresión de Mcr11 y de OprA bajo condiciones restrictivas de potasio en estas tres bacterias. También resulta llamativo observar el silenciamiento de este sRNA *in vitro* al infectar macrófagos tisulares humanos e *in vivo* en un modelo animal experimental. Esta información podría dar más luces acerca de la función de Mcr11 y su posible papel a nivel osmótico. Finalmente, sería importante medir los niveles de AMPc además del pH intracelular en bacterias con silenciamiento de Mcr11 y comparándolas con bacterias silvestres. Se conoce que tanto el AMPc como el pH tienen efectos sobre la expresión de Mcr11, y nos permitiera establecer con mayor claridad sus implicaciones y efectos sobre la fisiología de Mtb.

los pasos ① y ②. En el momento en que la bacteria intenta regular el K^+ , se encuentra con la ausencia de la regulación mediada por ③ KdpDE debido a la delección de 13 nucleótidos presente en el gen *kdpD*. Que genera una proteína incompleta, incapaz de activar a KdpE. Esta ausencia resulta en una respuesta transcriptómica en la cual se disminuye la actividad metabólica, los componentes de membrana y pared celular, moléculas asociadas a virulencia, transportadores de membrana, entre otros. **C.** Se esquematiza un modelo de regulación local, cuando Mcr11 está presente (arriba) y cuando está ausente (abajo). **Arriba:** Cuando la bacteria alcanza la fase estacionaria de crecimiento, *mcr11* aumenta su nivel de transcripción y, por ende, hay una disminución de la expresión de sus genes blancos. Por otro lado, al existir unas condiciones de pH controlado podría ser posible la expresión de la adenilato ciclasa Rv1264 (roja), la cual al generar AMPc, podría estar fomentando la activación de los FTs CRP y CMR. Estos a vez, podrían favorecer la expresión de Mcr11, debido a la presencia de dos motivos canónicos para estos FTs en la región intergénica entre el gen del sRNA y AbmR (verde). También, con un pH controlado podría expresarse la serina/treonina PknH (café), la cual se ha asociado con la activación del FT EbmR, implicado en la expresión de las glicosiltransferasa EmbA y EbmB y del LM y LAM. Además, se cree que esta enzima, fosforila a DosR y a AbmR. Recientemente se demostró que AbmR era un FT que generaba una autorregulación negativa sobre su propio promotor y positiva sobre el gen de Mcr11. **Abajo:** El silenciamiento de Mcr11, generado a través de CRISPRi, lleva a un aumento de la expresión de los genes blanco del sRNA, entre estos OprA, la cual va a llevar a una alteración de la estructura de la pared celular y con ello a un desorden osmótico. La bacteria en su intento de controlar estas perturbaciones podría sobreactivar los transportadores de K^+ , y con ello disminuir el pH intracelular debido a un aumento en la importación de hidrogeniones. Con estas condiciones de acidez podrían entonces disminuir la transcripción de los genes vecinos Rv1264 y PknH. Las líneas verdes y rojas representan inducción y represión transcripcional, las punteadas indican activación. **D.** El diagrama muestra el modelo de regulación de Mcr11, determinante durante una infección. A la izquierda se observa un macrófago infectado con el control UT205-965, bacteria que cuenta con todos sus factores de virulencia a través de los cuales es capaz de inducir mayores niveles de muerte celular, o en otras palabras, una disminución en la viabilidad de las células. A la derecha se muestra la infección con UT205-Mcr11 que presentaba un silenciamiento de Mcr11. Esta bacteria ha perdido varios de sus factores de virulencia con lo cual su capacidad de inducir muerte celular se reduce. Estos macrófagos muestran mayores niveles de viabilidad.

11. Referencias

1. Organisation WH. Global WHO report on tuberculosis. 2018.
2. Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis en las Américas. 2018.
3. López Pérez MP. INFORME DE EVENTO TUBERCULOSIS, COLOMBIA, 2017 [Internet]. [cited 2019 May 16]. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Tuberculosis 2017.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Tuberculosis%202017.pdf)
4. Rouanet C, Locht C. Boosting BCG to protect against TB. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2010 Jun 9 [cited 2019 May 16];4(3):339–48. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/ers.10.25>
5. Behr MA. BCG — different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2002 Feb [cited 2019 May 16];2(2):86–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309902001822>
6. Bourdin Trunz, PEM Fine CD. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a metaanalysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* [Internet]. 2006 [cited 2019 May 16]; Available from: www.thelancet.com
7. Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2019 May 16];22(3):160–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490601018658?via%3Dihub>
8. Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* [Internet]. 1995 Nov 18 [cited 2019 May 16];346(8986):1339–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673695923489?via%3Dihub>
9. Fifteen year follow up of trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention. Tuberculosis Research Centre (ICMR), Chennai. *Indian J Med Res* [Internet]. 1999 Aug [cited 2019 May 16];110:56–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573656>
10. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective Effect of BCG against Tuberculous Meningitis and Miliary Tuberculosis: A Meta-Analysis. *Int J Epidemiol* [Internet]. 1993 [cited 2019 May 16];22(6):1154–8. Available from: <https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/22.6.1154>
11. Colditz GA. Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of Tuberculosis. *JAMA* [Internet]. 1994 Mar 2 [cited 2019 May 16];271(9):698. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1994.03510330076038>
12. Kumar H, Malhotra D, Goswami S, Bamezai & RNK, Bamezai RNK. How Far Have We Reached in Tuberculosis Vaccine Development? *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2003 [cited 2019 May 16];29(4):297–312. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=imby20>

13. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Oct 11];26(6):431–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453224>
14. Trauner A, Liu Q, Via LE, Liu X, Ruan X, Liang L, et al. The within-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* vary with treatment efficacy. *Genome Biol* [Internet]. 2017 Dec 19 [cited 2017 Oct 11];18(1):71. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1196-0>
15. Aki Comas I, Gagneux S. The Past and Future of Tuberculosis Research. [cited 2019 May 16]; Available from: <http://ploscollections.org/emerginginfectiousdisease/>
16. Supply P, Warren RM, Bañuls A-L, Lesjean S, Van Der Spuy GD, Lewis L-A, et al. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol Microbiol* [Internet]. 2003 Jan 10 [cited 2019 May 16];47(2):529–38. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03315.x>
17. Hirsh AE, Tsolaki AG, Deriemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations [Internet]. 2004 [cited 2019 May 16]. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0305627101
18. Portevin D, Gagneux S, Comas I, Young D. Human Macrophage Responses to Clinical Isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* Complex Discriminate between Ancient and Modern Lineages. Bessen DE, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Mar 3 [cited 2019 May 16];7(3):e1001307. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1001307>
19. Coscolla M, Gagneux S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? [cited 2019 May 16]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2976975/pdf/nihms237477.pdf>
20. Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, et al. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing Strains Upregulate Type I IFNs and Increase Expression of Negative Regulators of the Jak-Stat Pathway. *J Interf Cytokine Res* [Internet]. 2005 Nov [cited 2019 May 16];25(11):694–701. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2005.25.694>
21. Delphi Chatterjee PJB. Phenolic Glycolipid - an overview (pdf) | ScienceDirect Topics. In *Microbial Glycobiology*; 2010 [cited 2019 May 16]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/phenolic-glycolipid/pdf>
22. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* [Internet]. 2006 Nov [cited 2019 May 17];368(9547):1575–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606695731>
23. Realpe T, Correa N, Roza JC, Ferro BE, Nica Gomez V, Zapata E, et al. Population Structure among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Pulmonary

- Tuberculosis Patients in Colombia. PLoS One [Internet]. 2014 [cited 2019 May 17]; Available from: www.plosone.org
24. Duque C, Arroyo L, Ortega H, Montúfar F, Ortíz B, Rojas M, et al. Different responses of human mononuclear phagocyte populations to Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis [Internet]. 2013;94(2):111–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2013.11.001>
 25. V Baena A, Cabarcas F, Alvarez-Eraso KLF, Isaza JP, Alzate JF, Barrera LF. Differential determinants of virulence in two Mycobacterium tuberculosis Colombian clinical isolates of the LAM09 family. Virulence [Internet]. 2019;10. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1642045>
 26. Chauhan R, Ravi J, Datta P, Chen T, Schnappinger D, Bassler KE, et al. Reconstruction and topological characterization of the sigma factor regulatory network of Mycobacterium tuberculosis. Nat Commun. 2016;7(May 2015).
 27. Galagan JE, Minch K, Peterson M, Lyubetskaya A, Azizi E, Sweet L, et al. The Mycobacterium tuberculosis regulatory network and hypoxia. Nature. 2013;499(7457):178–83.
 28. Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of Two-Component Regulatory Systems Increases the Virulence of Mycobacterium tuberculosis Downloaded from. Infect Immun [Internet]. 2003 [cited 2019 May 17];71(3):1134–40. Available from: <http://iai.asm.org/>
 29. Sala C, Grainger DC, Cole ST. Dissecting Regulatory Networks in Host-Pathogen Interaction Using ChIP-on-chip Technology. Cell Host Microbe [Internet]. 2009;5(5):430–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.007>
 30. Sanz J, Navarro J, Arbués A, Martín C, Marijuán PC, Moreno Y. The Transcriptional Regulatory Network of Mycobacterium tuberculosis. Herrmann JL, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Jul 19 [cited 2019 May 17];6(7):e22178. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022178>
 31. Li W, Deng W, Xie J. Expression and regulatory networks of Mycobacterium tuberculosis PE/PPE family antigens. J Cell Physiol [Internet]. 2019 Jun 27 [cited 2019 May 17];234(6):7742–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.27608>
 32. Raman S, Hazra R, Christopher ‡, Dascher C, Husson RN. Transcription Regulation by the Mycobacterium tuberculosis Alternative Sigma Factor SigD and Its Role in Virulence †. J Bacteriol [Internet]. 2004 [cited 2019 May 17];186(19):6605–16. Available from: <http://robotics.stanford.edu/xsliu/BioProspector/>
 33. Turkarslan S, Peterson EJR, Rustad TR, Minch KJ, Reiss DJ, Morrison R, et al. A comprehensive map of genome-wide gene regulation in Mycobacterium tuberculosis. Sci Data [Internet]. 2015 Mar 31 [cited 2019 May 17];2:150010. Available from: <http://www.nature.com/articles/sdata201510>
 34. Jiang J, Sun X, Wu W, Li L, Wu H, Zhang L, et al. Construction and application of a co-expression network in Mycobacterium tuberculosis OPEN. 2016 [cited 2019 May 17]; Available from: www.nature.com/scientificreports

35. Fisher MA, Plikaytis BB, Shinnick TM. Microarray Analysis of the Mycobacterium tuberculosis Transcriptional Response to the Acidic Conditions Found in Phagosomes Downloaded from. *J Bacteriol* [Internet]. 2002 [cited 2019 May 17];184(14):4025–32. Available from: <http://jb.asm.org/>
36. Miotto P, Forti F, Pellin AA, Veiga DF. Genome-Wide Discovery of Small RNAs in Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2019 May 17];7(12):51950. Available from: www.plosone.org
37. Płociński P, Macios M, Houghton J, Niemiec E, Płocińska R, Brzostek A, et al. Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of Mycobacterium tuberculosis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Apr 8 [cited 2019 May 17]; Available from: <https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkz251/5430836>
38. Arnvig KB, Comas I, Thomson NR, Houghton J, Boshoff HI. Sequence-Based Analysis Uncovers an Abundance of Non-Coding RNA in the Total Transcriptome of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 [cited 2019 May 17];7(11):1002342. Available from: www.plospathogens.org
39. Gerrick ER, Barbier T, Chase MR, Xu R, François J, Lin VH, et al. Small RNA profiling in Mycobacterium tuberculosis identifies MrsI as necessary for an anticipatory iron sparing response. [cited 2019 May 17]; Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1718003115
40. Aguilar-Ayala DA, Tilleman L, Nieuwerburgh F Van, Deforce D, Palomino JC, Vandamme P, et al. The transcriptome of Mycobacterium tuberculosis in a lipid-rich dormancy model through RNAseq analysis OPEN. [cited 2019 May 17]; Available from: www.nature.com/scientificreports
41. Integration of Metabolomics and Transcriptomics Reveals a Complex Diet of Mycobacterium tuberculosis during Early Macrophage Infection. [cited 2019 May 17];2:57–74. Available from: <http://msystems.asm.org/>
42. Lin W, Florez De Sessions P, Hor G, Teoh K, Naim A, Mohamed N, et al. Transcriptional Profiling of Mycobacterium tuberculosis Exposed to In Vitro Lysosomal Stress. 2016 [cited 2019 May 17]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1128>
43. Skvortsov TA, Ignatov D V, Majorov KB, Apt AS, Azhikina TL. Mycobacterium tuberculosis Transcriptome Profiling in Mice with Genetically Different Susceptibility to Tuberculosis [Internet]. Vol. 5, 62 | *ActA nAturAe* |. 2013 [cited 2019 May 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3695354/pdf/AN20758251-17-062.pdf>
44. Mostowy S, Cleto C, Sherman DR, Behr MA. The Mycobacterium tuberculosis complex transcriptome of attenuation. *Tuberculosis* [Internet]. 2004 Jan [cited 2019 May 17];84(3–4):197–204. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979204000216>

45. Minch KJ, Rustad TR, Peterson EJR, Winkler J, Reiss DJ, Ma S, et al. The DNA-binding network of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* [Internet]. 2015 [cited 2019 May 17];6. Available from: <http://networks.systemsbiology.net/mtb>.
46. Solans L, Gonzalo-Asensio J, Sala C, Benjak A, Uplekar S. The PhoP-Dependent ncRNA Mcr7 Modulates the TAT Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 17];10(5):1004183. Available from: www.plospathogens.org
47. By E, Hatfull GF, Jacobs WR. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. 2014.
48. Feklistov A, Sharon BD, Darst SA, Gross CA. Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2014 Sep 8 [cited 2019 May 17];68(1):357–76. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-092412-155737>
49. Paget MS, Helmann JD. The 70 family of sigma factors [Internet]. Vol. 4, *Genome Biology*. 2003 [cited 2019 May 17]. Available from: <http://genomebiology.com/2003/4/1/203>
50. Danson AE, Jovanovic M, Buck M, Zhang X. Mechanisms of σ^{54} -Dependent Transcription Initiation and Regulation. *J Mol Biol* [Internet]. 2019 Apr 25 [cited 2019 May 17]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283619302293?via%3Dihub>
51. Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2019 May 17];277(3):605–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2009.07479.x>
52. Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2005 [cited 2019 May 17];69(4):527–43. Available from: <http://mmbr.asm.org/>
53. RICCARDO MANGANELLI. Sigma Factors: Key Molecules in *Mycobacterium tuberculosis* Physiology and Virulence. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 17]; Available from: <http://www.asmscience.org/docserver/fulltext/microbiolspec/2/1/MGM2-0007-2013.pdf?expires=1558110546&id=id&accname=guest&checksum=DEDF75FB11AD7726F7F1CA924DFCE9F5>
54. Gonzalez A, Riley KW, Harwood T V, Zuniga EG, Risser DD, Ellermeier CD. A Tripartite, Hierarchical Sigma Factor Cascade Promotes Hormogonium Development in the Filamentous Cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. 2019 [cited 2019 May 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6495340/pdf/mSphere.00231-19.pdf>
55. Gu D, Zhang J, Hao Y, Xu R, Zhang Y, Ma Y, et al. Alternative sigma factor RpoX is a part of RpoE regulon and plays distinct roles in stress response, motility, biofilm formation and hemolytic activities in the marine pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2019 May 3 [cited 2019 May 17]; Available from: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00234-19>

56. Manganelli R, Proveddi R, Rodrigue S, Beaucher J, Gaudreau L, Smith I. Factors and Global Gene Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* [Internet]. 2004 [cited 2019 May 17];186(4):895–902. Available from: <http://jb.asm.org/>
57. Fontán PA, Voskuil MI, Gomez M, Tan D, Pardini † M, Manganelli R, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* Sigma Factor B Is Required for Full Response to Cell Envelope Stress and Hypoxia In Vitro, but It Is Dispensable for In Vivo Growth ‡ Downloaded from. *J Bacteriol* [Internet]. 2009 [cited 2019 May 17];191(18):5628–33. Available from: <http://jb.asm.org/>.<http://jb.asm.org/>
58. Babu MM. Bacterial gene regulation and transcriptional networks. 2013. 293 p.
59. Rodrigue S, Provvedi R, Jacques P-É, Gaudreau L, Manganelli R. The σ factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2019 May 17];30(6):926–41. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2006.00040.x>
60. He H, Hovey R, Kane J, Singh V, Zahrt TC. MprAB Is a Stress-Responsive Two-Component System That Directly Regulates Expression of Sigma Factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* [Internet]. 2006 [cited 2019 May 17];188(6):2134–43. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>
61. Lee J-H, Karakousis PC, Bishai WR. Roles of SigB and SigF in the *Mycobacterium tuberculosis* Sigma Factor Network. *J Bacteriol* [Internet]. 2008 [cited 2019 May 17];190(2):699–707. Available from: <http://jb.asm.org/>
62. Balázsi G, Heath AP, Shi L, Gennaro ML. The temporal response of the *Mycobacterium tuberculosis* gene regulatory network during growth arrest. *Mol Syst Biol*. 2008;4(225):1–8.
63. Gerardo Treviño-Quintanilla L, Augusto Freyre-González J, Martínez-Flores I. Anti-Sigma Factors in *E. coli*: Common Regulatory Mechanisms Controlling Sigma Factors Availability [Internet]. Vol. 14, *Current Genomics*. 2013 [cited 2019 May 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3861889/pdf/CG-14-378.pdf>
64. Paget MS, Wigneshweraraj S, Hinton DM. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* [Internet]. 2015 [cited 2019 May 17];5:1245–65. Available from: www.mdpi.com/journal/biomolecules/
65. Hughes KT, Mathee K. THE ANTI-SIGMA FACTORS. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1998 Oct [cited 2019 May 17];52(1):231–86. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.52.1.231>
66. Tierney AR, Rather PN. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiol* [Internet]. 2019 Apr [cited 2019 May 17];14(6):533–52. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2019-0002>
67. Sarva K, Satsangi AT, Plocinska R, Madiraju M, Rajagopalan M. Two-component kinase TrcS complements *Mycobacterium smegmatis* mtrB kinase mutant. *Tuberculosis* [Internet]. 2019 May [cited 2019 May 17]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979219301568>
68. Li X, Lv X, Lin Y, Zhen J, Ruan C, Duan W, et al. Role of two-component regulatory systems in intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Cell*

- Biochem [Internet]. 2019 Apr 26 [cited 2019 May 17];jcb.28792. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.28792>
69. Parish T. Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria. 2014 [cited 2019 May 17]; Available from: www.asmscience.org
 70. Ha Yeon Cho and Beom Sik Kang. Two component signaling systems in Mycobacterium tuberculosis. Bio Desing [Internet]. 2015 [cited 2019 May 17];3. Available from: http://www.bdjn.org/APP_PDF/BDJN003-01-01.pdf
 71. Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2016 Sep 8 [cited 2019 May 17];70(1):103–24. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-102215-095331>
 72. Chao JD, Papavinasasundaram KG, Zheng X, Chá Vez-Steenbock A, Wang X, Lee GQ, et al. Convergence of Ser/Thr and Two-component Signaling to Coordinate Expression of the Dormancy Regulon in Mycobacterium tuberculosis * □ S. 2010 [cited 2019 May 17]; Available from: <http://www.jbc.org>
 73. Christensen S, Serbus LR. Comparative Analysis of Wolbachia Genomes Reveals Streamlining and Divergence of Minimalist Two-Component Systems. 2010 [cited 2019 May 17]; Available from: <http://www.g3journal.org/lookup/suppl/>
 74. Pérez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martín C. An essential role for *phoP* in Mycobacterium tuberculosis virulence. Mol Microbiol [Internet]. 2001 Dec 21 [cited 2019 May 17];41(1):179–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2001.02500.x>
 75. Parish T, Smith DA, Roberts G, Betts J, Stoker NG. The *senX3-regX3* two-component regulatory system of Mycobacterium tuberculosis is required for virulence. [cited 2019 May 17]; Available from: <http://mic.sgmjournals.org>
 76. Ma Y. Two-Component System of Mycobacterium Tuberculosis [Internet]. 2016 [cited 2019 May 17]. Available from: www.smgebooks.com
 77. Zahrt TC, Wozniak C, Jones D, Trevett A. Functional Analysis of the Mycobacterium tuberculosis MprAB Two-Component Signal Transduction System. Infect Immun [Internet]. 2003 [cited 2019 May 17];71(12):6962–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308901/pdf/0616.pdf>
 78. Zahrt TC, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis signal transduction system required for persistent infections [Internet]. [cited 2019 May 17]. Available from: www.sanger.ac.uk
 79. Tiwari A, Balázs G, Gennaro ML, Igoshin OA. The interplay of multiple feedback loops with post-translational kinetics results in bistability of mycobacterial stress response. Phys Biol. 2010;7(3).
 80. Orgeur M, Brosch R. Evolution of virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 May 17];41:68–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527417300796>
 81. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio Y, García J, Morbidoni HR, De La M, et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. Virulence [Internet]. 2013 [cited 2019 May 17];4(1):3–66. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kvir20>

82. Broset E. Evolutionary Landscape of the Mycobacterium tuberculosis Complex from the Viewpoint of PhoPR : Implications for Virulence Regulation EVOLVED TO CAUSE TUBERCULOSIS IN HUMANS AND. *MBio*. 2015;6(5):1–10.
83. Gottesman S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* [Internet]. 2005 Jul [cited 2019 May 17];21(7):399–404. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952505001381>
84. Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2019 May 17];21(11):1353–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545468>
85. Arnvig KB, Cortes T, Young DB. Noncoding RNA in Mycobacteria. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014 Apr 18 [cited 2019 May 17];2(2). Available from: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.MGM2-0029-2013>
86. Bobrovskyy M, Vanderpool CK. The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 17];4:61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24847473>
87. Vogel J. A rough guide to the non-coding RNA world of Salmonella. *Mol Microbiol* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 May 17];71(1):1–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2008.06505.x>
88. Melamed S, Peer A, Faigenbaum-Romm R, Gatt YE, Reiss N, Bar A, et al. Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. *Mol Cell* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 17];63(5):884–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27588604>
89. Melior H, Li S, Madhugiri R, Stötzel M, Stötzel S, Azarderakhsh S, et al. Transcription attenuation-derived small RNA rnTrpL regulates tryptophan biosynthesis gene expression in trans. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 [cited 2019 May 17];(1). Available from: <https://academic.oup.com/nar/advance-article-abstract/doi/10.1093/nar/gkz274/5471814>
90. Vanderpool CK, Balasubramanian D, Lloyd CR. Dual-function RNA regulators in bacteria. *Biochimie* [Internet]. 2011 Nov [cited 2019 May 17];93(11):1943–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816203>
91. Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. [cited 2019 May 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176440/pdf/nihms321937.pdf>
92. Morita T, Aiba H. Mechanism and physiological significance of autoregulation of the *Escherichia coli* hfq gene. *RNA* [Internet]. 2019 [cited 2019 May 17];25(2):264–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30487269>
93. Woodson SA, Panja S, Santiago-Frangos A. Proteins That Chaperone RNA Regulation. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2018 [cited 2019 May 17];6(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30051798>

94. Updegrove TB, Zhang A, Storz G. Hfq: the flexible RNA matchmaker. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2016 Apr [cited 2019 May 17];30:133–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527416300030>
95. Večerek B, Moll I, Afonyushkin T, Kaberdin V, Bläsi U. Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2003 Sep 12 [cited 2019 May 17];50(3):897–909. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03727.x>
96. Santiago-Frangos A, Woodson SA. Hfq chaperone brings speed dating to bacterial sRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* [Internet]. 2018 Jul [cited 2019 May 17];9(4):e1475. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/wrna.1475>
97. Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG. Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA [Internet]. [cited 2019 May 17]. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
98. De Lay N, Schu DJ, Gottesman S. Bacterial Small RNA-based Negative Regulation: Hfq and Its Accomplices. 2013 [cited 2019 May 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3605619/pdf/zbc7996.pdf>
99. Arnvig KB, Young DB. Identification-of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. 2009 [cited 2019 May 17]; Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/>
100. Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* [Internet]. 2009 [cited 2019 May 18];136(4):615–28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3132550/pdf/nihms302082.pdf>
101. Kosfeld A, Jahreis K, Kosfeld A, Jahreis K. Characterization of the Interaction Between the Small Regulatory Peptide SgrT and the EIICBGlc of the Glucose-Phosphotransferase System of *E. coli* K-12. *Metabolites* [Internet]. 2012 Oct 16 [cited 2019 May 18];2(4):756–74. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-1989/2/4/756>
102. Negrete A, Ng W-I, Shiloach J. Glucose uptake regulation in *E. coli* by the small RNA SgrS: comparative analysis of *E. coli* K-12 (JM109 and MG1655) and *E. coli* B (BL21) [Internet]. 2010 [cited 2019 May 18]. Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/75>
103. Papenfort K, Sun Y, Miyakoshi M, Vanderpool CK, Vogel J. Regulation of glucose homeostasis by small RNA mediated activation of sugar phosphatase mRNA. 2013 [cited 2019 May 18]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4151517/pdf/nihms618547.pdf>
104. Bloch S, Węgrzyn A, Węgrzyn G, Zena B, Nczyk N-F. Small and Smaller-sRNAs and MicroRNAs in the Regulation of Toxin Gene Expression in Prokaryotic Cells: A Mini-Review. 2017 [cited 2019 May 18]; Available from: www.mdpi.com/journal/toxins
105. Arnvig KB, Young DB. Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2018 Apr 16];73(3):397–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19555452>

106. Fröhlich KS, Vogel J. Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2019 May 18];12(6):674–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136952740900143X>
107. Maria Belén Mestre, Claudio M. Fader CS& MIC. α -hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells. *Autophagy* [Internet]. 2010 [cited 2019 May 18]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kaup20>
108. Camussone CM, Calvino LF. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos [Internet]. Vol. 45, *Rev Argent Microbiol*. 2013 [cited 2019 May 18]. Available from: www.elsevier.es/ram
109. Babitzke P, Romeo T. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2019 May 18];10(2):156–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527407000240>
110. Timmermans J, Van Melderen L. Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 Sep 6 [cited 2019 May 18];67(17):2897–908. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0381-z>
111. Sonnleitner E, Romeo A, Bläsi U. Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA Biol* [Internet]. 2012 [cited 2019 May 18];9(4):364–71. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=krgb20>
112. Pellin D, Miotto P, Cirillo AA, Serio D Di. A Genome-Wide Identification Analysis of Small Regulatory RNAs in *Mycobacterium tuberculosis* by RNA-Seq and Conservation Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2019 May 18];7(3):32723. Available from: www.plosone.org
113. DiChiara JM, Contreras-Martinez LM, Livny J, Smith D, McDonough KA, Belfort M. Multiple small RNAs identified in *Mycobacterium bovis* BCG are also expressed in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(12):4067–78.
114. Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M. Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development? [cited 2019 May 18]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3034451/pdf/nihms268051.pdf>
115. Bhuwan M, Arora N, Sharma A, Khubaib M, Pandey S, Kumar Chaudhuri T, et al. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Factor RipA with Chaperone MoxR1 Is Required for Transport through the TAT Secretion System. 2016 [cited 2019 May 18]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4810496/pdf/mBio.02259-15.pdf>
116. Pelly S, Bishai WR, Lamichhane G. A screen for non-coding RNA in *Mycobacterium tuberculosis* reveals a cAMP-responsive RNA that is expressed during infection. *Gene* [Internet]. 2012;500(1):85–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.044>

117. Michaux C, Verneuil N, Hartke A, Giard J-C. Physiological roles of small RNA molecules. [cited 2019 May 18]; Available from: <http://mic.sgmjournals.org>
118. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 15 [cited 2019 May 19];9(1):1911. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-04252-2>
119. Waryah CB, Moses C, Arooj M, Blancafort P. Zinc Fingers, TALEs, and CRISPR Systems: A Comparison of Tools for Epigenome Editing. In 2018 [cited 2019 May 19]. p. 19–63. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7774-1_2
120. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovi M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell Rev* [Internet]. 2018 [cited 2019 May 19]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
121. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2011;45(1):273–97. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
122. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167–70.
123. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin E V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(10):6091–105.
124. Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2010;64:475–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20528693>
125. Klompe SE, Sternberg SH. Harnessing “‘A Billion Years of Experimentation’”: The Ongoing Exploration and Exploitation of CRISPR-Cas Immune Systems. [cited 2019 May 19]; Available from: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/>
126. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, et al. Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs that Function with the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs. *Mol Cell* [Internet]. 2012;45(3):292–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.023>
127. Mojica FJM, Garrett RA. Discovery and seminal developments in the CRISPR field. *CRISPR-Cas Systems: RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea*. 2013. 1–31 p.
128. Makarova KS, Zhang F, Koonin E V. Snapshot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell* [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.018>
129. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and Classification of the CRISPR–Cas Systems. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(6):467–77. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrmicro2577> <http://www.nature.com.myaccess.library.utoronto.ca/nrmicro/journal/v9/n6/abs/nrmicro2577.html> [http://www.nature.com/files/319/Makarova et al. - 2011 - Evolution and classification of the CRISPR?Cas sys.pdf](http://www.nature.com/files/319/Makarova%20et%20al.%20-%202011%20-%20Evolution%20and%20classification%20of%20the%20CRISPR%20Cas%20sys.pdf)

130. Marraffini LA. The CRISPR-Cas system of *Streptococcus pyogenes*: function and applications [Internet]. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016 [cited 2019 May 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077169>
131. Genscript. CRISPR Handbook. GenScript [Internet]. 2016;(October):1–32. Available from: <http://www.genscript.com/crispr-handbook.html>
132. Koonin E V, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2019 May 19];37:67–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28605718>
133. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* [Internet]. 2013;8(11):2281–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.143> <http://www.nature.com/nprot/journal/v8/n11/abs/nprot.2013.143.html#supplementary-information> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157548> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlere>
134. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K. CRISPR RNA maturation by trans -encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602–7.
135. Zhu X, Lv M-M, Liu J-W, Yu R-Q, Jiang J-H. DNAzyme activated protein-scaffolded CRISPR–Cas9 nanoassembly for genome editing. *Chem Commun* [Internet]. 2019 [cited 2019 May 19]; Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9CC03172C>
136. Gao J, Bergmann T, Zhang W, Schiwon M, Ehrke-Schulz E, Ehrhardt A. Viral Vector-Based Delivery of CRISPR/Cas9 and Donor DNA for Homology-Directed Repair in an In Vitro Model for Canine Hemophilia B. 2019 [cited 2019 May 19]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.12.008>.
137. Aird EJ, Lovendahl KN, St. Martin A, Harris RS, Gordon WR. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol* [Internet]. 2018 Dec 31 [cited 2019 May 19];1(1):54. Available from: <http://www.nature.com/articles/s42003-018-0054-2>
138. Mao C-Z, Zheng L, Zhou Y-M, Wu H-Y, Xia J-B, Liang C-Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient and precise targeted integration of donor DNA harboring double cleavage sites in *Xenopus tropicalis*. *FASEB J* [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 May 19];32(12):6495–509. Available from: <https://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.201800093>
139. Peters JM, Colavin A, Shi H, Czarny TL, Larson MH, Wong S, et al. A Comprehensive, CRISPR-based Functional Analysis of Essential Genes in Bacteria HHS Public Access. *Cell* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 19];165(6):1493–506. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4894308/pdf/nihms790471.pdf>
140. Lv L, Ren Y-L, Chen J-C, Wu Q, Chen G-Q. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB- co -4HB) biosynthesis. *Metab Eng* [Internet]. 2015 May [cited

- 2019 May 19];29:160–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717615000397>
141. Liang J, Guo L, Lin J, He Z, Cai F, Chen J. A novel process for obtaining pinosylvin using combinatorial bioengineering in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2016 Jun 27 [cited 2019 May 19];32(6):102. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-016-2062-z>
 142. Keun Kim S, Seong W, Hwan Han G, Lee D-H, Lee S-G. CRISPR interference-guided multiplex repression of endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19];16:188. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5670510/pdf/12934_2017_Article_802.pdf
 143. Wu J, Zhou P, Zhang X, Dong M. Efficient de novo synthesis of resveratrol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017 Jul 21 [cited 2019 May 19];44(7):1083–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-017-1937-9>
 144. Wang Y, Zhang Z-T, Seo S-O, Lynn P, Lu T, Jin Y-S, et al. Gene transcription repression in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR-dCas9. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 May 19];113(12):2739–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.26020>
 145. Choudhary E, Thakur P, Pareek M, Agarwal N. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6:6267. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25711368>
 146. Singh AK, Carette X, Potluri L-P, Sharp JD, Xu R, Pristic S, et al. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 19];44(18). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih>.
 147. Jeremy M. Rock, Forrest F. Hopkins, Alejandro Chavez, Marieme Diallo MRC, Elias R. Gerrick, Justin R. Pritchard1, George M. Church, Eric J. Rubin1 CMS, Dirk Schnappinger and Sarah M. Fortune. Programmable Transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2019 May 18]; Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016274>
 148. Girardin RC, Bai G, He J, Sui H, McDonough KA. AbmR (Rv1265) is a novel transcription factor of *Mycobacterium tuberculosis* that regulates host cell association and expression of the non-coding small RNA Mcr11. *Mol Microbiol*. 2018;110(5):811–30.
 149. Ignatov D V., Salina EG, Fursov M V., Skvortsov TA, Azhikina TL, Kaprelyants AS. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA. *BMC Genomics* [Internet]. 2015;16(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2197-6>
 150. Benjak A, Uplekar S, Zhang M, Piton J, Cole ST, Sala C. Genomic and transcriptomic analysis of the streptomycin-dependent *Mycobacterium tuberculosis*

- strain 18b. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 Mar 5 [cited 2019 Jun 12];17(1):190. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944551>
151. Kim Y, Choi Y, Jeon BY, Jin H, Cho SN, Lee H. A simple and efficient multiplex PCR assay for the identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex to the species level. *Yonsei Med J*. 2013;54(5):1220–6.
 152. Quiagen. RNeasy Plus Mini Kit Protocol. 2016;(January):3–4.
 153. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* [Internet]. 2008;3(6):1101–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601>
 154. Degiacomi G, Benjak A, Madacki J, Boldrin F, Provvedi R, Palù G, et al. Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing on *Mycobacterium tuberculosis* gene expression. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 12];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5327466/>
 155. Illumina. Quality Scores for Next-Generation Sequencing [Internet]. 2011 [cited 2019 May 19]. Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/
 156. Hatzios SK, Baer CE, Rustad TR, Siegrist MS, Pang JM, Ortega C, et al. Osmosensory signaling in *Mycobacterium tuberculosis* mediated by a eukaryotic-like Ser/Thr protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Dec 24 [cited 2019 May 19];110(52):E5069-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309377>
 157. Salina EG, Waddell SJ, Hoffmann N, Rosenkrands I, Butcher PD, Kaprelyants AS. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. *Open Biol* [Internet]. 2014 Oct [cited 2019 May 19];4(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25320096>
 158. Provvedi R, Boldrin F, Falciani F, Palù G, Manganelli R. Global transcriptional response to vancomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 2009;155(4):1093–102.
 159. Ribeiro da Cunha BR da, Fonseca LP, Calado CRC, Ribeiro da Cunha B, Fonseca LP, Calado CRC. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics* [Internet]. 2019 Apr 24 [cited 2019 Jun 13];8(2):45. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/2/45>
 160. Geiman DE, Kaushal D, Ko C, Tyagi S, Manabe YC, Schroeder BG, et al. Attenuation of late-stage disease in mice infected by the *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the SigF alternate sigma factor and identification of SigF-dependent genes by microarray analysis. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Mar [cited 2019 Jun 13];72(3):1733–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977982>
 161. Owens RM, Hsu FF, VanderVen BC, Purdy GE, Hestean E, Giannakas P, et al. *M. tuberculosis* Rv2252 encodes a diacylglycerol kinase involved in the biosynthesis of phosphatidylinositol mannosides (PIMs). *Mol Microbiol* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2019 May 19];60(5):1152–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05174.x>

162. Arora G, Chaudhary D, Kidwai S, Sharma D, Singh R. CitE Enzymes Are Essential for Mycobacterium tuberculosis to Establish Infection in Macrophages and Guinea Pigs. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 6 [cited 2019 May 19];8:385. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00385/full>
163. Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: Implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet*. 2009 Dec;5(12).
164. Zaychikova M V., Zakharevich N V., Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic polymorphisms and functional properties and the possibility of their use for genotyping. *PLoS One*. 2015 Dec 1;10(12).
165. Gupta A, Venkataraman B, Vasudevan M, Gopinath Bankar K. Co-expression network analysis of toxin-antitoxin loci in Mycobacterium tuberculosis reveals key modulators of cellular stress OPEN Correction: Publisher Correction. Available from: www.nature.com/scientificreports/
166. Rivera-Marrero CA, Ritzenthaler JD, Newburn SA, Roman J, Cummings RD. Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in Mycobacterium tuberculosis [Internet]. Vol. 148. 2019 [cited 2019 May 19]. Available from: www.microbiologyresearch.org
167. Ligon LS, Hayden JD, Braunstein M. The Ins and Outs of Mycobacterium tuberculosis Protein Export. *Tuberculosis (Edinb)* [Internet]. 2012 Mar [cited 2019 May 19];92(2):121. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192870>
168. Nambi S, Long JE, Mishra BB, Baker R, Murphy KC, Olive AJ, et al. The Oxidative Stress Network of Mycobacterium tuberculosis Reveals Coordination between Radical Detoxification Systems. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2015 Jun 10 [cited 2019 May 19];17(6):829–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26067605>
169. Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, R. Jacobs W. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* [Internet]. 2003 Apr 4 [cited 2019 May 19];48(2):453–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03438.x>
170. Ditse Z, Lamers MH, Warner DF. DNA Replication in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19];5(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28361736>
171. China A, Mishra S, Nagaraja V. A transcript cleavage factor of Mycobacterium tuberculosis important for its survival. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2019 May 19];6(7):e21941. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760927>
172. Smith LJ, Stapleton MR, Fullstone GJM, Crack JC, Thomson AJ, Le Brun NE, et al. Mycobacterium tuberculosis WhiB1 is an essential DNA-binding protein with a nitric oxide sensitive iron-sulphur cluster Europe PMC Funders Group. 2010 [cited 2019 May 19];432(3):417–27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2992795/pdf/ukmss-32974.pdf>

173. Stapleton MR, Smith LJ, Hunt DM, Buxton RS, Green J. Mycobacterium tuberculosis WhiB1 represses transcription of the essential chaperonin GroEL2. *Tuberculosis (Edinb)* [Internet]. 2012 Jul [cited 2019 May 19];92(4):328–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22464736>
174. Raju RM, Unnikrishnan M, Rubin DHF, Krishnamoorthy V, Kandror O, Akopian TN, et al. Mycobacterium tuberculosis ClpP1 and ClpP2 Function Together in Protein Degradation and Are Required for Viability in vitro and During Infection. Ehrt S, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 Feb 16 [cited 2019 May 19];8(2):e1002511. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002511>
175. Slayden RA, Dawson CC, Cummings JE. Toxin–antitoxin systems and regulatory mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Pathog Dis* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 May 19];76(4). Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article/doi/10.1093/femspd/fty039/4969681>
176. Gupta A. Killing activity and rescue function of genome-wide toxin–antitoxin loci of Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 May 19];290(1):45–53. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2008.01400.x>
177. Gaudion A, Dawson L, Davis E, Smollett K. Characterisation of the Mycobacterium tuberculosis alternative sigma factor SigG: its operon and regulon. *Tuberculosis (Edinb)* [Internet]. 2013 Sep [cited 2019 May 19];93(5):482–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23871545>
178. Hatzios SK, Bertozzi CR. The Regulation of Sulfur Metabolism in Mycobacterium tuberculosis. Manchester M, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Jul 21 [cited 2019 May 19];7(7):e1002036. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002036>
179. Paritala H, Carroll KS. New targets and inhibitors of mycobacterial sulfur metabolism. *Infect Disord Drug Targets* [Internet]. 2013 Apr [cited 2019 May 19];13(2):85–115. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23808874>
180. Bai G, McCue LA, McDonough KA. Characterization of Mycobacterium tuberculosis Rv3676 (CRPMt), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *J Bacteriol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2019 May 19];187(22):7795–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267303>
181. Shenoy AR, Sreenath N, Podobnik M, Kovačević M, Visweswariah SS. The Rv0805 gene from Mycobacterium tuberculosis encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. *Biochemistry* [Internet]. 2005 Dec 6 [cited 2019 May 19];44(48):15695–704. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313172>
182. da Silva PEA, Von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 May 19];63(1):1–9. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x>

183. Instituto Nacional de Salud (Colombia) O, Realpe T, Barletta RG, Robledo J. Inactivación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* y su potencial utilidad en la prevención y el control de la tuberculosis [Internet]. Vol. 24, Biomédica. Instituto Nacional de Salud; 2004 [cited 2019 May 19]. 165–187 p. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572004000500022
184. Domenech P, Reed MB. Rapid and spontaneous loss of phthiocerol dimycocerosate (PDIM) from *Mycobacterium tuberculosis* grown in vitro: implications for virulence studies. [cited 2019 May 19]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154741/pdf/nihms770.pdf>
185. Fikret ŞAHİN MK. The Roles of Efflux Systems in Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis*. Turkish J Mol Biol Biotechnol [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19]; Available from: www.tjmabb.org
186. Gómez-Tangarife VJ, Gómez-Restrepo AJ, Robledo-Restrepo J, Hernández-Sarmiento JM, Bacterióloga V., Clínico LMS. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: contribution of constituent and acquired mechanisms Revisión / Review. Rev Salud Pública [Internet]. 2018 [cited 2019 May 19];20(4):491–7. Available from: <https://doi.org/10.15446/rsap.V20n4.50575>
187. Collins DM, Kawakami RP, Buddle BM, Wards BJ, De Lisle GW. Different susceptibility of two animal species infected with isogenic mutants of *Mycobacterium bovis* identifies *phoT* as having roles in tuberculosis virulence and phosphate transport. [cited 2019 May 19]; Available from: <http://mic.sgmjournals.org>
188. Peirs P, Lefèvre P, Boarbi S, Wang X-M, Denis O, Braibant M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* with Disruption in Genes Encoding the Phosphate Binding Proteins PstS1 and PstS2 Is Deficient in Phosphate Uptake and Demonstrates Reduced In Vivo Virulence. Infect Immun [Internet]. 2005 [cited 2019 May 19];73(3):1898–902. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1064925/pdf/1087-04.pdf>
189. Namugenyi SB, Aagesen AM, Elliott SR, Tischler AD. *Mycobacterium tuberculosis* PhoY Proteins Promote Persister Formation by Mediating Pst/SenX3-RegX3 Phosphate Sensing. MBio [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19];8(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28698272>
190. Shi W, Zhang Y. PhoY2 but not PhoY1 is the PhoU homologue involved in persisters in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2010 Jun [cited 2019 May 19];65(6):1237–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360062>
191. Shi L, Sohaskey CD, Pfeiffer C, Pfeiffer C, Datta P, Parks M, et al. Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. Mol Microbiol [Internet]. 2010 Dec [cited 2019 May 19];78(5):1199–215. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21091505>
192. Cumming BM, Rahman MA, Lamprecht DA, Rohde KH, Saini V, Adamson JH, et al. *Mycobacterium tuberculosis* arrests host cycle at the G1/S transition to establish

- long term infection. PLoS Pathog [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19];13(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456404/>
193. McCann JR, McDonough JA, Sullivan JT, Felcher ME, Braunstein M. Genome-wide identification of Mycobacterium tuberculosis exported proteins with roles in intracellular growth. J Bacteriol [Internet]. 2011 Feb [cited 2019 May 19];193(4):854–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148733>
194. Kana BD, Weinstein EA, Avarbock D, Dawes SS, Rubin H, Mizrahi V. Characterization of the cydAB-Encoded Cytochrome bd Oxidase from Mycobacterium smegmatis. J Bacteriol [Internet]. 2001 [cited 2019 May 19];183(24):7076–86. Available from: <http://www.tigr.org>
195. Banerjee S, Nandyala A, Podili R, Katoch VM, Hasnain SE. Comparison of Mycobacterium tuberculosis isocitrate dehydrogenases (ICD-1 and ICD-2) reveals differences in coenzyme affinity, oligomeric state, pH tolerance and phylogenetic affiliation. BMC Biochem [Internet]. 2005 Sep 29 [cited 2019 May 19];6:20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16194279>
196. Salina EG, Mollenkopf HJ, Kaufmann SHE, Kaprelyants AS. M. tuberculosis Gene Expression during Transition to the “Non-Culturable” State. Acta Naturae [Internet]. 2009 [cited 2019 May 19];1(2):73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347514/>
197. Kumar P, Schelle MW, Jain M, Lin FL, Petzold CJ, Leavell MD, et al. PapA1 and PapA2 are acyltransferases essential for the biosynthesis of the Mycobacterium tuberculosis virulence factor Sulfolipid-1. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2007 Jul 3 [cited 2019 May 19];104(27):11221–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592143>
198. Hatzios SK, Schelle MW, Holsclaw CM, Behrens CR, Botyanszki Z, Lin FL, et al. PapA3 is an acyltransferase required for polyacyltrehalose biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem [Internet]. 2009 May 8 [cited 2019 May 19];284(19):12745–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19276083>
199. Touchette MH, Holsclaw CM, Previti ML, Solomon VC, Leary JA, Bertozzi CR, et al. The rv1184c locus encodes Chp2, an acyltransferase in Mycobacterium tuberculosis polyacyltrehalose lipid biosynthesis. J Bacteriol [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2019 May 19];197(1):201–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25331437>
200. Rombouts Y, Alibaud L, Carrère-Kremer S, Maes E, Tokarski C, Ellass E, et al. Fatty Acyl Chains of Mycobacterium marinum Lipooligosaccharides. J Biol Chem [Internet]. 2011 Sep 23 [cited 2019 May 19];286(38):33678–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803773>
201. Crellin PK, Luo C-Y, Morita YS. Metabolism of Plasma Membrane Lipids in Mycobacteria and Corynebacteria. 2013 [cited 2019 May 19]; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/52781>
202. Alexander DC, Jones JRW, Tan T, Chen JM, Liu J. PimF, a Mannosyltransferase of Mycobacteria, Is Involved in the Biosynthesis of Phosphatidylinositol Mannosides

- and Lipoarabinomannan. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Apr 30 [cited 2019 May 19];279(18):18824–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960574>
203. Kaur D, Obregón-Henao A, Pham H, Chatterjee D, Brennan PJ, Jackson M. Lipoarabinomannan of Mycobacterium: mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Nov 18 [cited 2019 May 19];105(46):17973–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004785>
204. Movahedzadeh F, Smith DA, Norman RA, Dinadayala P, Murray-Rust J, Russell DG, et al. The Mycobacterium tuberculosis *ino1* gene is essential for growth and virulence. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2019 May 19];51(4):1003–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03900.x>
205. Bachhawat N, Mande SC. Identification of the *INO1* gene of Mycobacterium tuberculosis H37Rv reveals a novel class of inositol-1-phosphate synthase enzyme. *J Mol Biol* [Internet]. 1999 Aug 20 [cited 2019 May 19];291(3):531–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699929807?via%3Dihub>
206. Movahedzadeh F, Wheeler PR, Dinadayala P, Av-Gay Y, Parish T, Daffé M, et al. Inositol monophosphate phosphatase genes of Mycobacterium tuberculosis [Internet]. 2010 [cited 2019 May 19]. Available from: <http://www.expasy.ch/prosite/>,
207. Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, et al. Phospholipases C are involved in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 Jul 1 [cited 2019 May 19];45(1):203–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2002.03009.x>
208. Assis PA, Espíndola MS, Paula-Silva FWG, Rios WM, Pereira PAT, Leão SC, et al. Mycobacterium tuberculosis expressing phospholipase C subverts PGE2 synthesis and induces necrosis in alveolar macrophages. *BMC Microbiol* [Internet]. 2014 May 19 [cited 2019 May 19];14:128. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886263>
209. Giffin MM, Modesti L, Raab RW, Wayne LG, Sohaskey CD. *ald* of Mycobacterium tuberculosis encodes both the alanine dehydrogenase and the putative glycine dehydrogenase. *J Bacteriol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2019 May 19];194(5):1045–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210765>
210. Isaza JP, Duque C, Gomez V, Robledo J, Barrera LF, Alzate JF. Whole genome shotgun sequencing of one Colombian clinical isolate of Mycobacterium tuberculosis reveals *DosR* regulon gene deletions. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2012 May [cited 2019 Jun 17];330(2):113–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404577>
211. Santhi D, Raja A. T cell recall response of two hypothetical proteins (Rv2251 and Rv2721c) from Mycobacterium tuberculosis in healthy household contacts of TB –

- Possible subunit vaccine candidates. *J Infect* [Internet]. 2016;73(5):455–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.06.012>
212. DeJesus MA, Gerrick ER, Xu W, Park SW, Long JE, Boutte CC, et al. Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. *MBio*. 2017;8(1):1–17.
 213. Sabharwal D, Song T, Papenfort K, Wai SN. The VrrA sRNA controls a stationary phase survival factor Vrp of *Vibrio cholerae*. [cited 2019 May 19]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2015.1017211>
 214. Williams EP, Lee J-H, Bishai WR, Colantuoni C, Karakousis PC. *Mycobacterium tuberculosis* SigF regulates genes encoding cell wall-associated proteins and directly regulates the transcriptional regulatory gene *phoY1*. *J Bacteriol* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2019 May 19];189(11):4234–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384187>
 215. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2012;10(2):123–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2677>
 216. Wood JM. Bacterial responses to osmotic challenges. *J Gen Physiol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2019 Jun 12];145(5):381–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25870209>
 217. Jovanovich SB, Martinell M, Record MT, Burgess RR. Rapid Response to Osmotic Upshift by Osmoregulated Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* [Internet]. Vol. 170, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1988 [cited 2019 May 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC210686/pdf/jbacter00180-0058.pdf>
 218. Larrouy-Maumus G, Marino LB, Madduri AVR, Ragan TJ, Hunt DM, Bassano L, et al. Cell-envelope remodeling as a determinant of phenotypic antibacterial tolerance in *mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect Dis*. 2016;2(5):352–60.
 219. Romantsov T, Guan Z, Wood JM. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Jun 13];1788(10):2092–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19539601>
 220. Sleator R. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2001;25(5):0. Available from: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445\(01\)00071-7](http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445(01)00071-7)
 221. Freeman BC, Chen C, Yu X, Nielsen L, Peterson K, Beattie GA. Physiological and transcriptional responses to osmotic stress of two *Pseudomonas syringae* strains that differ in epiphytic fitness and osmotolerance. *J Bacteriol* [Internet]. 2013 Oct 15 [cited 2019 May 19];195(20):4742–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955010>
 222. Yaakop AS, Chan K-G, Ee R, Lim YL, Lee S-K, Manan FA, et al. Characterization of the mechanism of prolonged adaptation to osmotic stress of *Jeotgalibacillus malaysiensis* via genome and transcriptome sequencing analyses. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Sep 19 [cited 2019 May 19];6(1):33660. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep33660>

- 223.Bojanovič K, D'Arrigo I, Long KS. Global Transcriptional Responses to Osmotic, Oxidative, and Imipenem Stress Conditions in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2019 May 19];83(7):e03236-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28130298>
- 224.Gunasekera TS, Csonka LN, Paliy O. Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. *J Bacteriol* [Internet]. 2008 May [cited 2019 May 19];190(10):3712–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18359805>
- 225.Weber A, Jung K. Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays. *J Bacteriol* [Internet]. 2002 Oct [cited 2019 May 19];184(19):5502–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218039>
- 226.Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE Two-Component System: Integrating K⁺ Homeostasis and Virulence. *PLoS Pathog*. 2013;9(3).
- 227.Kraegeloh A, Kunte H. Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2019 May 19];6(6):453–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-002-0277-4>
- 228.Wood JM. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1999 Mar [cited 2019 May 19];63(1):230–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066837>
- 229.Steyn AJC, Joseph J, Bloom BR. Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. *Mol Microbiol* [Internet]. 2003 Feb 5 [cited 2019 May 19];47(4):1075–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03356.x>
- 230.Kitko RD, Wilks JC, Garduque GM, Slonczewski JL. Osmolytes Contribute to pH Homeostasis of *Escherichia coli*. Bereswill S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2010 Apr 8 [cited 2019 May 19];5(4):e10078. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010078>
- 231.Castaneda-Garcia A, Do TT, Blazquez J. The K⁺ uptake regulator TrkA controls membrane potential, pH homeostasis and multidrug susceptibility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2019 May 19];66(7):1489–98. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkr165>
- 232.Zondervan N, van Dam J, Schaap P, Martins dos Santos V, Suarez-Diez M, Zondervan NA, et al. Regulation of Three Virulence Strategies of *Mycobacterium tuberculosis*: A Success Story. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Jan 24 [cited 2019 May 19];19(2):347. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/347>
- 233.Findeisen F, Linder JU, Schultz A, Schultz JE, Brügger B, Wieland F, et al. The Structure of the Regulatory Domain of the Adenylyl Cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* with Bound Oleic Acid. *J Mol Biol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 May 19];369(5):1282–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283607004792>

- 234.Linder JU, Schultz A, Schultz JE. Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 May 3 [cited 2019 May 19];277(18):15271–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839758>
- 235.Bai G, Knapp GS, McDonough KA. Cyclic AMP signalling in mycobacteria: redirecting the conversation with a common currency. *Cell Microbiol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2019 May 19];13(3):349–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199259>
- 236.Cavazos A, Prigozhin DM, Alber T. Structure of the sensor domain of *Mycobacterium tuberculosis* PknH receptor kinase reveals a conserved binding cleft. *J Mol Biol* [Internet]. 2012 Sep 28 [cited 2019 May 19];422(4):488–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22727744>
- 237.Alderwick LJ, Molle V, Kremer L, Cozzone AJ, Dafforn TR, Besra GS, et al. Molecular structure of EmbR, a response element of Ser/Thr kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Feb 21 [cited 2019 May 19];103(8):2558–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16477027>
- 238.Abebe M, Kim L, Rook G, Aseffa A, Wassie L, Zewdie M, et al. Modulation of cell death by *M. tuberculosis* as a strategy for pathogen survival. *Clin Dev Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2019 May 19];2011:678570. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21253484>
- 239.Amaral EP, Costa DL, Namasivayam S, Riteau N, Kamenyeva O, Mittereder L, et al. A major role for ferroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-induced cell death and tissue necrosis. *J Exp Med* [Internet]. 2019 Mar 4 [cited 2019 May 19];216(3):556–70. Available from: <http://jem.rupress.org/content/216/3/556>
- 240.Butler RE, Brodin P, Jang J, Jang M-S, Robertson BD, Gicquel B, et al. The Balance of Apoptotic and Necrotic Cell Death in *Mycobacterium tuberculosis* Infected Macrophages Is Not Dependent on Bacterial Virulence. Briken V, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Oct 30 [cited 2019 May 19];7(10):e47573. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0047573>
- 241.Srinivasan L, Ahlbrand S, Briken V. Interaction-of *Mycobacterium tuberculosis* with host cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2014 Jun 26 [cited 2019 May 19];4(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24968864>
- 242.Mohareer K, Asalla S, Banerjee S. Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2019 May 19];113:99–121. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979218301100?via%3Dihub>
- 243.Park JS, Tamayo MH, Gonzalez-Juarrero M, Orme IM, Ordway DJ. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2019 May 19];79(1):80–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0505250>

244. Sohn H, Lee K-S, Kim S-Y, Shin D-M, Shin S-J, Jo E-K, et al. Induction of Cell Death in Human Macrophages by a Highly Virulent Korean Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the Virulent Strain H37Rv. *Scand J Immunol* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 May 19];69(1):43–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2008.02188.x>
245. Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol* [Internet]. 2006 Mar 15 [cited 2019 May 19];176(6):3707–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517739>
246. Okkels LM, Andersen P. Protein-protein interactions of proteins from the ESAT-6 family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2019 May 19];186(8):2487–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060053>
247. Gey Van Pittius NC, Gamielien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, Beyers AD. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol* [Internet]. 2001 [cited 2019 May 19];2(10):RESEARCH0044. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597336>
248. Jamwal S V., Mehrotra P, Singh A, Siddiqui Z, Basu A, Rao KVS. Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Mar 16 [cited 2019 Jun 12];6:23089. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980157>
249. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* [Internet]. 2007 Jun 29 [cited 2019 Jun 12];129(7):1287–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407007829>
250. Zhai W, Wu F, Zhang Y, Fu Y, Liu Z. The Immune Escape Mechanisms of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jan 15 [cited 2019 Jun 12];20(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30650615>
251. Rindi L, Lari N, Garzelli C. Search for Genes Potentially Involved in *Mycobacterium tuberculosis* Virulence by mRNA Differential Display. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Apr 29 [cited 2019 May 19];258(1):94–101. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X99905910?via%3Dihub>
252. Jackson M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2014 Aug 7 [cited 2019 May 19];4(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104772>
253. Guerin ME, Korduláková J, Alzari PM, Brennan PJ, Jackson M. Molecular basis of phosphatidyl-myo-inositol mannoside biosynthesis and regulation in mycobacteria. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Oct 29 [cited 2019 May 19];285(44):33577–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801880>

254. Singh A, Crossman DK, Mai D, Guidry L, Voskuil MI, Renfrow MB, et al. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. PLoS Pathog [Internet]. 2009 Aug [cited 2019 May 19];5(8):e1000545. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680450>
255. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurucha SS, Kremer L, Chen B, et al. Deletion of kasB in Mycobacterium tuberculosis causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2007 Mar 20 [cited 2019 May 19];104(12):5157–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360388>
256. Yuan Y, Zhu Y, Crane DD, Barry CE. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol [Internet]. 1998 Sep [cited 2019 May 19];29(6):1449–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781881>
257. Barkan D, Rao V, Sukenick GD, Glickman MS. Redundant function of cmaA2 and mmaA2 in Mycobacterium tuberculosis cis cyclopropanation of oxygenated mycolates. J Bacteriol [Internet]. 2010 Jul [cited 2019 May 19];192(14):3661–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472794>
258. Barkan D, Hedhli D, Yan H-G, Huygen K, Glickman MS. Mycobacterium tuberculosis lacking all mycolic acid cyclopropanation is viable but highly attenuated and hyperinflammatory in mice. Infect Immun [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 May 19];80(6):1958–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431648>