



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

### **Estudio de la contribución de una mutación puntual en el gen *atpE* en la resistencia a Bedaquilina de *Mycobacterium abscessus***

**Leticia Fernández Rubio**

Directores:

Jesús A. Gonzalo Asensio

Juan Calvet Seral

Facultad de Ciencias

2019-2020

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
<i>Mycobacterium abscessus</i> y la enfermedad pulmonar.....	2
Tratamiento actual de la infección por <i>M. abscessus</i> . Resistencia a antimicrobianos .....	2
La Bedaquilina como nuevo fármaco contra <i>M. abscessus</i> .....	4
Herramientas de manipulación genéticas en <i>M. abscessus</i> .....	5
Relevancia/interés del tema tratado .....	5
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	6
<b>Materiales y métodos</b> .....	6
Técnicas de cultivo .....	6
Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivos.....	6
Preparación de células electrocompetentes de <i>M. abscessus</i> y células de <i>E. coli</i> termocompetentes, y posterior transformación .....	7
Técnicas bioinformáticas.....	7
Diseño de oligonucleótidos .....	7
Manipulación de ácidos nucleicos.....	8
Extracción de DNA total de <i>M. abscessus</i> .....	8
Aislamiento de DNA plasmídico .....	8
Cuantificación y visualización de ácidos nucleicos.....	9
Amplificación de DNA: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	9
Digestión de plásmido y de fragmentos de PCR.....	9
Extracción y purificación de plásmido digerido a partir de gel de agarosa.....	9
Purificación directa de productos de PCR .....	10
Reacción de ligación .....	10
Clonajes mediante técnicas independientes de enzimas de restricción y DNA ligasas .....	10
Ensayos con <i>M. abscessus</i> .....	11
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Bedaquilina y Kanamicina) en medio sólido y líquido .....	11
<b>Resultados</b> .....	11
Obtención de los materiales de partida.....	11
Clonaje del gen <i>atpE</i> D29A en el plásmido pMV361 .....	13
Ensayos de concentración mínima inhibitoria .....	17
Recombineering .....	19
<b>Discusión</b> .....	22

<b>Conclusiones</b> .....	23
<b>Conclusions</b> .....	23
<b>Bibliografía</b> .....	23

## Resumen

*Mycobacterium abscessus* se está convirtiendo en uno de los patógenos más preocupantes en hospitales y centros de fibrosis quística de todo el mundo. Se trata de una micobacteria no tuberculosa de crecimiento rápido causante de enfermedades respiratorias, más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos. La relevancia de esta micobacteria reside en su resistencia frente a los antituberculosos convencionales así como a la mayoría de antibióticos que se disponen actualmente para uso clínico y que, por tanto, dificulta el tratamiento de los pacientes que la presentan (Cortes, Nessar, & Singh, 2010).

La aprobación en 2012 de un medicamento para tratar la tuberculosis multirresistente denominado Bedaquilina y la comprobación de que también presenta actividad antimicrobiana contra *M. abscessus* supuso una alternativa en el tratamiento de las enfermedades causadas por este microorganismo (Mahajan, 2013). Sin embargo, la identificación de un aislado clínico que presenta una mutación en el gen diana de la Bedaquilina (*atpE*) que codifica la subunidad c de la ATP sintasa, puede ver comprometida la eficacia del medicamento.

En este trabajo, se pretende obtener una cepa de *M. abscessus* que presente un alelo del gen *atpE* con la mutación encontrada haciendo uso de técnicas de ingeniería genética y caracterizar su resistencia a Bedaquilina en comparación con la cepa silvestre. Para ello, se clonó el gen *atpE* con la mutación en un vector apropiado utilizando distintas técnicas de clonaje así como utilizando una técnica novedosa, el recombineering. Aunque no se pudo secuenciar, hay evidencias de que dicha mutación confiere resistencia a Bedaquilina.

Este trabajo proporciona una estrategia de caracterización de las cepas bacterianas a través de estudios genotípicos que permite optimizar cualquier régimen terapéutico para evitar tratamientos ineficaces al estudiar la resistencia a antimicrobianos y puede ser trasladada a otros microorganismos.

## Abstract

*Mycobacterium abscessus* is becoming one of the most worrisome pathogens in hospitals and cystic fibrosis centers around the world. It is a fast growing non-tuberculous mycobacteria that causes respiratory diseases, more frequent in immunocompromised patients. The relevance of this mycobacteria lies in its resistance to conventional anti-tuberculous drugs as well as to most of the antibiotics currently available for clinical use and, therefore, makes it difficult to treat patients who present it (Cortes et al., 2010).

The approval in 2012 of a drug to treat multidrug-resistant tuberculosis called Bedaquiline and the verification that it also has antimicrobial activity against *M. abscessus* provided an alternative in the treatment of diseases caused by this microorganism (Mahajan, 2013). However, the identification of a clinical isolate that has a mutation in the target gene for Bedaquiline (*atpE*), which encodes the ATP synthase subunit c, may compromise the efficacy of the drug.

In this study, it is intended to obtain a *M. abscessus* strain that presents an *atpE* gene allele with the mutation found using genetic engineering techniques and characterize its resistance to Bedaquiline in comparison with the wild-type strain. For that purpose, the *atpE* gene with the mutation was cloned in an appropriate vector using different cloning techniques as well as using a novel technique, recombineering. Using recombineering, there is evidence that this mutation confers resistance to Bedaquiline.

This study provides a strategy for the characterization of bacterial strains through genotypic studies that allows optimizing any therapeutic regimen to avoid ineffective treatments since antimicrobial resistance is studied and it can be use in other microorganisms.

## Introducción

### *Mycobacterium abscessus* y la enfermedad pulmonar

*Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus*) es un patógeno emergente, no tuberculoso y de rápido crecimiento, que tiene la capacidad de causar enfermedades pulmonares crónicas, además de ser una de las especies de micobacterias más resistentes a los fármacos (Cortes et al., 2010). Presente en el suelo y agua, *M. abscessus* suele causar enfermedades en poblaciones vulnerables, incluidos los pacientes inmunocomprometidos y las personas que sufren trastornos pulmonares (Dick, 2020). Las micobacterias no tuberculosas (MNT), entre las que se encuentra *M. abscessus*, han cobrado protagonismo en los últimos años, y en la actualidad representan entre el 30 y el 50% del total de micobacterias aisladas en los laboratorios de microbiología, lo que podría asociarse a un aumento de la incidencia de enfermedad por MNT (Martínez et al., 2017).

La enfermedad pulmonar causada por *M. abscessus* está asociada a pacientes con fibrosis quística (FQ) principalmente, bronquiectasia, bronquitis crónica, infecciones postquirúrgicas del tracto respiratorio, etc (Ramírez & Araque Marquina, 2017). Los pacientes con fibrosis quística presentan una mutación en el gen que codifica el canal clorhídrico transmembrana (CFTR) conduciendo al fallo del mismo y a la consiguiente retención de moco e inflamación de las vías aéreas; este efecto resulta perjudicial para los pulmones de los individuos (Guerra-morillo, Rabasco-álvarez, & González-rodríguez, 2020). En estas condiciones, el patógeno desarrolla en primer lugar un *biofilm*, colonizando al huésped y, más tarde, progresa hasta convertirse en una enfermedad invasiva. El proceso de la infección por *M. abscessus* en el pulmón de pacientes con fibrosis quística está todavía en investigación, pero un estudio reciente ha mostrado que los agregados de *M. abscessus* forman un *biofilm* alrededor de los alvéolos pulmonares (Degiacomi et al., 2019). La manifestación pulmonar de esta infección es una de las formas más difíciles de tratar, lo que provoca una morbilidad y mortalidad considerables (Vesenbeckh et al., 2017).

Desafortunadamente, no hay estrategias de tratamiento predecibles o verdaderamente efectivas para las infecciones pulmonares causadas por *M. abscessus*; son difíciles de tratar debido a las limitadas opciones terapéuticas, como ocurre con la tuberculosis multirresistente (Dupont et al., 2017).

### Tratamiento actual de la infección por *M. abscessus*. Resistencia a antimicrobianos

Generalmente, el tratamiento farmacológico es prolongado, costoso y con frecuencia los efectos adversos están relacionados con la toxicidad de los fármacos. En muchos casos, el fallo en la terapia antimicrobiana se debe a la elevada resistencia natural y adquirida que presenta esta micobacteria a los antituberculosos convencionales (Ramírez & Araque Marquina, 2017).

Hasta ahora, no se ha establecido un régimen antibiótico fiable para la enfermedad pulmonar que causa este patógeno (Li et al., 2020); no obstante, la Sociedad Torácica Americana (ATS) recomienda un tratamiento que consiste en una combinación de un macrólido (claritromicina o azitromicina), un aminoglucósido (amikacina) y un beta-lactámico (cefoxitina o imipenem) durante un periodo de un año. (Dupont et al., 2017).

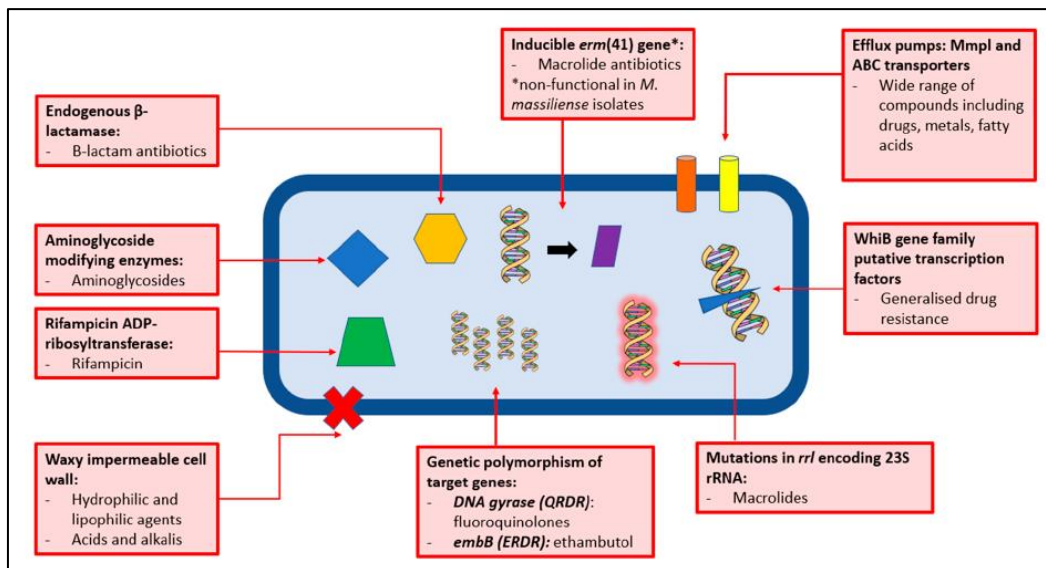
Por otro lado, aconseja la resección en aquellos pacientes que muestran una respuesta deficiente al tratamiento con medicamentos, aquellos que desarrollan resistencia a los macrólidos o si experimentan complicaciones relacionadas con la enfermedad, como la hemoptisis (Lopeman, Harrison, Desai, & Cox, 2019).

En Europa, la Sociedad Torácica Británica recomienda un régimen de antibióticos ligeramente distinto para tratar la enfermedad pulmonar provocada por *M. abscessus* dividido en dos fases: en la fase inicial, si el aislado de *M. abscessus* del paciente es sensible a claritromicina o demuestra una resistencia inducible a macrólidos, el régimen de antibióticos debe incluir por lo menos 4 semanas de tratamiento con amikacina, tigeciclina e imipenem intravenosos, y claritromicina o azitromicina orales. La duración de esta primera fase está condicionada por la gravedad de la infección, la respuesta al tratamiento y la tolerancia al régimen por parte del paciente. En este caso, el régimen de antibióticos de la fase de continuación debe incluir amikacina nebulizada y un macrólido, en combinación con de uno a tres de los siguientes antibióticos orales: clofazimina, linezolid, minociclina o doxicilina, moxifloxacina o ciprofloxacina y cotrimoxazol. En el caso de un aislado que presenta resistencia constitutiva a los macrólidos, en la fase inicial únicamente se administraran los antibióticos intravenosos, y en la fase de continuación, de dos a cuatro de los antibióticos orales vistos para el anterior caso (Hasworth et al., 2017).

Los bajos resultados que se obtienen del tratamiento de las enfermedades pulmonares causadas por este microorganismo son atribuidos a la resistencia a la claritromicina. El mecanismo que subyace a la resistencia a la claritromicina implica la alternancia en el sitio diana del fármaco, incluyendo mutaciones en el gen 23S rRNA y modificaciones en el rRNA por acción de una metiltransferasa (codificada por el gen *erm*). Puesto que el tratamiento es prolongado, al menos 12 meses, puede desarrollarse la resistencia a la claritromicina durante cualquier momento del tratamiento (Li et al., 2020).

En comparación con la mayoría del resto de patógenos, incluso las micobacterias de crecimiento rápido (i.e. *M. abscessus*) son de crecimiento lento. Esta propiedad crea dificultades de tratamiento por múltiples razones. Dado que muchos antibióticos actúan, al menos en parte, en la división de los patógenos, la replicación de células lentas significa que la actividad de los antibióticos es más lenta. Esta propiedad limita la eficacia de los  $\beta$ -lactámicos (BLs). Por otro lado, la pared celular de *M. abscessus* tiene un alto contenido en lípidos, creando una barrera difícil de penetrar para los antibióticos. Este hecho por sí solo es suficiente para conferir resistencia a muchos BLs y perjudica la susceptibilidad a los aminoglicósidos. Al tratarse de una bacteria que forma *biofilms*, éstos crean un entorno en el que pueden sobrevivir a pesar de tener una menor actividad metabólica, lo que las hace más resistentes no solo a los antibióticos que se dirigen a la división celular, sino también a los procesos de síntesis de proteínas y de ATP (Strnad & Winthrop, 2018).

Como componente de la pared celular de las micobacterias, las bombas de eflujo se describen como uno de los principales factores causantes de la resistencia a los fármacos en las micobacterias, actuando para proteger a las bacterias contra los compuestos tóxicos y promover la homeostasis bacteriana. *M. abscessus* también produce una serie de enzimas modificadoras como la rifampicina ADP-ribosil transferasa, aminoglicósido 2'-N-acetiltransferasa y aminoglicósido fosfotransferasas, que median la susceptibilidad a la rifampicina y a los aminoglicósidos. Por último, se ha demostrado que este microorganismo produce una beta-lactamasa endógena que hidroliza eficientemente el anillo de los antibióticos beta-lactámicos, haciéndolos ineficaces (Lopeman et al., 2019).



**Figura 1.** Resumen gráfico de los mecanismos de resistencia exhibidos por *M. abscessus*. Hay varios mecanismos que implican diferentes procesos fisiológicos, enzimáticos y genómicos que contribuyen al perfil notoriamente resistente a los fármacos de *M. abscessus*. Es probable que estos procesos, como las bombas de eflujo y los genes de resistencia a fármacos, trabajen en sinergia para producir un patógeno altamente resistente. *Fuente:* Lopeman et al., 2019. *Mycobacterium abscessus*: Environmental bacterium turns clinical nightmare.

### La Bedaquilina como nuevo fármaco contra *M. abscessus*

La tuberculosis (TB) es una de las diez causas principales de muerte en el mundo. En 2018 enfermaron de TB 10 millones de personas, de las cuales 1,5 millones fallecieron a causa de la enfermedad; se estima que alrededor de una cuarta parte de la población mundial está infectada y, entre el 5 y el 10% de los infectados desarrollan la enfermedad activa de la tuberculosis a lo largo de su vida (WHO, 2020). Aunque los medicamentos antituberculosos de primera línea pueden alcanzar una eficacia superior al 99%, ésta suele reducirse debido a la resistencia a los antimicrobianos por parte de *M. tuberculosis* (Andries et al., 2005). El 28 de diciembre de 2012, la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos concedió la aprobación acelerada del medicamento denominado Bedaquilina, de la compañía farmacéutica Janssen, de Johnson & Johnson, para tratar la tuberculosis multirresistente (Mahajan, 2013). Se ha observado que este fármaco también presenta actividad antimicrobiana contra varias especies de micobacterias no tuberculosis, entre las cuales se encuentra *M. abscessus*; no obstante, no se recomienda administrarlo como monoterapia (Brown-Elliott & Wallace, 2019). Teniendo en cuenta la creciente incidencia de infecciones por *M. abscessus*, así como la frecuente resistencia a múltiples fármacos con el consiguiente fracaso del tratamiento, la Bedaquilina es una potencial alternativa en el tratamiento de este tipo de enfermedades (Vesenbeckh et al., 2017).

La Bedaquilina (TMC207 o R207910) se clasifica dentro de la familia de las diarilquinolinas y se encuentra en la Lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud, los medicamentos más efectivos y seguros que se necesitan en un sistema de salud (WHO, 2015). La actividad anti-micobacteriana específica de la Bedaquilina deriva de la inhibición de la ATP sintasa, una enzima crítica en la síntesis de ATP en las micobacterias y conduce a la muerte de la bacteria. En concreto, bloquea la ATP sintasa interactuando a nivel de una hendidura de la subunidad c centrada en el residuo Glu62. El gen que codifica la subunidad c se denomina *atpE*, cuya secuencia codificante tiene 252 pb en *M. abscessus*, y su secuencia de aminoácidos se encuentra conservada en gran medida en las especies del género *Mycobacterium* (Mahajan, 2013).

A pesar de ello, a día de hoy, se pueden encontrar cepas resistentes a Bedaquilina (Segala, Sougakoff, Nevejans-Chauffour, Jarlier, & Petrella, 2012).

### Herramientas de manipulación genéticas en *M. abscessus*

En el estudio de la contribución de las mutaciones en la resistencia a antibióticos y, en concreto, en micobacterias, se encuentra el uso de plásmidos integrativos, como pMV361. Este vector con capacidad de integración se construyó reemplazando el oriM de pMV261 por un segmento de DNA que lleva el sitio *attP* y el gen de la integrasa (*int*) del micobacteriófago L5. El cassette de expresión contiene la región 5'-UTR del gen que codifica para la proteína de choque térmico *hsp60*, incluyendo los 6 primeros aminoácidos de la misma (Stover et al., 1991). En este vector se puede clonar el gen de interés a continuación de los 6 primeros aminoácidos de la proteína *hsp60* y transformar las micobacterias con él de manera que tendrá lugar una integración específica en el sitio *attB* del cromosoma bacteriano.

Actualmente, el desarrollo de la tecnología *in vivo* que permite introducir cambios genéticos en genomas bacterianos denominada *recombineering* involucra la expresión condicional de las recombinasas de fagos para promover la integración eficiente de una construcción de DNA mediante recombinación homóloga en el cromosoma bacteriano (Medjahed & Reyrat, 2009). Se describió por primera vez para *E. coli*, pero actualmente existen sistemas para otras bacterias como son las que pertenecen al género *Mycobacterium*. En este caso, las cepas en las que se quiere llevar a cabo la recombinación tienen que contener un plásmido extracromosómico (pJV53) en el que los genes que codifican las recombinasas del fago Che9c están bajo el control del promotor inducible de acetamida. Para la recombinación de dsDNA son necesarias una exonucleasa (*gp60*) y su recombinasa (*gp61*), mientras que para ssDNA, únicamente es necesaria la recombinasa. Los sustratos de DNA lineales tienen que presentar regiones de homología *up* y *downstream* del gen diana que flanquea un cassette de resistencia a antibióticos (Marinelli, Hatfull, & Piuri, 2012).

### Relevancia/interés del tema tratado

La aparición y propagación de las infecciones causadas por bacterias que son resistentes al tratamiento con antibióticos constituyen una de las amenazas más graves a las que se enfrenta la salud pública. Alrededor de 3.000 personas mueren cada año en España como consecuencia de infecciones hospitalarias causadas por bacterias resistentes y, si no se toman medidas de carácter urgente, se estima que en 35 años la resistencia podría desbancar al cáncer como primera causa de muerte (AEMPS, 2019). En los últimos años, ha habido un gran avance en cuanto a la secuenciación de genomas que está permitiendo una mejor comprensión de los organismos y, centrándonos en el problema de la resistencia a antibióticos, está permitiendo identificar las mutaciones que se generan en los microorganismos cuando son expuestos a un antimicrobiano, los cuales evolucionan para volverse resistentes y transmiten esa resistencia a su descendencia agravando el problema. Dada la situación actual de la reducida inversión de las compañías farmacéuticas en la búsqueda de nuevos antibióticos, cada vez es más complicado el tratamiento de pacientes que presentan una infección por bacterias multirresistentes. Por ello, antes de prescribir cualquier tratamiento, es necesaria una caracterización de la cepa bacteriana a través de estudios tanto fenotípicos como genotípicos que permitan individualizar y optimizar al máximo cualquier régimen terapéutico, para evitar tratamientos ineficaces que promuevan la resistencia a los antibióticos.



Conocer cuál es la concentración mínima inhibitoria es importante en diagnóstico puesto que nos permite confirmar la resistencia de un microorganismo a un agente antimicrobiano y determinar así tanto la concentración de antimicrobiano que el paciente recibirá como el tipo de antimicrobiano a utilizar, lo que a su vez ayuda a reducir la oportunidad de resistencia microbiana a agentes antimicrobianos específicos. En este trabajo, se pretende estudiar la contribución de una mutación a la resistencia a Bedaquilina en *Mycobacterium abscessus*, un microorganismo complejo y multiresistente cuya incidencia de infecciones parece aumentar con el tiempo y ya se han informado brotes del mismo en hospitales y entornos clínicos de todo el mundo. Para ello, se va a desarrollar un método rápido y fiable para caracterizar nuevos mutantes o mutaciones implicadas. Un mejor conocimiento de las resistencias a antimicrobianos puede mejorar el tratamiento de infecciones bacterianas y, con ello, la calidad de vida de los pacientes.

## Hipótesis y objetivos

La identificación de una cepa clínica de *M. abscessus* resistente a Bedaquilina y su posterior secuenciación, reveló una mutación puntual en el gen *atpE* produciendo un cambio de aminoácido. El codón que se ve alterado es el que se encuentra en posición 29, provocando un cambio de GAC por GCC y, en consecuencia, la sustitución del aminoácido aspártico (Asp, D) por alanina (Ala, A). Es necesario verificar esta mutación puntual para poder relacionar el genotipo con el fenotipo. Por tanto, puesto que la cepa de referencia de *M. abscessus* ATCC 19977 es sensible a Bedaquilina, la introducción de un alelo del gen *atpE* con dicha mutación conferiría resistencia a Bedaquilina.

Con todo lo anterior, los objetivos de este proyecto son los siguientes:

1. Clonaje del gen *atpE* D29A en un vector apropiado para *M. abscessus*.
2. Obtención de cepas de *M. abscessus* con el vector construido en el objetivo anterior y selección de microorganismos recombinantes.
3. Caracterización de la resistencia a Bedaquilina en las cepas de *M. abscessus* con el gen *atpE* D29A en comparación con la cepa silvestre.
4. Diseño de una estrategia de sustitución del gen *atpE* WT por la variante D29A en el cromosoma de *M. abscessus*.

## Materiales y métodos

### Técnicas de cultivo

#### Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivos

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* Stellar se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (10g/L Triptona, 5g/L de extracto de levadura, 5g/L de NaCl); o en medio sólido de LB-agar (17g/L agar) a 37°C. Para la selección con antibiótico se suplementaron con Kanamicina (Km) (20 $\mu$ g/mL).

Las cepas de *Mycobacterium abscessus* ATCC19977 y D29A se cultivaron en medio líquido Middlebrook 7H9 con 0,05% Tween-80 suplementado con ADC (0,5% albúmina sérica bovina, 0,2% dextrosa, 0,085% NaCl y 0,0003% catalasa bovina); o en medio sólido 7H10 con glicerol 0,05% y suplementado con ADC. Cuando fue necesario, como en el caso de *E. coli*, se añadió Km (20  $\mu$ g/mL) o Bedaquilina (Bq).

Para la conservación a largo plazo de las cepas de interés, tanto de *E. coli* como *M. abscessus*, se tomaron alícuotas con 15% de glicerol y se congelaron a -80°C.

## Preparación de células electrocompetentes de *M. abscessus* y células de *E. coli* termocompetentes, y posterior transformación

En el caso de *M. abscessus*, se partió de un cultivo en fase estacionaria de 5 mL que se inoculó en 100 mL de 7H9-ADC. Dicho cultivo se incubó a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  entre 0,4-0,6. El pellet bacteriano se lavó con Tween 0,05% y varios lavados sucesivos con glicerol 10% Tween 0,05%, disminuyendo en cada uno el volumen de lavado (1/2, 1/4, 1/10, 1/25 del volumen inicial). Por último, se resuspendieron las células en 1 mL de glicerol 10% y se prepararon alícuotas de 50  $\mu$ L. Las alícuotas de electroporación, junto con el DNA, se traspasaron a cubetas de 0,2cm (Bio-Rad). Se utilizó un electroporador GenePulser Xcell™ (Bio-Rad), con las condiciones 2,5 kV, 25  $\mu$ F y 1000  $\Omega$ .

Para la preparación de células de *E. coli* termocompetentes se utilizó un método basado en el tratamiento de las células con  $CaCl_2$ . 200 mL de un cultivo de *E. coli* en fase de crecimiento logarítmico ( $DO_{600nm}$  de 0,35-0,45) fueron recolectados por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 40 mL de  $CaCl_2$  100 Mm (Sigma-Aidrich),  $MgCl_2$  70 mM (Sigma-Aidrich) y acetato de sodio 40 Mm (Sigma-Aidrich). Posteriormente, se centrifugaron en las mismas condiciones y se resuspendió el pellet en 4 mL de  $CaCl_2$  100 Mm y glicerol 15%. Las células competentes se conservaron en alícuotas de 200  $\mu$ L a -80°C. Para la transformación, se descongelaron en hielo y, 2-5  $\mu$ L de DNA plasmídico se adicionó a las células ya descongeladas. La mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos, tras los cuales se dio un choque térmico a 39°C durante 50 s. Posteriormente, se adicionaron 900  $\mu$ L de medio LB y se incubó la suspensión a 37°C durante aproximadamente 1 h.

## Técnicas bioinformáticas

### Diseño de oligonucleótidos

Se llevó a cabo el diseño de dos pares de oligonucleótidos que permitieran la amplificación del gen *atpE* así como la comprobación de la introducción del mismo en el vector correspondiente. En el caso del par de oligos denominado *Clonaje atpE-pMV361* (ver secuencia en la Tabla 1), como su nombre indica, fueron los oligos utilizados para realizar los clonajes en el plásmido pMV361 y su secuencia consta de tres partes necesarias para ello: los primeros 14 nucleótidos son idénticos a los extremos del plásmido pMV361 linealizado con las enzimas de restricción correspondientes; a continuación, presentan un sitio de corte para una enzima de restricción (*MfeI* o *HindIII*) y, finalmente, una secuencia idéntica al gen *atpE*. No obstante, la secuencia del oligo directo no es idéntica a la región correspondiente del gen *atpE* ya que si fuera así, nos encontraríamos con dos sitios de corte para *MfeI*, el fragmento de PCR se digeriría por dos partes, perdiendo así parte del extremo N-terminal del gen *atpE*. Por ello, en el oligo se sustituyó una adenina por citosina para eliminar dicho segundo sitio de corte.

Por otro lado, el par de oligos *atpE Mabsc* permitió amplificar la secuencia completa del gen *atpE*. De este modo, los productos de PCR que se obtuvieron a partir de la amplificación con estos oligonucleótidos, se utilizaron para realizar el recombineering.

En cualquiera de los dos casos, se comprobó que no hibridasen en otra parte del genoma de *M. abscessus* que no fuera la de interés para no obtener en los geles bandas inespecíficas.

**Tabla 1.** Listado de oligonucleótidos usados. Subrayado aparecen indicados los sitios de corte de las enzimas de restricción *MfeI* y *HindIII*, y en cursiva aparecen las regiones de homología al plásmido pMV361. En negrita y subrayado se indica el nucleótido que fue sustituido del gen *atpE* para eliminar el sitio de corte *MfeI*.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Uso
<b>GP 60 Fw</b>	5'-ATCCGGCTCTACGCCGAC-3'	60	PCR de colonia
<b>GP 61 Rv</b>	5'-CGGCAAATGACTCTTGCGT-3'	57	PCR de colonia
<b>pMV361-B Rv</b>	5'-CCTCGAGCAAGACGTTTCC-3'	57	PCR de colonia
<b>pMV361-A Fw</b>	5'-CAGGAGCATTGCCGTTCC-3'	58	PCR de colonia
<b>pMV361-C Fw</b>	5'-GATCCGGAGGAATCACTTC-3'	53	PCR de colonia
<b>Clonaje atpE-pMV361 Fw</b>	5'-CGCAATGGCCAAGACAATTGCGATGGCGGACCCCACTTGG-3'	75	Clonaje
<b>Clonaje atpE-pMV361 Rv</b>	5'-ACGTCGACATCGATAAGCTTTTAGCTGGCGCCGGG-3'	72	Clonaje
<b>atpE Mabsc Fw</b>	5'-TTGCTGGTGCCTCATCG-3'	60	PCR
<b>atpE Mabsc Rv</b>	5'-GAACAGCCGGCCCTGA-3'	59	PCR
<b>Recombineering Fw</b>	5'-TCGCAGGGGCGTTGATTG-3'	60	PCR de colonia
<b>Recombineering Rv</b>	5'-GTAAAAAGGCGACCTTGTGCC-3'	59	PCR de colonia

## Manipulación de ácidos nucleicos

### Extracción de DNA total de *M. abscessus*

Partiendo de un cultivo crecido en fase exponencial, se centrifugó a 10000 rpm para obtener un pellet bacteriano. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 400 µL de TE (Tris/HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8) y se incubó a 85°C durante 20 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para la posterior adición de 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e incubación a 37°C durante una hora. A continuación, se añadió 75 µL de una mezcla que contiene 72,5 µL SDS + 2,5 µL proteinasa K a las células, se invirtió varias veces y se incubó a 65°C 10 min. Después se añadió 100 µL de NaCl 5 M y 100 µL de bromuro de N,N,N-trimetil,1-hexadecanamino (CTAB)/NaCl precalentado a 65°C, y la muestra se incubó de nuevo a 65°C 10 min. El DNA se extrajo añadiendo 750 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y centrifugando 5 min a 14000 rpm. El sobrenadante, correspondiente a la fase acuosa, se trasvasó a un nuevo tubo Eppendorf con 420 µL de isopropanol y se incubó toda la noche a -20°C para precipitar los ácidos nucleicos. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 12000 rpm, se decantó el sobrenadante y se añadió 500 µL de etanol 70% para volver a centrifugar de nuevo en las mismas condiciones que la última vez. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se disolvió el pellet de DNA extraído en 100 µL de dH<sub>2</sub>O libre de DNAsas.

### Aislamiento de DNA plasmídico

Se siguió el protocolo 'High Pure Plasmid Isolation Kit' de Roche. Partiendo de un cultivo en medio líquido en fase de crecimiento estacionaria, se tomaron 2 mL y se centrifugaron 5 min a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 µL de Buffer de suspensión (50 mM Tris-HCl y 10 mM EDTA, pH 8) que contiene RNasa A, y 250 µL de Buffer de lisis (0,2 M NaOH y 1% SDS). Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se añadió 350 µL de Buffer de unión (4 M clorhidrato de guanidina y 0,5 M acetato de potasio, pH 4,2) frío para volver a incubar de nuevo 5 min, pero esta vez en hielo. Se centrifugó a 14000 rpm 10 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo que contiene una membrana para permitir el paso de determinadas moléculas y se centrifugó a 14000 rpm 1 min. Se descartó el filtrado, se añadió 500 µL del Buffer de lavado I (5 M clorhidrato de guanidina, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) y se centrifugó a 14000 rpm 1 min. A continuación, se vuelve a descartar el filtrado y se añade 700 µL del Buffer de lavado II (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5).

Se centrifugó en las mismas condiciones que la última vez, se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar para secar la columna. Finalmente, se añadió 100 µL de dH<sub>2</sub>O y se centrifugó a 14000 rpm 1 min.

#### Cuantificación y visualización de ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos extraídos (DNA, plásmido) se cuantificó con un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) midiendo absorbancia a 260 nm. Por otro lado, los productos se visualizaron en geles de agarosa (0,8-2%) con bromuro de etidio (BrEt) y utilizando un transiluminador.

#### Amplificación de DNA: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los experimentos de PCR se llevaron a cabo en volúmenes finales diversos, 10 µL, 70 µL y 80 µL, en función de la finalidad que tenía la PCR: en el caso del volumen de 10 µL, no se necesitó un volumen mayor ya que únicamente se quería verificar un clonaje; por otro lado, cuando interesó producir mucha cantidad de un fragmento de PCR que posteriormente se purificaría, se necesitaron volúmenes mayores. Se partió de los DNA genómicos de *M. abscessus* WT y *M. abscessus* D29A utilizando dos pares de oligonucleótidos diferentes (*atpE Mabs* y *Clonaje atpE-pMV361*; ver Tabla 1) y dos DNA polimerasas distintas (PrimeSTAR GXL (Takara Bio) y My-Taq (Bioline)). El programa de amplificación usado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C de 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a Tm-4°C y 10 s a 72°C. Por último, se realizó una extensión a 72°C 2 min. En el caso de realizar una PCR de colonia, existen algunas diferencias con respecto a la PCR convencional: una vez preparados los tubos Eppendorf con un volumen de reacción final de 10 µL, se tomó con ayuda de un palillo estéril parte de una colonia bacteriana y se introdujo en el tubo correspondiente. El programa de amplificación utilizado es muy similar, a excepción de la desnaturalización inicial que en este caso fue de 10 minutos a 95°C (tiempo suficiente para romper las células). En cualquiera de los dos casos, se utilizaban 1,875 U de DNA polimerasa y los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración final de 0,50 µM.

#### Digestión de plásmido y de fragmentos de PCR

La digestión del plásmido pMV361 se tuvo que realizar con dos enzimas de restricción: *MfeI* (*MunI*) y *HindIII*. Para conocer la cantidad de las enzimas que era necesaria añadir, se utilizó la herramienta 'DoubleDigest Calculator' de Thermo Scientific. En un tubo Eppendorf se mezcló el volumen adecuado de las enzimas en proporción 1:2 (*MfeI:HindIII*), 10 µL de Buffer Tango y el plásmido cerrado. Se incubó a 37°C durante al menos 2h.

Los productos de PCR obtenidos del gen *atpE* WT y Mutante a partir de los DNA genómicos correspondientes y amplificados con los oligos *Clonaje atpE-pMV361* Fw y Rv fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción que el plásmido pMV361, es decir, con *MfeI* y *HindIII* y se incubó a 37°C durante 5 h para asegurar que se produjera la digestión adecuadamente.

#### Extracción y purificación de plásmido digerido a partir de gel de agarosa

Una vez llevada a cabo la electroforesis, se cortó la banda del gel correspondiente al plásmido digerido utilizando un bisturí y se introdujo en un tubo de Eppendorf. Se determinó el peso de la banda cortada y, por cada 100 mg de gel de agarosa, se añadió 200 µL de Buffer B. Se incubó a 50°C hasta observar la disolución del gel (5-10 min) vortexeando cada 2-3 min. A continuación, se cargó la muestra en la columna y se centrifugó 30 s a 13000 rpm. Se desechó el filtrado de modo que el DNA quedó unido a la columna. Para lavar la membrana, se añadió 700 µL de Buffer T3 y se centrifugó 30 s a 13000 rpm.

Se desechó el filtrado y se centrifugó la columna 1 min a 13000 rpm con el objetivo de eliminar los restos de Buffer T3. Finalmente, se colocó la columna en un nuevo tubo Eppendorf, se añadió 40 µL de dH<sub>2</sub>O, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó también 1 min a 13000 rpm. En este caso, el eluido contenía el plásmido digerido purificado.

#### Purificación directa de productos de PCR

A partir de los tubos de PCR, conociendo su volumen, se mezcló un volumen de cada muestra con dos volúmenes del Buffer B y se cargaron cada una en tubos colectores de 2 mL con una columna. Se cargaron las muestras en la columna y se centrifugaron 30 s a 13000 rpm. A continuación, se desechó el filtrado, se añadió 700 µL de Buffer T3 y se centrifugó 30 s a 13000 rpm. Se descartó el filtrado de nuevo, y se centrifugó la columna 1 min a 13000 rpm a fin de eliminar los restos de Buffer T3. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo Eppendorf, se añadió 50 µL de dH<sub>2</sub>O, se dejó incubar durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó también 1 min a 13000 rpm. El eluido contenía el DNA purificado.

#### Reacción de ligación

Para llevar a cabo la clonación en el plásmido pMV361 digerido con dos enzimas de restricción cuyos extremos son cohesivos, se preparó un tubo Eppendorf al que se añadió 4 µL de 5x DNA Ligase Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 35% (w/v) polietilenglicol-8000), 1 µL de T4 DNA ligasa, un volumen de inserto y de vector determinado para que quedaran en un ratio molar inserto:vector de 3:1, y se completó con dH<sub>2</sub>O hasta 20 µL. A continuación, se incubó a 23-26°C durante 1 hora. Tras la ligación, se transformaron células de *E. coli*.

#### Clonajes mediante técnicas independientes de enzimas de restricción y DNA ligasas

Se llevó a cabo el clonaje del gen *atpE* D29A en el plásmido pMV361 mediante la utilización de dos sistemas diferentes: Isothermal Assembly y CloneEZ (GenScript). En cualquiera de los dos casos, se partió del plásmido linearizado por digestión con las enzimas de restricción *MfeI* y *HindIII* y purificado a partir de banda de gel de agarosa.

Paralelamente, se amplificó a partir de DNA genómico de *M. abscessus* el gen *atpE* mediante PCR. Los oligos utilizados para ello constan de una región 5', idéntica al vector donde serán insertados y una región 3', idéntica al fragmento de PCR que queremos clonar (*Clonaje atpE-pMV361*, ver tabla 1). Tras comprobar la obtención de productos específicos por la visualización de una única banda de tamaño adecuado en el gel de electroforesis, se purificaron los productos de PCR. A continuación, se procedió al clonaje:

En el caso del Isothermal Assembly, se añadió 10-100 ng de inserto, 10-100 ng de vector linearizado, 7 µL del mix enzimático y se completó hasta 10 µL con dH<sub>2</sub>O. Después se procedió a transformar los plásmidos en las células termocompetentes de *E. coli* DH5α. Por otro lado, utilizando el kit de GenScript, se añadió 10-50 ng de inserto, 50-100 ng de vector linearizado, 1 µL de CloneEZ® Enzyme, 1 µL de 10x CloneEZ® Buffer y se completó con dH<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 10 µL. A continuación, se incubó a 22°C durante 30 min y se transformaron células de *E. coli* DH5α termocompetentes.

## Ensayos con *M. abscessus*

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Bedaquilina y Kanamicina) en medio sólido y líquido

En ambos casos, las cepas de *M. abscessus* que fueron utilizadas son *M. abscessus* WT, *M. abscessus* D29A y *M. abscessus* pJV53-Km.

Los ensayos en placa de CMI en sólido se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos. En primer lugar, se fundieron 180 mL de medio 7H10 a los cuales se añadieron 20 mL de ADC. A continuación, se repartió en 10 tubos Falcon 5 mL del medio fundido y preparado. Además, se añadió a cada uno de los tubos una concentración distinta de antibiótico (Bedaquilina o Kanamicina):

- En el caso de la Kanamicina, se partió de un stock que se encontraba a una concentración de 20 mg/mL y, en un volumen final de 5 mL, se querían unas concentraciones de antibiótico finales de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL y 3 µg/mL. De este modo, los volúmenes que hubo que tomar del stock de Kanamicina fueron 12,5 µL, 6,25 µL, 3,13 µL, 1,57 µL y 0,75 µL, respectivamente, calculados a partir de la fórmula  $C \cdot V = C_f \cdot V_f$
- En el caso de la Bedaquilina, se partió de un stock a concentración 10 mg/mL y se querían unas concentraciones finales de 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL y 0,25 µg/mL. Del mismo modo que se hizo para la Kanamicina, los volúmenes que hubo que añadir a cada Falcon con los 5 mL de medio fueron 2 µL, 1 µL, 0,5 µL, 0,25 µL y 0,125 µL. No obstante, al tratarse de volúmenes tan pequeños, se diluyó el stock de Bedaquilina 1:10 añadiéndose, por tanto, los volúmenes dichos multiplicados por 10. Para realizar la dilución, se preparó un tubo Eppendorf al que se añadió 450 µL de DMSO y 50 µL Bedaquilina (10 mg/mL), consiguiendo una concentración de Bedaquilina de 1 mg/mL.

El ensayo de CMI realizado en medio líquido se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos. En este caso, la concentración de Bedaquilina final en la primera columna (más concentrada) fue de 8 mg/mL, y a medida se avanza en las columnas, esta concentración se ve reducida a la mitad.

En cualquiera de los dos casos (líquido y sólido), se quería que hubiera en cada pocillo  $10^5$  células totales. En el caso del ensayo en medio sólido, las células se disolvieron en PBS + Tween, en lugar de disolverlas en medio de cultivo como se hizo para el ensayo en líquido.

Por otro lado, tras 5 días de incubación, para comprobar si había crecimiento o no, se hizo uso de resazurina, un colorante permeable a las células que tiene un color azul-púrpura. Puesto que la resazurina se reduce a resorufin (color rosa) por la respiración aeróbica de las células metabólicamente activas, pudo utilizarse como un indicador de la viabilidad celular.

## Resultados

### Obtención de los materiales de partida

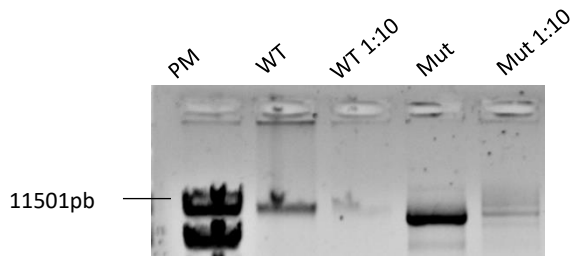
A partir de los cultivos de *M. abscessus* y siguiendo el protocolo de extracción correspondiente, se extrajo el DNA genómico de la cepa WT y la mutante, con el objetivo de amplificar el gen *atpE* y poder clonarlo en el plásmido pMV361, teniendo que extraer éste a partir de la cepa de *E. coli* Stellar. Por otro lado, fue necesaria la extracción del plásmido pJV53 de la cepa de *E. coli* DH5α para introducirlo en *M. abscessus* WT como sistema de recombineering. Las concentraciones que se obtuvieron de los plásmidos y DNA genómico son las que se muestran a continuación y se comprobaron mediante la realización de un gel de agarosa.

· **Plásmidos:**

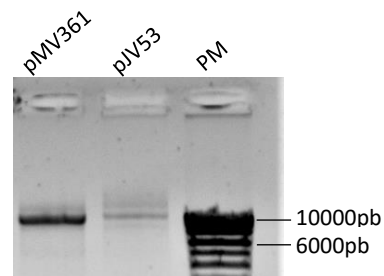
- pJV53 Km: 44,7 ng/μL
- pMV361 Km: 35,2 ng/μL

· **DNA *M. abscessus*:**

- *M. abscessus* WT: 250 ng/μL
- *M. abscessus* D29A: 170 ng/μL

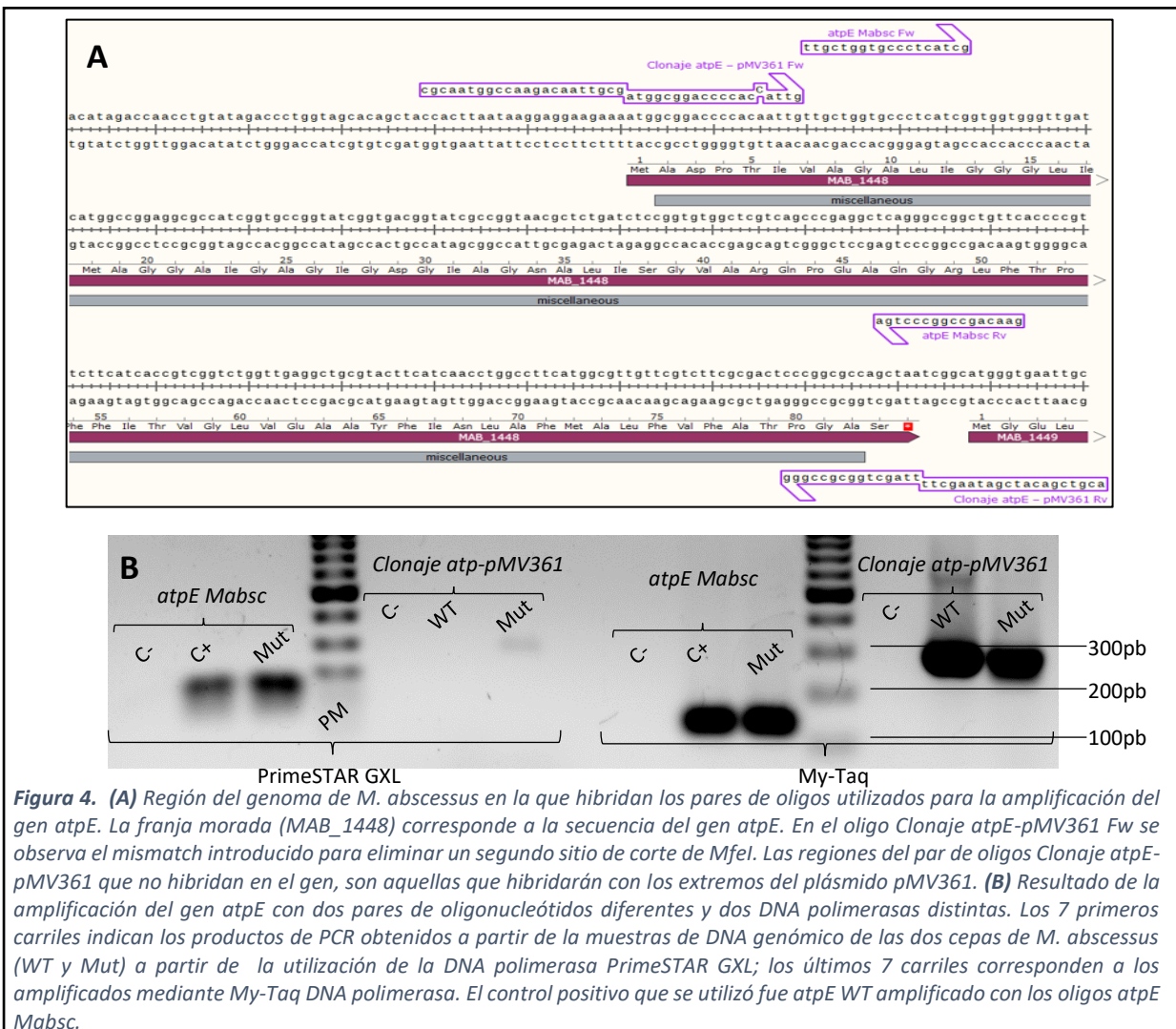


**Figura 2.** Extracción del DNA genómico de *M. abscessus* WT y mutante. Los carriles 2 y 3 hacen referencia al genoma de *M. abscessus* ATCC 19977 concentrado y una dilución 1:10. Los carriles 4 y 5 corresponden al genoma de la cepa de *M. abscessus* D29A. El marcador de peso molecular utilizado (carril 1) es Lambda Pst I.



**Figura 3.** Extracción de los plásmidos. El carril 1 corresponde al plásmido pMV361 y el carril 2, hace referencia a pJV53. El marcador de peso molecular (carril 3) es HyperLadder I.

Continuando con el DNA de *M. abscessus*, se llevó a cabo la amplificación del gen *atpE* utilizando los pares de oligonucleótidos *Clonaje atpE-pMV361* y *atpE Mabs* (ver Tabla 1), así como dos enzimas DNA polimerasas diferentes: PrimeSTAR (alta fidelidad) y My-Taq (figura 4A). Como se puede observar en la figura 3B, la amplificación llevada a cabo utilizando la enzima PrimeSTAR no salió correctamente, lo cual se pudo comprobar a la hora de realizar la purificación directa de los productos de PCR.



**Figura 4.** (A) Región del genoma de *M. abscessus* en la que hibridan los pares de oligos utilizados para la amplificación del gen *atpE*. La franja morada (MAB\_1448) corresponde a la secuencia del gen *atpE*. En el oligo Clonaje atpE-pMV361 Fw se observa el mismatch introducido para eliminar un segundo sitio de corte de MfeI. Las regiones del par de oligos Clonaje atpE-pMV361 que no hibridan en el gen, son aquellas que hibridarán con los extremos del plásmido pMV361. (B) Resultado de la amplificación del gen *atpE* con dos pares de oligonucleótidos diferentes y dos DNA polimerasas distintas. Los 7 primeros carriles indican los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de DNA genómico de las dos cepas de *M. abscessus* (WT y Mut) a partir de la utilización de la DNA polimerasa PrimeSTAR GXL; los últimos 7 carriles corresponden a los amplificados mediante My-Taq DNA polimerasa. El control positivo que se utilizó fue *atpE* WT amplificado con los oligos *atpE* Mabs.

El tamaño del gen *atpE* amplificado con el par de oligos *atpE Mabs* tiene una longitud de 134 pb, de manera que, como se observa en la figura 4B, la banda se encuentra localizada entre la de 100 y 200 pb, por lo que la amplificación es correcta. Por otro lado, el tamaño del gen *atpE* amplificado con los oligos *Clonaje atpE-pMV361*, es de 292 pb, lo cual también concuerda con la localización de la banda en el gel de agarosa.

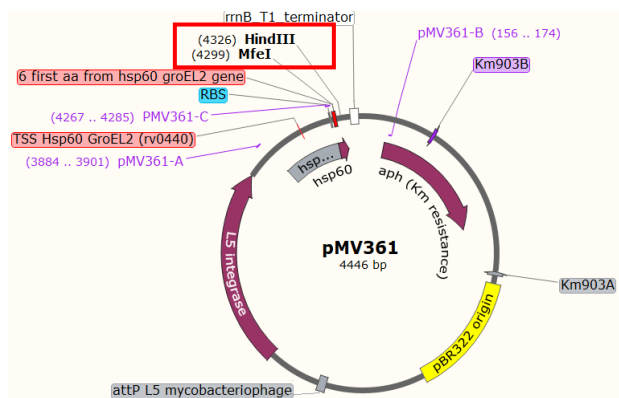
**Tabla 2.** Concentraciones obtenidas de los productos de PCR tras la purificación de los mismos.

	My-Taq DNA polimerasa		PrimeSTAR GXL DNA polimerasa	
	<b><i>M. abscessus</i> WT</b>	<i>Clonaje atpE-pMV361</i>	80 ng/μL	<i>Clonaje atpE-pMV361</i>
<i>atpE Mabs</i>		36 ng/μL	<i>atpE Mabs</i>	40 ng/μL
<b><i>M. abscessus</i> mutante</b>	<i>Clonaje atpE-pMV361</i>	105 ng/μL	<i>Clonaje atpE-pMV361</i>	1,2 ng/μL
	<i>atpE Mabs</i>	35 ng/μL	<i>atpE Mabs</i>	45 ng/μL

### Clonaje del gen *atpE* D29A en el plásmido pMV361

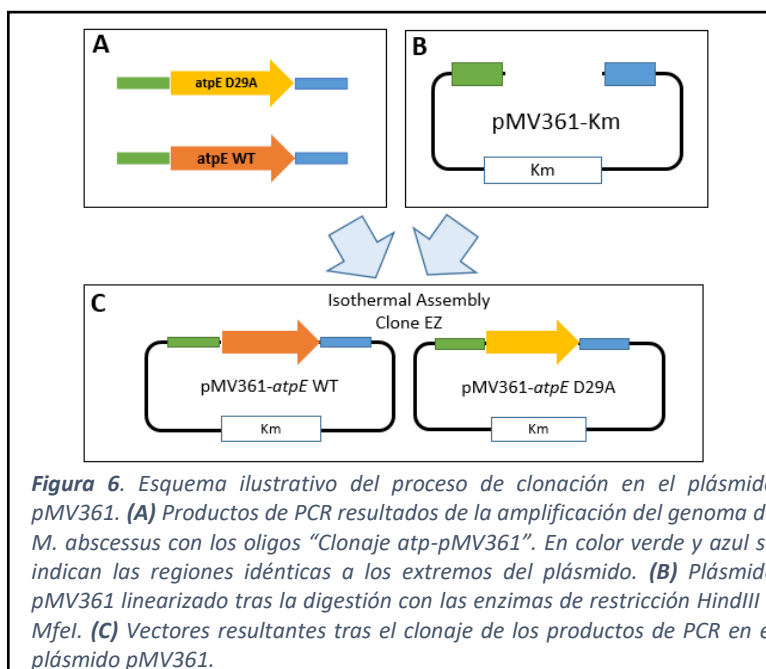
El interés por clonar el gen en este plásmido es debido a que éste contiene una integrasa y el sitio attP, que le permite integrarse en el genoma de diferentes micobacterias, como es el caso de *M. abscessus*. De este modo, se podrá integrar el alelo *atpE* D29A en la cepa de referencia de *M. abscessus* ATCC 19977, sensible a Bedaquilina.

Una vez se digirió el plásmido con las enzimas de restricción *MfeI* (*MunI*) y *HindIII*, se purificó de banda obteniendo una concentración de 17,5 ng/μL. Por otro lado, el inserto que había que introducir en el plásmido linealizado correspondió al producto de PCR que se obtuvo a raíz de la amplificación del DNA de *M. abscessus* con el par de oligos *Clonaje atpE-pMV361* (figura 4A). El clonaje en el plásmido pMV361 se realizó mediante dos técnicas de ingeniería genética modernas que evitan el uso de enzimas de restricción DNA ligasas como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos.



**Figura 5.** Componentes del plásmido pMV361. En el recuadro rojo se indica la posición dentro de la secuencia de las enzimas de restricción utilizadas para digerir el plásmido. Figura obtenida a partir de SnapGene Viewer.



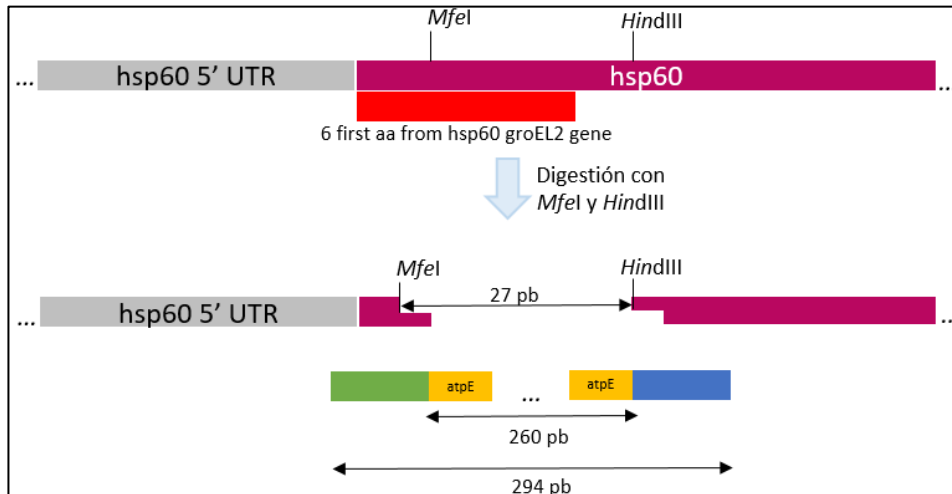


Tras ello, se transformaron células de *E. coli* termocompetentes con cuatro constructos diferentes: el gen *atpE* WT clonado en el plásmido pMV361, el gen *atpE* con la mutación de interés clonado en el plásmido pMV361, el plásmido pMV361 digerido y pUC19 cerrado, éste último como control de que el clonaje había funcionado correctamente. Puesto que el plásmido pUC19 tiene como marcador de selección un gen que proporciona resistencia a Ampicilina, las células resultantes de la transformación con el mismo se plaquearon en medio LB con Ampicilina en lugar de Kanamicina. Tras varios días de incubación en la estufa a 37°C, el crecimiento que se observó en las placas, tanto de las resultantes del Isothermal Assembly como las del cloneEZ, era mínimo, incluso para el control, pUC.

**Tabla 3.** Resultado del conteo de las colonias de *E. coli* DH5α transformadas con pMV361-atpE.

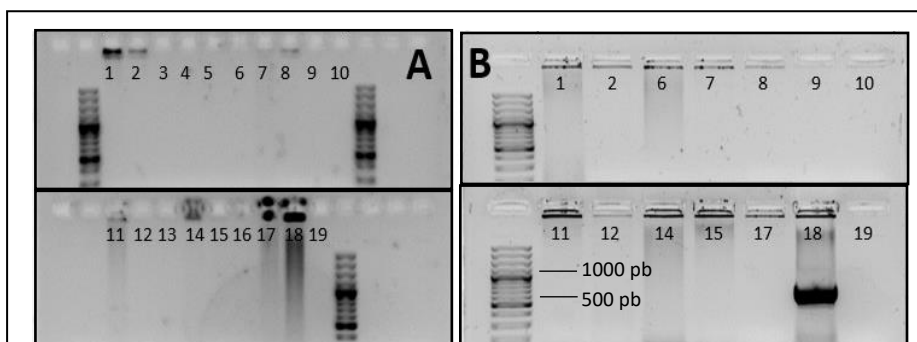
	Isothermal Assembly	CloneEZ
pMV361-atpE Mut	3 colonias	1 colonia
pMV361-atpE WT	3 colonias	5 colonias
pMV361 digerido	1 colonia	4 colonias
pUC	4 colonia	10 colonias

Para comprobar si alguna de estas colonias realmente presentaba el plásmido, se llevó a cabo una PCR de colonia con todas ellas, a excepción de las *E. coli* transformadas con pUC. En este caso, los oligonucleótidos utilizados fueron pMV361-C y pMV361-B (ver Tabla 1 y figura 5). Para saber el tamaño de la banda que se debería observar hubo que tener en cuenta lo siguiente: cuando pMV361 está cerrado, el tamaño del amplificado por dichos oligos es de 354 pb; no obstante, al haberlo cortado con las enzimas de restricción MfeI y HindIII, se pierden 27 pb que serán sustituidas por el gen *atpE*. Aunque el fragmento de PCR del gen *atpE* que se utilizó para los clonajes tiene una longitud de 294 pb, aquello que realmente se inserta son 260 pb. Por todo ello, la banda que tenía que verse tenía que equivaler a una longitud de 587 pb.



**Figura 7.** Esquema ilustrativo de la región del plásmido pMV361 en la que se encuentran las enzimas de restricción con las que se digiere el mismo. El número de nucleótidos que se pierden tras el corte con MfeI y HindIII es de 27. Por otro lado, en verde y en azul se muestran las regiones del producto de PCR del gen atpE que son idénticas a los extremos de pMV361, como en la figura 5A. Por otro lado, en amarillo se ilustra de manera simplificada el gen atpE.

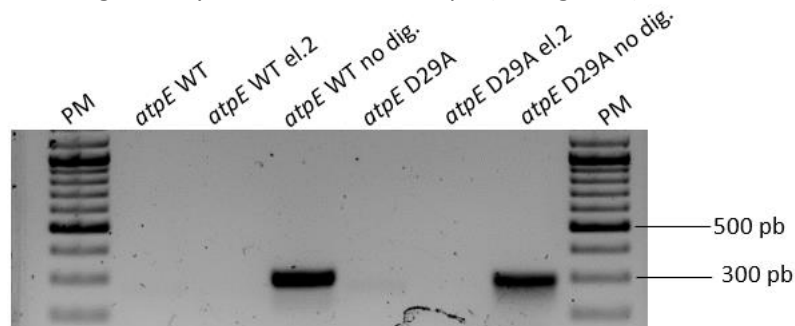
A medida que se tomaban las colonias para introducirlas en los tubos correspondientes y realizar la PCR, paralelamente se hizo una placa de réplicas de las colonias utilizadas. Como se puede observar en la figura 8A, algo falló en la PCR porque el control positivo de la misma no apareció. Por ello, a partir de las colonias que crecieron en la placa de réplicas, se repitió la PCR de colonia y, esta segunda vez, se utilizaron los oligos pMV361-A y pMV361-B (ver Tabla 1). Por tanto, del mismo modo que se calculó el tamaño de la banda que se tenía que observar para el caso anterior, en este caso, la longitud esperada era de 970 pb. A pesar de todo, en este caso sí que apareció la banda del control positivo (figura 8B) pero ninguna de las colonias dio positivo para pMV361-atpE. En conclusión, no se pudo confirmar mediante PCR la existencia de alguna colonia de *E. coli* con el gen atpE clonado en el plásmido pMV361.



**Figura 8.** Resultado de las PCR de colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  tras los clonajes mediante Isothermal Assembly y CloneEZ. En cualquiera de las dos figuras, A y B, los carriles 1-10 corresponden a los resultados del clonaje mediante CloneEZ y los carriles 11-17 al Isothermal Assembly. Los carriles 1, 11-13 hacen referencia al producto de PCR amplificado procedente de colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con pMV361-atpE Mut; los carriles 2-6, 14-16 corresponden a aquellos productos de PCR obtenidos tras la transformación con pMV361-atpE WT; los carriles 7-10 y 17, hacen referencia a los productos de PCR obtenidos tras la amplificación procedentes de colonias transformadas con pMV361 digerido. Por último, el carril 18 se trata del control positivo (pMV361) y el carril 19, al control negativo (agua). **(A)** Los oligos utilizados fueron pMV361-C y pMV361-B. **(B)** Los oligos utilizados fueron pMV361-A y pMV361-B.

A la vista de los geles, ninguna colonia dio positivo para la presencia de pMV361-atpE.

A pesar de no haberlo conseguido, se decidió intentarlo llevando a cabo un clonaje tradicional, es decir, haciendo uso de enzimas de restricción y DNA ligasa. Los productos de PCR obtenidos tras la amplificación con los oligos *Clonaje atpE-pMV361* hubo que digerirlos con las mismas enzimas de restricción que pMV361 (*MfeI* y *HindIII*) para que se pudieran clonar en el plásmido. Tras la digestión, se realizó la purificación de los mismos para retirar todo aquello que pudiera afectar a la ligación y se cuantificó la concentración que se había obtenido: 15,8 ng/μL para el fragmento del gen *atpE* WT y 8,3 ng/μL en el caso del *atpE* D29A. Aunque las concentraciones que se obtuvieron fueron muy bajas, en un gel de agarosa se intentó observar una banda, la cual tendría que ser 34 pb más pequeña que el fragmento de PCR sin digerir, cuyo tamaño es de 294 pb (ver figura 9).



**Figura 9.** Gel de agarosa 1,5% que muestra los resultados de la purificación de los productos de PCR del gen *atpE* amplificado con los oligos “Clonaje *atpE-pMV361*” y cortados con las enzimas de restricción *MfeI* y *HindIII*. Como se puede comprobar, no se pudieron identificar las bandas lo que confirma la concentración tan pequeña que se obtuvo de los mismos. El marcador de peso molecular es 100 pb DNA ladder. La cantidad de DNA que hay en cada pocillo es ~100 ng.

Se llevó a cabo la reacción de ligación y se transformaron células *E. coli* DH5α electrocompetentes. A continuación, se sembraron en placas con medio LB y Kanamicina las diluciones  $10^0$ ,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . Puesto que pasadas 24 h no se observó crecimiento, se repitió la transformación del mismo modo que se hizo el día anterior y se sembraron las diluciones  $10^0$  y  $10^{-1}$  (24 h) tras la recuperación de las células de la electroporación. A su vez, se tomaron los tubos Eppendorf resultantes de la transformación del día anterior (0 h), se centrifugaron, se resuspendieron en un volumen más pequeño y se volvió a plaquear. 48 horas después, se realizó el conteo de las células obtenidas y el resultado se muestra en la Tabla 4.

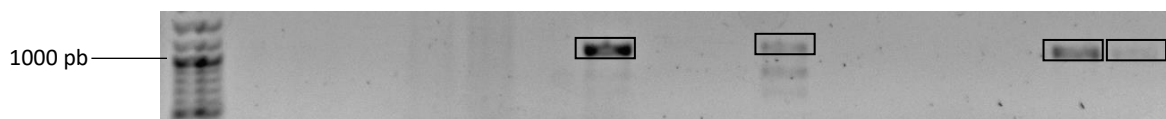
**Tabla 4.** Contaje de colonias tras la transformación de *E. coli* DH5alfa con pMV361-*atpE* mediante la técnica de clonaje que emplea enzimas de restricción y DNA ligasas.

		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$
0 h	<i>E. coli</i> DH5α pMV361- <i>atpE</i> Mut	10 colonias	1 colonia	0 colonias
	<i>E. coli</i> DH5α pMV361- <i>atpE</i> WT	32 colonias	1 colonia	0 colonias
24 h	<i>E. coli</i> DH5α pMV361- <i>atpE</i> Mut	5 colonias	0 colonias	-
	<i>E. coli</i> DH5α pMV361- <i>atpE</i> WT	1 colonia	0 colonias	-

Para las células transformadas el primer día y sembradas 24 h más tarde (a partir de los tubos Eppendorf  $10^0$ ), se observaron 150 colonias en el caso de aquellas electroporadas con pMV361-*atpE* Mut, y 100 colonias para las células electroporadas con pMV361-*atpE* WT. A partir de estas colonias, en ambos casos se replicaron en una placa aquellas que se consideraron positivas (20 en cada caso) para que, una vez crecieran, se realizara una PCR de colonia y comprobar si presentaban el plásmido o no.

Además, para las células transformadas el segundo día (24 h), el día del conteo se tomaron los tubos Eppendorf resultantes de la electroporación, se centrifugaron siguiendo los mismos pasos que para las células transformadas el primer día, y se plaqueó todo el volumen.

Días después, se llevó a cabo una PCR de colonia tomando aquellas colonias en las que se observaba crecimiento, un total de 94 colonias fueron utilizadas. Los oligos utilizados fueron *pMV361-A* y *pMV361-B* y la banda que debería observarse tenía una longitud de 970 pb. De todas las colonias utilizadas, solo 4 de ellas parecían presentar el plásmido *pMV361* con el gen *atpE* D29A clonado (ver figura 10). Realmente, al fijarnos en detalle en la figura, se puede observar que las bandas obtenidas en dichas colonias parecen estar situadas por encima de la banda de 1000 pb, por lo que no sería la banda que estábamos buscando.

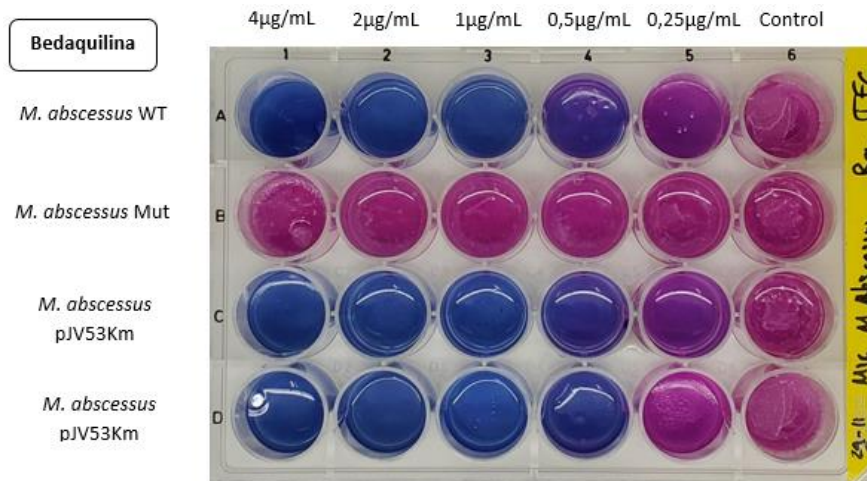


**Figura 10.** Sección del gel de agarosa correspondiente a la PCR de colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con *pMV361-atpE* WT y *pMV361-atpE* D29A, vectores obtenidos mediante la técnica de clonaje que utiliza enzimas de restricción y DNA ligasa. De todas las colonias que se tomaron, únicamente hubo amplificación por parte de los oligos utilizados (*pMV361-A* y *pMV361-B*) en aquellas que aparecen recuadradas. Sin embargo, la banda en los cuatro casos se sitúa por encima de los 1000pb, por lo que se trata de bandas inespecíficas y esas colonias no presentan el vector con el cual fueron transformadas. El marcador de peso molecular utilizado fue 100 pb DNA ladder.

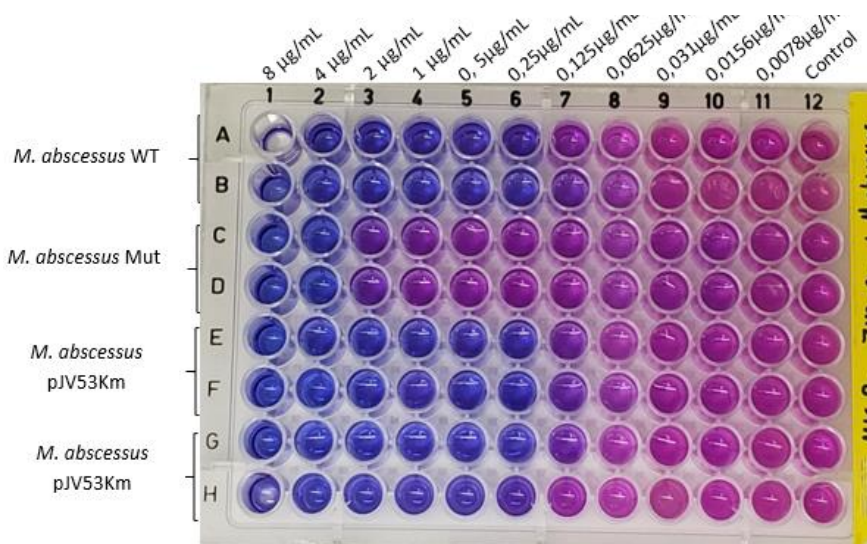
No obstante, se tomaron dichas colonias y se dejaron crecer en medio LB líquido con Kanamicina. A la vista de los cultivos líquidos, en ninguno de los cuatro se observó turbidez.

### Ensayos de concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI, en adelante) es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. En este trabajo, el objetivo de este ensayo era conocer las concentraciones de Bedaquilina que inhiben el crecimiento de *M. abscessus* WT y de la cepa que presenta la mutación de estudio. Como se puede observar en la figura 11 correspondiente al ensayo de CMI en medio sólido, así como la cepa de *M. abscessus* WT no fue capaz de crecer a concentraciones superiores de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el aislado clínico que presenta la mutación D29A fue capaz de crecer a concentraciones de Bedaquilina superiores, hasta 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El incluir en este ensayo la cepa de *M. abscessus* que presentaba el plásmido *pJV53* (plásmido que posteriormente se utilizó para llevar a cabo el recombineering) fue para demostrar que presentar dicho plásmido no confería ninguna ventaja ni aportaba resistencia a Bedaquilina y se comportaba igual que la cepa WT. Si se compara con el ensayo realizado en medio líquido (figura 12), se puede observar que en este caso, la concentración de Bedaquilina que inhibe el crecimiento en cualquiera de las tres cepas utilizadas es menor que en el ensayo de CMI en medio sólido, se ve reducida a la mitad. Puesto que el ensayo que se encuentra estandarizado es aquel realizado en medio líquido, nos quedaremos con los valores que se obtienen tras la lectura de la placa del ensayo de CMI en medio líquido.

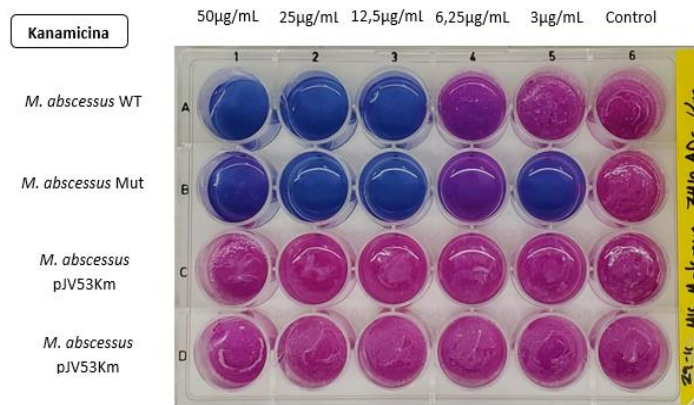


**Figura 11.** Ensayo de CMI en sólido *M. abscessus* frente a Bedaquilina. Tras la incubación con resazurina (color azul-púrpura), se encuentran pocillos con distinta tonalidad: el color rosa indica que el colorante se ha reducido a resorufin (color rosa) debido a la respiración aeróbica de las células metabólicamente activas y que, por tanto, son viables; por otro lado, el color azul muestra un no crecimiento de las células. Por tanto, se puede deducir que la cepa de *M. abscessus* con la mutación de estudio es capaz de crecer a una concentración de 4 µg/mL de Bedaquilina mientras que la WT únicamente crece hasta concentraciones de 0,5 µg/mL



**Figura 12.** Ensayo de CMI en líquido de *M. abscessus* frente a Bedaquilina. Como ya se ha explicado en la figura anterior, en este caso, la cepa de *M. abscessus* mutante solo es capaz de crecer hasta concentraciones de Bedaquilina de 2 µg/mL. Por otro lado, la cepa WT es capaz de crecer hasta concentraciones de 0,125 µg/mL. La presencia del plásmido pJV53 no aporta resistencia frente a Bedaquilina, y las cepas que lo presentan se comportan del mismo modo que la cepa WT.

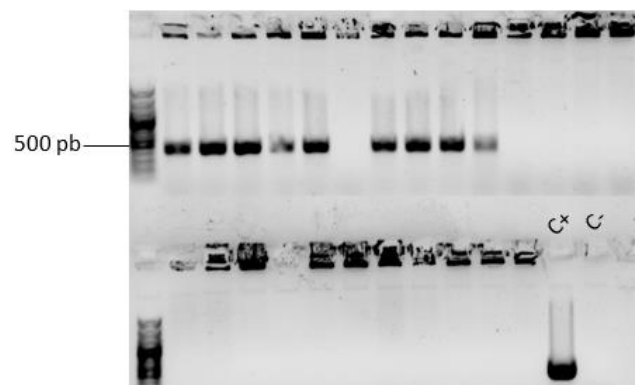
Por otro lado, se realizó el mismo ensayo en medio sólido pero utilizando como antibiótico la Kanamicina (aminoglucósido) (figura 13). En este caso, no se aprecian diferencias en el caso de la cepa de *M. abscessus* WT frente a la mutante, siendo la CMI de 6,25 µg/mL. No obstante, como era de esperar, aquella cepa que presentaba el plásmido pJV53 es mucho más resistente siendo capaz de crecer a concentraciones de 50 µg/mL de Kanamicina.



**Figura 13.** Ensayo de CMI en medio sólido de *M. abscessus* frente a Kanamicina. En este caso, no se observa ninguna diferencia entre la cepa de *M. abscessus* WT y la mutante, siendo en ambos casos la CMI de 6,25 µg/mL. No obstante, aquella cepa a la que se le ha incorporado el plásmido pJV53, se observa que resiste concentraciones de Kanamicina superiores puesto que este plásmido presenta el gen que confiere resistencia a Kanamicina y, por tanto, se observan todos los pocillos de color rosa, indicando la reducción de la resazurina.

## Recombineering

A la vista de la imposibilidad de obtener mutantes de *M. abscessus* que presentaran la mutación de estudio mediante las técnicas de clonaje vistas, se intentó realizarlo utilizando esta técnica novedosa. Tras la extracción del plásmido pJV53, se prepararon células electrocompetentes de *M. abscessus* WT siguiendo el protocolo correspondiente y se electroporaron con dicho plásmido. La siembra en placa de las mismas se realizó en dos condiciones diferentes, con y sin Kanamicina; en concreto, en las diluciones  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  se añadió Kanamicina y en las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  no se añadió, lo cual sirvió de control. Tras una semana de incubación en la estufa a 37°C, algunas de las colonias que habían crecido en presencia de Kanamicina y, por tanto, presentaban el plásmido pJV53, se utilizaron para realizar la PCR de colonia. Con ello, se pretendió demostrar que presentaban el plásmido y no habían mutado de manera espontánea adquiriendo la capacidad de crecer en presencia de Kanamicina. Para llevar a cabo esta PCR se utilizaron los oligonucleótidos GP 60 y GP 61 (ver tabla 1), que amplifican un fragmento del plásmido de 413 pb. Como se puede observar en la figura 14, de las 25 colonias que se eligieron para realizar la PCR de colonia, solamente 9 adquirieron el plásmido tras la electroporación.



**Figura 14.** Gel de agarosa tras la PCR de colonia para comprobar aquellas colonias de *M. abscessus* WT que habían incorporado el plásmido pJV53. Cada uno de los carriles corresponde al producto de PCR amplificado a partir de los oligos GP60 y GP61 obtenido a partir de diferentes colonias de *M. abscessus* tras la transformación y crecimiento en placa. Como control positivo se utilizó el plásmido pJV53, como control negativo el gDNA de *M. abscessus*, y como marcador de peso molecular, 100 pb DNA ladder. A la vista de la figura, únicamente 9 colonias dieron positivo para la presencia del plásmido pJV53.

Se seleccionaron dos de estas colonias y se crecieron en medio líquido con Kanamicina. La razón por la que se eligieron dos y no una, reside en la posibilidad de que una de ellas no creciese; de este modo, si una no crece, se sigue pudiendo utilizar la otra para preparar células competentes. A partir del mismo cultivo, se preparó uno con una densidad óptica a 600 nm de partida de 0,05. Como se ha explicado anteriormente, fue necesario inducir los genes *gp60* y *gp61* con acetamida durante 3 horas. A continuación, se electroporó con el gen *atpE* D29A obtenido tras la amplificación del genoma de *M. abscessus* mutante con los oligos *atpE Mabs* y las dos DNA polimerasas diferentes, y también se electroporó sin DNA, lo cual sirvió como control. Se sembraron 100 µL en cada placa de medio LB con 4 µg/mL de Bedaquilina y una semana después se procedió al contaje. Se obtuvieron 62 colonias en el caso de la electroporación con el gen *atpE* D29A obtenido tras la amplificación con My-Taq, y 41 colonias en el caso de la PrimeSTAR.

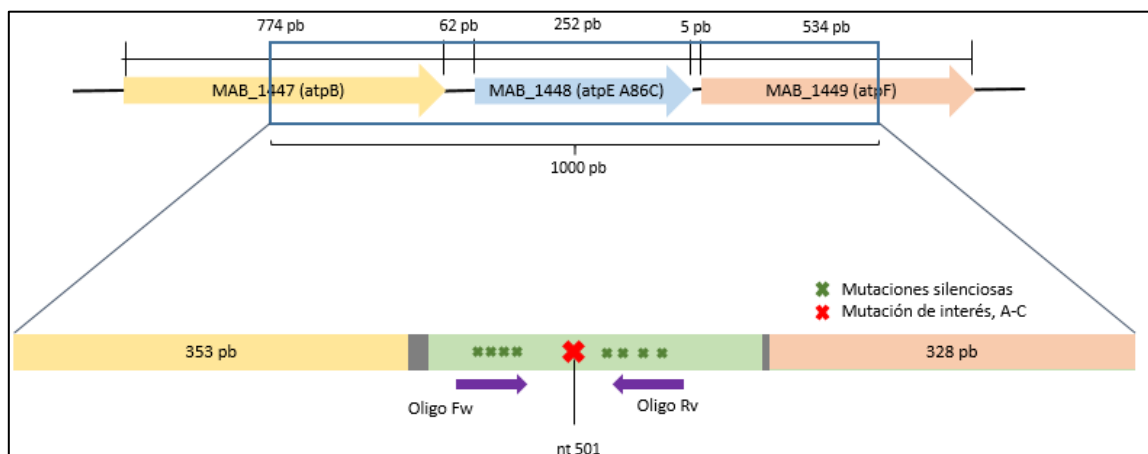
En este caso, realizar una PCR de colonia para comprobar en cuáles de las colonias que habían crecido se había producido la recombinación no era una estrategia adecuada. El gen *atpE* WT y el gen *atpE* con la mutación solo se diferencian en un nucleótido, por tanto, si se diseñaran un par de oligos en el que uno de ellos en su secuencia presentara la mutación, tanto el gen *atpE* WT como el mutante iban a ser amplificados ya que el oligo sería capaz de seguir hibridando. Por otro lado, la concentración de Bedaquilina que se añadió en las placas donde crecieron las colonias fue de 4 µg/mL, concentración a la cual *M. abscessus* ATCC 19977 no es capaz de crecer como se pudo comprobar mediante el ensayo de concentración mínima inhibitoria; no obstante, seguía estando la posibilidad de que alguna de las colonias que crecieron fueran mutantes espontáneos. En consecuencia, la única opción viable sería llevar a cabo la secuenciación del genoma de las colonias que han crecido y comprobar manualmente si presentan la mutación o no.

Como alternativa, se plantea una nueva estrategia que podría resultar útil y evita la necesidad de secuenciar el genoma. Consiste en el diseño de un fragmento de DNA de 1000 pb sintético haciendo uso de la propia secuencia de DNA del genoma de *M. abscessus* pero con una serie de modificaciones. Interesa que la mutación A86C se encuentre en el nucleótido central del fragmento y a ambos lados de la mutación, se introduzcan nuevas mutaciones silenciosas, es decir, que sigan codificando el mismo aminoácido (figura 15). La ventaja de introducir este tipo de mutaciones es que no se va a ver alterada la estructura de la subunidad c de la ATP sintasa. Mediante síntesis química, se puede obtener este fragmento e introducirlo mediante recombineering en el genoma de *M. abscessus* ATCC 19977 en sustitución del gen *atpE* WT siguiendo el mismo procedimiento que se ha explicado anteriormente y obtener así una cepa mutante resistente a Bedaquilina.

Gen <i>atpE</i> WT	
5'-	ATG GCG GAC CCC ACA ATT GTT GCT GGT GCC CTC ATC GGT GGT GGG TTG ATC ATG GCC
	Met Ala Asp Pro Thr Ile Val Ala Gly Ala Leu Ile Gly Gly Gly Leu Ile Met Ala
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
	GGA GGC GCC ATC GGT ... GGC GGT ATC ... CCC GAG GCT CAG GGC CGG CTG TTC ACC ... -3'
	Gly Gly Ala Ile Gly Asp Gly Ile Pro Glu Ala Gln Gly Arg Leu Phe Thr
	20 21 22 23 24 29 30 31 44 45 46 47 48 49 50 51 52
Región del fragmento de 1000 pb correspondiente al gen <i>atpE</i>	
5'-	ATG GCG GAC CCC ACA ATT GTC GCA GGG GCG TTG ATT GGT GGT GGG TTG ATC ATG GCC
	Met Ala Asp Pro Thr Ile Val Ala Gly Ala Leu Ile Gly Gly Gly Leu Ile Met Ala
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
	GGA GGC GCC ATC GGT ... GGC GGT ATC ... CCC GAG GCA CAA GGT CGC CTT TTT ACC ... -3'
	Gly Gly Ala Ile Gly Ala Gly Ile Pro Glu Ala Gln Gly Arg Leu Phe Thr
	20 21 22 23 24 29 30 31 44 45 46 47 48 49 50 51 52

**Figura 15.** Fragmentos del gen *atpE* WT y región del fragmento de 1000pb correspondiente al gen *atpE*. En naranja se indican los nucleótidos elegidos para ser mutados y en verde los nucleótidos por los que han sido sustituidos. Por otro lado, el nucleótido recuadrado en rojo corresponde al nucleótido mutado en el aislado clínico y, recuadrado en verde, el nucleótido por el cual es sustituido.

De esta forma, para comprobar si las colonias que crezcan en las placas han incorporado o no este fragmento de DNA, no va a ser necesario secuenciar. Se puede diseñar un par de oligonucleótidos que serán capaces de amplificar en el genoma de aquellas colonias en las que se haya producido la recombinación y no en el de aquellas que hayan mutado de manera espontánea y hayan crecido en las placas. Esto es debido a las mutaciones silenciosas que se han introducido en el fragmento de 1000 pb y que, por tanto, también están presentes en los oligonucleótidos utilizados (Tabla 1, *Recombineering*). En este caso, el número de nucleótidos distintos entre WT y mutante es superior a uno, por lo que los oligos no podrán hibridar en el genoma de aquellas colonias que no hayan sufrido la recombinación.



**Figura 16.** Esquema ilustrativo del diseño del fragmento de 1000 pb para la realización del recombineering. Cada uno de los colores (amarillo, azul y rojo), como se observa en la figura, indica diferentes subunidades de la ATP sintasa y su localización en el genoma de *M. abscessus*. Las flechas de color morado ilustran los oligonucleótidos que serían permitirían la amplificación en aquellas colonias que incorporasen mediante recombineering el fragmento de 1000 pb, permitiendo distinguirlas así de las colonias que no hayan sufrido la recombinación.



## Discusión

Se han utilizado distintos métodos para llevar un genotipo determinado a una micobacteria. Estas herramientas podrían facilitar la detección de polimorfismos asociados a resistencias a antimicrobianos, no solo en *Mycobacterium abscessus* sino en otras micobacterias, ya que el plásmido utilizado es integrativo en micobacterias. Además, se podría hacer extensible a otras bacterias en las que se pudiera utilizar el sistema del recombineering, técnica que permitiría ganar tiempo para asociar un genotipo a un fenotipo de resistencia.

A la vista de los resultados, conseguir introducir un alelo del gen *atpE* con la mutación D29A en la cepa de referencia *M. abscessus* ATCC 19977 mediante las técnicas de clonaje que evitan el uso de enzimas de restricción y DNA ligasa no ha sido posible. En estos casos, las colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  que eran capaces de crecer tras la electroporación con pMV361-*atpE* y que, en teoría deberían haber incorporado el vector, la comprobación de ello mediante PCR de colonia indicó que no fue así.

Por otro lado, utilizando la técnica convencional de clonaje, tampoco se consiguió una cepa de *M. abscessus* que presentara un alelo del gen *atpE* con la mutación. Los resultados por PCR de colonia demostraron que la banda observada era superior a 1000 pb y, por tanto, no se trataba de lo que se buscaba. Además, tras incubación a 37°C durante 24h, al tratarse de *E. coli*, debería haberse observado turbidez en los tubos que indicaran crecimiento.

A pesar de estos resultados, se ideó un método que permite introducir mutaciones puntuales; se trata del recombineering. Se obtuvieron colonias de *M. abscessus* aptas para el recombineering a las cuales se les podría introducir el fragmento de PCR correspondiente al gen *atpE* D29A y sustituirlo mediante recombinación por el gen *atpE* WT que se encuentra en el cromosoma. Es una estrategia rápida y menos laboriosa que realizar los clonajes descritos con anterioridad. Sin embargo, la desventaja que presenta este sistema es la necesidad de secuenciar para comprobar si realmente ha tenido lugar la recombinación o no. Esto es debido a que el cambio que se produce es únicamente de un nucleótido y no puede comprobarse mediante PCR de colonia, a diferencia de la utilización de plásmidos integrativos. Por ello, se ha diseñado en este trabajo una alternativa en la que se evita el uso de secuenciación y puede comprobarse la introducción de la mutación mediante PCR de colonia. Una vez se demostrara bien mediante secuenciación en el primer caso o bien por PCR de colonia qué colonias han sufrido la recombinación, se podría proceder a la caracterización de la nueva cepa de *M. abscessus* mediante curvas de crecimiento, ensayos de concentración mínima inhibitoria y experimentos de qRT-PCR.

En el caso de utilizar el plásmido integrativo, éste se va a integrar en el sitio *attB* del genoma de la micobacteria y estará regulado de una manera distinta a lo que se obtiene si se utiliza el sistema del recombineering. En este caso, el alelo que se introduzca, dadas las colas de homología que presenta, va a reemplazar al gen del cromosoma y estará regulado del mismo modo que lo estaba el gen WT.

Finalmente, los ensayos de concentración mínima inhibitoria en medio sólido y líquido han permitido demostrar que la mutación D29A que presenta la cepa mutante de *M. abscessus* sí confiere resistencia a Bedaquilina, en concreto, presentar dicha mutación le permite crecer en medio líquido a concentraciones de Bedaquilina de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , bastante superior a la concentración mínima inhibitoria para la cepa de referencia.

## Conclusiones

- La integración del vector pMV361-atpE en el cromosoma de *M. abscessus* no ha podido ser demostrada mediante métodos moleculares.
- Se ha construido una cepa de *M. abscessus* apta para llevar a cabo el recombineering.
- Los ensayos de CMI en medio líquido han demostrado que la cepa de *M. abscessus* que posee la mutación D29A es capaz de crecer a concentraciones de Bedaquilina más altas (2 µg/mL) que la cepa de referencia (0,125 µg/mL), sensible a Bedaquilina.
- El procedimiento que se ha utilizado para estudiar la contribución de una mutación en la resistencia a antimicrobianos es una estrategia que puede ser extrapolada a otros microorganismos con los mismos fines.

## Conclusions

- The integration of pMV361-atpE vector in the *M. abscessus* chromosome could not be demonstrated by molecular methods.
- A strain of *M. abscessus* suitable for recombineering has been constructed.
- MIC tests in liquid medium have shown that the *M. abscessus* strain with D29A mutation is able to grow at higher concentrations of Bedaquiline (2 µg/mL) than the reference strain (0,125 µg/mL), which is sensitive to Bedaquiline.
- The procedure used to study the contribution of a mutation to antimicrobial resistance is a strategy that can be extrapolated to other microorganisms for the same purposes.

## Bibliografía

- AEMPS. (2019). Plan Nacional Frente a la Resistencia a los Antibióticos 2019-2021. *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios*, 37. <https://doi.org/733-19-002-6>
- Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W. H., Neefs, J. M., Winkler, H., ... Jarlier, V. (2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 307(5707), 223–227. <https://doi.org/10.1126/science.1106753>
- Brown-Elliott, B. A., & Wallace, R. J. (2019). In Vitro Susceptibility Testing of Bedaquiline against *Mycobacterium abscessus* Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), 1–23. <https://doi.org/10.1128/AAC.01919-18>
- Cortes, M. A. M., Nessar, R., & Singh, A. K. (2010). Laboratory maintenance of *Mycobacterium abscessus*. *Current Protocols in Microbiology*, (SUPP.18), 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10d01s18>
- Degiacomi, G., Sammartino, J. C., Chiarelli, L. R., Riabova, O., Makarov, V., & Pasca, M. R. (2019). *Mycobacterium abscessus*, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms20235868>
- Dick, T. (2020). Rifabutin: A Repurposing Candidate for *Mycobacterium abscessus* Lung Disease. *Frontiers in Microbiology*, 11(February), 10–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00371>

- Dupont, C., Viljoen, A., Thomas, S., Roquet-Banères, F., Herrmann, J. L., Pethe, K., & Kremer, L. (2017). Bedaquiline inhibits the ATP synthase in mycobacterium abscessus and is effective in infected zebrafish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01225-17>
- Guerra-morillo, M. O., Rabasco-álvarez, A. M., & González-rodríguez, M. L. (2020). *Fibrosis Quística : tratamiento actual y avances con la nanotecnología Cystic Fibrosis : actual treatment and future perspectives with nanotechnology*. 61(2), 81–96.
- Hasworth, C. S., Banks, J., Capstick, T., Fischer, A. J., Gorsuch, T., Laurenson, I. F., ... Floto, R. A. (2017). British Thoracic Society guidelines for the management of nontuberculous mycobacterial. In *Thorax* (Vol. 72).
- Li, B., Guo, Q., Mao, Y., Zou, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., & Chu, H. (2020). Genetic Evolution of Mycobacterium abscessus Conferring Clarithromycin Resistance during Long-Term Antibiotic Therapy . *Canadian Respiratory Journal*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/7623828>
- Lopeman, R. C., Harrison, J., Desai, M., & Cox, J. A. G. (2019). Mycobacterium abscessus: Environmental bacterium turned clinical nightmare. *Microorganisms*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030090>
- Mahajan, R. (2013). Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.4103/2229-516x.112228>
- Marinelli, L. J., Hatfull, G. F., & Piuri, M. (2012). Recombineering A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Landes Bioscience*, 8(5), 5–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062933>
- Martínez, S., Cano, A., Alfonso, L., Yoldi, S., María, J., García, G., ... Microbiología, D. L. De. (2017). *Micobacterias no tuberculosis. ¿Una amenaza emergente?* 53(10), 554–560.
- Medjahed, H., & Reyrat, J. M. (2009). Construction of mycobacterium abscessus defined glycopeptidolipid mutants: Comparison of genetic tools. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1331–1338. <https://doi.org/10.1128/AEM.01914-08>
- Ramírez, A., & Araque Marquina, M. (2017). Patógenos emergentes multirresistentes: complejo Mycobacterium abscessus. *Avances En Biomedicina*, 6(3), 203–215.
- Segala, E., Sougakoff, W., Nevejans-Chauffour, A., Jarlier, V., & Petrella, S. (2012). New mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-Ring structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2326–2334. <https://doi.org/10.1128/AAC.06154-11>
- Stover, C. K., De La Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., ... Bloom, B. R. (1991). New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 351(6326), 456–460. <https://doi.org/10.1038/351456a0>
- Strnad, L., & Winthrop, K. L. (2018). Treatment of Mycobacterium abscessus Complex. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 39(3), 362–376. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1651494>
- Vesenbeckh, S., Schönfeld, N., Roth, A., Bettermann, G., Krieger, D., Bauer, T. T., ... Mauch, H. (2017). Bedaquiline as a potential agent in the treatment of Mycobacterium abscessus infections. *The European Respiratory Journal*, 49(5), 10–12. <https://doi.org/10.1183/13993003.00083-2017>

WHO. (2015). 19th WHO Model List of Essential Medicines.

[Http://Www.Who.Int/Medicines/Publications/Essentialmedicines/En](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en), (April), 1–43.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)

WHO. (2020). Operational handbook on tuberculosis. In *Module 1: Prevention Tuberculosis preventive treatment*.