



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Caracterización de ARN no codificantes de respuesta
a cobre en *Enterococcus faecalis*

Jorge Humberto Torres Robles

MEMORIA DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIOQUÍMICO

Director de Memoria

Dr. Mauricio Latorre Mora
Laboratorio de Bioingeniería
Instituto de Ciencias de la Ingeniería
Universidad de O'Higgins

Profesor patrocinante de Memoria

Dra. Valentina Parra Ortiz
Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Chile

2022



Agradecimientos

En esta instancia quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron durante esta etapa.

A todxs ellxs muchas gracias.

Financiamiento

Esta memoria de título fue desarrollada gracias a:

Proyecto FONDECYT 1190742, AÑO 2019.

Proyecto ANILLO ACT210004, AÑO 2021.



Contenido

| | |
|---|----|
| Agradecimientos..... | 2 |
| Financiamiento..... | 2 |
| Contenido..... | 3 |
| Índice de Tablas..... | 5 |
| Índice de figuras..... | 6 |
| Abreviaturas..... | 1 |
| Resumen..... | 3 |
| Abstract..... | 5 |
| Introducción..... | 7 |
| Homeostasis de cobre en bacterias..... | 7 |
| Modelo de homeostasis de Cu de <i>Enterococcus faecalis</i> | 9 |
| ARN no codificantes..... | 11 |
| ARN no codificantes en <i>E. faecalis</i> | 14 |
| Hipótesis..... | 17 |
| Objetivo general..... | 17 |
| Objetivos específicos..... | 17 |
| Materiales y métodos..... | 18 |
| Materiales..... | 18 |
| Cepas y condiciones de cultivo..... | 18 |
| Reactivos, sales y soluciones..... | 18 |
| Partidores..... | 19 |
| Búsqueda bibliográfica..... | 22 |
| Algoritmos bioinformáticos..... | 22 |
| Métodos..... | 23 |
| Extracción de RNA total..... | 23 |
| Cuantificación de ARN y ADNc..... | 24 |
| Síntesis de ADNc..... | 25 |
| PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)..... | 25 |
| Curva de crecimiento..... | 26 |
| Contenido intracelular de Cu..... | 27 |



| | |
|---|----|
| Conservación de ARNnc..... | 28 |
| Análisis estadístico. | 29 |
| Resultados | 30 |
| Identificación de ARNnc y sus posibles blancos transcripcionales en <i>E. faecalis</i> | 30 |
| Clasificación y selección de ARNnc en base a su conservación y posible participación en la respuesta a Cu en <i>E. faecalis</i> | 33 |
| Actualización proteínas de homeostasis de Cu en <i>E. faecalis</i> | 33 |
| Selección de ARNnc posiblemente vinculados a la respuesta a Cu de <i>E.</i> <i>faecalis</i> | 39 |
| Grado de conservación de ARNnc de interés entre las especies del orden <i>Lactobacillales</i> | 41 |
| Selección final de ARNnc a cuantificar. | 46 |
| Caracterización de ARNnc de interés en respuesta a Cu. | 50 |
| Crecimiento bacteriano bajo exceso de Cu. | 50 |
| Resultados de medición de concentración intracelular de Cu por TRXF. | 53 |
| Determinación de la abundancia de transcritos de ARNnc en cultivos de <i>E.</i> <i>faecalis</i> expuestos a exceso de Cu..... | 55 |
| Extracción de ARN y retro transcripción específica. | 55 |
| Cuantificación de la expresión diferencial de los ARNnc. | 58 |
| Discusión..... | 60 |
| Nuevos componentes de homeostasis de Cu en <i>E. faecalis</i> | 61 |
| Identificación de ARNnc y predicción de blancos regulatorios. | 63 |
| Abundancia transcripcional de ARNnc en respuesta a cambios en la biodisponibilidad de Cu en <i>E. faecalis</i> | 66 |
| Conclusiones..... | 71 |
| Bibliografía | 72 |



Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Partidores utilizados en la síntesis de ADNc de hebra simple..... | 20 |
| Tabla 2. Partidores utilizados en las reacciones de amplificación y cuantificación mediante qPCR..... | 21 |
| Tabla 3. Proteínas de homeostasis de Cu en otras bacterias. | 35 |
| Tabla 4. Nuevos posibles candidatos de homeostasis de Cu en E. faecalis. | 36 |
| Tabla 5. Selección de ARNnc en base a función de su blanco. | 40 |
| Tabla 6. Conservación de ARNnc en el orden Lactobacillale..... | 43 |
| Tabla 7. Conservación de ARNnc en el orden Lactobacillale..... | 44 |
| Tabla 8. Selección final de ARNnc y sus posibles blancos transcripcionales. | 48 |
| Tabla 9. Tiempo generacional | 52 |
| Tabla 10. Extracción de ARN y retro transcripción específica..... | 57 |



Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de flujo para la identificación de posibles genes blancos | 32 |
| Figura 2. Actualización del modelo de homeostasis de Cu en <i>E. faecalis</i> OG1RF | 37 |
| Figura 3. Alineamiento secuencias proteicas entre CopB y EF0875..... | 38 |
| Figura 4. Modelo de <i>E. faecalis</i> en respuesta a Cu..... | 49 |
| Figura 5. Efecto de la exposición a Cu sobre el crecimiento de <i>E. faecalis</i> OG1RF | 51 |
| Figura 6. Contenido intracelular de Cu en <i>E. faecalis</i> OG1RF expuestas a Cu | 54 |
| Figura 7. Abundancia relativa del transcritos de ARNnc de interés cuantificados mediante qPCR..... | 59 |



Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNnc: ARN no codificantes

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTn: BLAST de nucleótidos (*nucleotide BLAST*)

BLASTp: BLAST de proteínas (*protein BLAST*)

CopA: ATPasa transportadora de eflujo Cu

copA: Gen que codifica para la proteína CopA

CopB: ATPasa transportadora de captación de Cu

copB: Gen que codifica para la proteína CopB

copY: Gen que codifica para la proteína CopY

CopY: Regulador transcripcional - Represor operón *cop*

CopZ: Chaperona de Cu

copZ: Gen que codifica para la proteína CopZ

Ct: Cielo umbral (*Cycle threshold*)

Cu: Cobre

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfatos

DO: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiamino tetra acético

Ef: eficiencia de la reacción de qPCR

IntaRNA: *Interacting RNAs*

Ln: Logaritmo natural

Log: Logaritmo en base 10

Na₂HPO₄: Fosfato sódico

NCBI: *National Center of Biotechnology Information*

qPCR: PCR cuantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)



r.p.m: Revoluciones por minuto

ARN: Ácido ribonucleico

sRNA: ARN pequeño (*small RNA*)

Tm: Temperatura de alineamiento o "*melting*"

TXRF: Fluorescencia de rayos X por reflexión total (*Total X-Ray Reflection Fluorescence*)

UTR: Región no traducida (*Untranslated region*)



Resumen

El Cu es un micronutriente y potencial tóxico para las bacterias. En *Enterococcus faecalis*, los niveles de Cu intracelular están regulados por el operón *cop*, formado por tres genes: *copY*, *copA* y *copZ*. Adicionalmente, frente a la exposición al Cu, en esta bacteria se observa un cambio importante a nivel transcripcional global al parecer de la acción de factores de transcripción, sugiriendo la presencia de otros mecanismos regulatorios involucrados en la respuesta.

Los ARN no codificantes (ARNnc) corresponden a una familia de moléculas de ARN reguladores. A la fecha, en *E. faecalis* se han predicho alrededor 230 ARNnc, la mayoría de ellos caracterizados en el marco de su efecto sobre la respuesta a estrés general. Ante esto, el presente trabajo se direccionó en identificar ARNnc inducidos en respuesta a Cu en *E. faecalis*. En primer lugar, para un total de 585 posibles ARNnc codificados en el genoma de la bacteria, se les identificaron mediante el software intaRNA 1804 posibles blancos regulatorios. Posteriormente, los blancos de interés se clasificaron y seleccionaron por dos aspectos: i) Homeostasis de Cu y Respuesta a Cu y ii) Conservación de los ARNnc en el orden *Lactobacillales*.

En paralelo, con el objetivo de maximizar los blancos del primer criterio, se revisó toda la literatura existente a mayo del 2021, encontrando 14 nuevos participantes proteicos en homeostasis de Cu los cuales se rastrearon el proteoma de *E. faecalis* mediante BLASTp, logrando encontrar 4 nuevos posibles componentes en esta bacteria. Luego de aplicar los criterios de selección, se obtuvo



como resultado una lista final compuesta de 4 ARNnc (1 cis y 3 trans) y 4 blancos transcripcionales. Posteriormente, se estudió posibles cambios de abundancia de estos elementos frente a una exposición no letal de Cu (0,5 mM de CuSO₄ por 3 h) mediante qPCR.

Como resultado se obtuvo que ARNnc_1959 y sRNA_069_5_UTR aumentan aproximadamente 8 y 4 veces respectivamente, su abundancia transcripcional en la condición suplementada con Cu en relación con la condición basal, expresión que se correlacionó de forma positiva con sus blancos regulados, sugiriendo una posible regulación positiva a nivel post transcripcional por parte de estos ARNnc. Por el contrario, el ARNnc_1490 disminuye su expresión a la mitad en respuesta a Cu con respecto a la condición basal, correlacionándose negativamente con la expresión de su gen blanco. En particular, el blanco para este último ARNnc corresponde al transcrito para el operón *cop*, lo cual posiciona a este elemento como un excelente candidato para futuras investigaciones relacionadas con la regulación transcripcional de la homeostasis de Cu en *E. faecalis*.

Finalmente, los resultados de esta tesis nos permitieron identificar por primera vez un conjunto de ARNnc de respuesta a Cu en una especie bacteriana, abriendo un campo interesante de investigación en el campo de regulación transcripcional y metales.



Abstract

Copper is a micronutrient and potentially toxic to bacteria. In *Enterococcus faecalis*, intracellular copper levels are regulated by the *cop* operon, made up of three genes: *copY*, *copA*, and *copZ*. Additionally, when exposed to Cu, a significant change is observed in this bacterium at the global transcriptional level, apparently due to the action of transcription factors, suggesting the presence of other regulatory mechanisms involved in the response.

Non-coding RNAs (NcRNAs) correspond to a family of regulatory RNA molecules. To date, around 230 NcRNAs have been predicted in *E. faecalis*, most of them characterized in the context of their effect on the response to general stress. Given this, the present work was aimed at identifying NcRNAs induced in response to Cu in *E. faecalis*. First, for a total of 585 possible NcRNAs encoded in the bacterial genome, 1,804 potential regulatory targets were identified using the IntaRNA software. Subsequently, the targets of interest were classified and selected by two aspects: i) Cu homeostasis and response to Cu and ii) Conservation of NcRNAs in the order *Lactobacillales*.

In parallel, to maximize the targets of the first criterion, all the existing literature was reviewed as of May 2021, finding 14 new protein participants in copper homeostasis, which were traced to the *E. faecalis* proteome by BLASTp, managing to find 4 possible new components in this bacterium. After applying the selection criteria, a final list composed of 4 NcRNAs (1 cis and 3 trans) and 4 transcriptional targets was obtained. Subsequently, possible changes in the abundance of these



elements were studied against a non-lethal Cu exposure (0.5 mM CuSO₄ for 3 h) by means of qPCR.

As a result, it was obtained that ncRNA_1959 and sRNA_069_5_UTR increased approximately 8 and 4 times, respectively, their transcriptional abundance in the Cu-supplemented condition in relation to the basal condition, an expression that positively correlated with their regulated targets, suggesting a possible positive regulation to post transcriptional level by these NcRNAs. On the contrary, the ncRNA_1490 decreases its expression by half in response to copper with respect to the basal condition, negatively correlating with the expression of its target gene. In particular, the target for this last ncRNA corresponds to the transcript for the *cop* operon, which positions this element as an excellent candidate for future research related to the transcriptional regulation of Cu homeostasis in *E. faecalis*.

Finally, the results of this thesis allowed us to identify for the first time a set of NcRNAs in response to Cu in a bacterial species, opening an interesting field of research in the field of transcriptional regulation and metals.



Introducción

Homeostasis de cobre en bacterias.

En bacterias, el Cobre (Cu) es un micronutriente importante para la respiración aeróbica, la respiración anaeróbica y la eliminación de especies reactivas de oxígeno, puesto que es cofactor en cuproenzimas claves participantes de estos procesos [1]. Por el contrario, está la posibilidad que este metal pueda inducir la producción de especies reactivas de oxígeno a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, los cuales son capaces de dañar membranas celulares, proteínas y ADN [2]. Además, considerando que la metalación de cuproenzimas es un proceso termodinámicamente favorable, el Cu puede desplazar a otros elementos pudiendo inhibir la acción de enzimas importantes del metabolismo celular cuyo ensamblaje y/o actividad, depende de grupos tiol/cisteína y la coordinación de otros iones bivalentes [3], conduciendo a la inactivación enzimática y/o a la pérdida de estructura proteica [4].

En términos de aplicación, existe un interés creciente en la utilización del Cu para el control de infecciones debido a sus propiedades antibacterianas [4], [5]. Al mismo tiempo, los mecanismos de resistencia al Cu presentes en las bacterias pueden constituir importantes determinantes de virulencia, ya que el sistema inmunológico de los mamíferos puede utilizar, el exceso o déficit de este metal como mecanismo de defensa contra las bacterias patógenas [5]. Todas estas barreras han llevado a las bacterias a desarrollar diferentes mecanismos involucrados en el control del déficit y la toxicidad de este micronutriente.



La homeostasis de Cu consiste en el control estricto sobre de la incorporación, eflujo y el tráfico intracelular del metal, asegurando así un equilibrio entre la necesidad por este nutriente (cofactor enzimático) y la prevención de sus efectos tóxicos [6]. Los procesos involucrados en la homeostasis de este metal se conforman principalmente por [7]: 1) Captación: realizada vía proteínas de membrana encargadas de su incorporación hacia el interior de la célula, 2) Almacenamiento y distribución intracelular: ejecutado por proteínas que lo unen transitoriamente con el objetivo de su transporte o acumulación al interior de la célula, tales como chaperonas de Cu, 3) Eflujo: realizada vía proteínas de membrana capaces de transferir el metal hacia el medio extracelular, siendo las ATPasas tipo P, los transportadores de Cu presentes en la mayor diversidad de organismos.

En bacterias, el control estricto sobre la homeostasis de Cu se basa principalmente en la modificación de la capacidad de eflujo a través de la acción de factores de transcripción, los cuales regulan la expresión de genes que codifican para proteínas transportadoras [8]. Existen diversos reguladores transcripcionales sensibles directamente a cambios en las concentraciones intracelulares del Cu, entre ellos se destacan las proteínas CueR, CusRS y ComR en *E. coli*; CopL y CorE en otras proteobacterias; BxmR en cianobacterias y Copy, CsoR e YcnK en bacterias Gram positivo [9].



Finalmente, proteínas involucradas en la incorporación de Cu o metaloporos inespecíficos que permiten el transporte de este ion hacia el interior de la célula son extremadamente raros y poco conservados en especies bacterianas [1].

Modelo de homeostasis de Cu de *Enterococcus faecalis*.

E. faecalis es una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa que usualmente se encuentra como parte de la microbiota intestinal humana. Durante los últimos 20 años ha tomado gran relevancia, ya que se ha posicionado como uno de los principales patógenos causantes de enfermedades nosocomiales, endocarditis e infecciones del tracto urinario [10]. Esta bacteria, se destaca por poseer uno de los modelos de homeostasis de Cu más simples y mejor descritos a la fecha; el operón *cop* [11]–[15].

En *E. faecalis* el operón *cop* codifica para el represor transcripcional CopY, una chaperona denominada CopZ y una ATPasa de eflujo de Cu llamada CopA [9]. El sistema opera de la siguiente manera, en condiciones de baja disponibilidad de Cu, CopY coordina preferentemente dos átomos de zinc lo cual permite el reconocimiento específico del promotor del operón *cop*, reprimiéndolo. Al contrario, bajo condiciones de exceso del metal, CopY presenta una mayor afinidad por átomos de Cu los cuales desplazan al zinc, produciendo un cambio en la estructura del represor perdiendo afinidad por la región promotora y con esto, permitiendo la transcripción del operón [16].

La interacción entre CopY y CopZ depende de interacciones electrostáticas, donde la transferencia del Cu desde la chaperona hacia el regulador se produce



debido a las diferencias de afinidad por este metal, así como a las interacciones basadas en la carga entre las dos proteínas [17]. Un detalle interesante perteneciente a CopZ es su degradación más fácilmente cuando se une a Cu (I) por una proteasa celular bajo alto estrés de Cu [18]. Se plantea la hipótesis que la degradación de CopZ evita que se produzca daño celular como resultado del Cu (I) expuesto en el complejo de iones metálicos dentro de la proteína, el cual puede participar en reacciones de tipo Fenton que conducen a la formación de radicales hidroxilo reactivos y posterior daño celular [19]

Además de la respuesta del operón *cop* frente a cambios en la biodisponibilidad del Cu, análisis transcriptómicos a escala global indican que *E. faecalis* es capaz de activar o reprimir la expresión diferencial de otros 287 genes, definidos de ahora en más como genes en respuesta a Cu [9]. Esta expresión diferencial, se evidenció al exponer a *E. faecalis* OG1RF ante un tratamiento de 0,5 mM de CuSO₄ por 3 h, concentración a la cual, aumenta el contenido intracelular del metal sin afectar el crecimiento bacteriano [9]. Dentro de la diversidad de genes que se inducen en respuesta a Cu, encontramos los que codifican para: transportadores ABC, proteínas hipotéticas, enzimas ATP de tipo V y proteínas de anclaje a la superficie de la pared celular [20].

Si bien, análisis *in silico* y posteriores validaciones experimentales indicaron que la regulación de estos genes depende principalmente de la actividad de factores de transcripción, existe un número importante de elementos de respuesta a Cu que al parecer no son regulados por este mecanismo, abriendo la posibilidad a la



existencia de otros sistemas complementarios a la acción de los factores de transcripción respondiendo a cambios en la disponibilidad del Cu [9].

ARN no codificantes.

Además de la regulación mediada por factores de transcripción, el control de la expresión génica también puede ocurrir a nivel postranscripcional a través de otros mecanismos, incluidos el procesamiento del ARNm, la regulación mediante riboswitches o la modulación por otras moléculas de ARN. En particular, Los ARN no codificantes (ARNnc) corresponden a una familia de moléculas de ARN, que incluyen a micro ARN (miARN), ARN de interferencia (siARN), ARN nucleares pequeños (snoARN), ARN anti sentido (asARN), entre otros [21]. Su descubrimiento es relativamente antiguo. El primer ARNnc caracterizado data del año 1984, descrito en el modelo de *E. coli* denominado MicF de 174 pb, cuya función es inhibir la traducción del ARNm de la porina OmpF [22]

En bacterias, a la fecha se han informado un gran número de ARNnc, pero solo un grupo pequeño posee roles fisiológicos bien descritos [23]. En base a la literatura actual, la mayoría de los ARNnc participan directamente inhibiendo la traducción, mecanismo que opera de tres formas diferentes: (1) por bloqueo directo del sitio de unión al ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*); (2) por inducción de alteraciones estructurales río abajo del RBS o (3) por bloqueo de un sitio de reserva de ribosoma (RSS, *Ribosome Standby Site*) requerido para una traducción eficiente. En algunos casos, esta inhibición de la traducción se acompaña de la degradación del ARNm objetivo.



Los ARNnc pueden ser codificados en *cis* y *trans*. Los ARNnc codificados en *cis*, se superponen con sus genes blancos (se transcriben en la hebra complementaria), existiendo una paridad casi exacta de bases entre el ARNnc y el ARNm, mientras que, para los ARNnc en *trans*, los genes blancos de la regulación están codificados en otras regiones del genoma, existiendo, una complementariedad imperfecta con el ARNm del gen blanco [24]. Si bien, la mayoría de los ARNnc codificados en *cis* o en *trans* pueden inhibir la traducción o promover la degradación del ARNm, existen algunos de estos reguladores pueden estabilizar sus ARNm objetivos, a través de la estabilización de ARNm que presentan un alta tasa de degradación [25].

En particular, en bacterias Gram negativas existen proteínas de unión a ARNnc (RBP, *RNA-Binding Protein*) tales como Hfq o ProQ, las cuales estabilizan complejos moleculares permitiendo la hibridación y formación del dúplex ARNnc-ARNm. En el caso de bacterias Gram positivas, se ha propuesto a CsrA como una posible RBP [26]. Esta proteína tiene una fuerte preferencia por la unión de secuencias de ARN ricas en purina (AG) en el extremo 5'-UTR de los ARNm blancos, incluidas las secuencias de Shine-Dalgarno (SD). La unión de CsrA a la secuencia SD puede desencadenar la degradación del ARN al bloquear el acceso a los ribosomas, como también puede aumentar la estabilidad del ARNm y promover su traducción, protegiendo los transcritos de la actividad de AARNasas o previniendo la formación de estructuras que bloquean la unión del ribosoma [26].



Otras RBP que regulan las respuestas adaptativas bacterianas son las proteínas de respuesta al frío (CSP, *Cold Shock Protein*) [26]. Las CSP son una familia de pequeñas proteínas que están muy conservadas tanto en secuencia como en estructura, actuando como chaperonas de ARN previniendo la formación de estructuras secundarias a bajas temperaturas. En *E. faecalis* una CSP de interés es CspR (EF2925), la cual aumenta su expresión durante el estrés por frío y es necesaria para la virulencia y la supervivencia eficaz en condiciones de estrés [27], [28].

El avance en las técnicas de secuenciación y herramientas bioinformáticas han sido uno de los principales aliados a la hora de buscar posibles ARNnc y sus genes blancos en especies bacterianas [24]. En este sentido, existen diversos programas asociados a la búsqueda de interacción entre un ARNm y ARNnc. Uno de los más utilizados en los últimos años es el IntaRNA, plataforma disponible en línea la cual utiliza un algoritmo para predecir la interacción entre moléculas de ARN, a través de la identificación de mínimos de energía libre de Gibbs y con ello identificar y ranquear las uniones más estables [29], [30]. Esta herramienta posee una serie de ventajas, como su interfaz amigable con el usuario siendo de fácil utilización, bajo requerimiento de recursos para el análisis de datos lo cual permite obtener resultados en el corto plazo sin la necesidad de grandes procesadores, ofrecer un mapa detallado de la interacción de manera que se puede evaluar la energía libre en cada zona del dúplex de ARN; sumado a una alta versatilidad ya que puede predecir interacciones en organismos procariontes y eucariontes [30].



Este tipo de herramientas han permitido la predicción de cientos ARNnc en diversas bacterias, entre ellas *E. faecalis*.

ARN no codificantes en *E. faecalis*.

Como en la mayoría de las bacterias descritas a la fecha, la regulación de genes en *E. faecalis* ocurre en múltiples niveles [31]. A nivel transcripcional, el inicio de la transcripción está regulado principalmente por factores transcripcionales que modulan las actividades promotoras [32]. Entre estos, se predice que *E. faecalis* tiene alrededor de 145 genes que codifican para reguladores transcripcionales que pertenecen a diferentes familias de proteínas [32]. Estos factores de transcripción controlan la expresión de sus genes objetivos al unirse principalmente en la región promotora, afectando positiva o negativamente la transcripción lo que posteriormente altera la abundancia de los ARNm específicos.

A nivel de mecanismos complementarios de regulación a los factores de transcripción, uno de los ejemplos mejor estudiados de regulación postranscripcional mediada por ARNnc en *E. faecalis*, es el control de la conjugación de un plásmido de respuesta a feromonas, en el cual un ARNnc en *cis* juega un papel importante en la regulación transcripcional. Esta regulación recíproca mediada por ARN depende de la AARNasa III, lo que demuestra la importancia del procesamiento del ARN en la regulación de la expresión génica [33]

Un trabajo publicado por Gao y cols. el año 2010, declaró que el operón *ebp*, por sus siglas en inglés “*endocarditis and biofilm-associated pil*”, está regulado a través de ARNnc el cual podría afectar la acción de la endonucleasa AARNasa J2



[34]. En el año 2011, el grupo de Shioya y cols., logró identificar y caracterizar en *E. faecalis* un ARNnc de pequeño tamaño (EF3314_EF3), potencialmente involucrado en el control sobre el recambio de proteínas abundantes, un hallazgo que declara la importancia de los ARNnc en otros procesos moleculares [35]

Recientemente, un trabajo publicado por Michaux, a través del uso de la herramienta IntaRNA acoplada a experimentos de expresión génica global, declaró la existencia de un total de 230 ARNnc codificados en el genoma de *E. faecalis*, capaces de cambiar su abundancia transcripcional frente a diferentes tipos de estrés, tales como sales biliares, estrés osmótico, estrés oxidativo y acidez [36]. Este alto número de ARNnc presentes en la bacteria, supone la existencia de redes reguladoras dirigidas por estas moléculas, posiblemente claves para la transición de una relación comensal con el huésped a un escenario de virulencia [37].

En resumen, existen trabajos que declaran la existencia de ARNnc codificados en el genoma de *E. faecalis*, sin embargo, a la fecha no hay información en *E. faecalis* u otras bacterias, que vincule a estas moléculas con la respuesta transcripcional al Cu o a mecanismos de homeostasis del metal. Considerando el hecho que cambios en la biodisponibilidad del Cu inducen una respuesta transcripcional a escala global en este patógeno, sumado al alto número de ARNnc codificados en el genoma de *E. faecalis* capaces de responder a diferentes condiciones de estrés, es plausible suponer la existencia de ARNnc los cuales podrían estar cambiando su abundancia transcripcional frente al Cu. Ante esto, el presente trabajo se direcciona en identificar ARNnc inducidos en respuesta a Cu en



E. faecalis, mecanismos complementarios que permitirán profundizar en la comprensión de la homeostasis del metal en ésta y otras bacterias.



Hipótesis

Cambios en la disponibilidad de cobre afectan la abundancia transcripcional de ARNnc codificados en *Enterococcus faecalis*.

Objetivo general

Identificar y caracterizar la respuesta transcripcional de ARNnc frente a cambios en la disponibilidad de Cu en *E. faecalis*.

Objetivos específicos

1. Identificar ARNnc y sus posibles blancos transcripcionales en el genoma de *E. faecalis* mediante análisis *in silico*.
2. Clasificar y seleccionar ARNnc en base a su conservación y posible participación en la respuesta a Cu en *E. faecalis*.
3. Determinar posibles cambios de abundancia de los ARNnc seleccionados bajo condiciones de exceso de Cu en *E. faecalis*.



Materiales y métodos

Materiales.

Cepas y condiciones de cultivo.

En la presente tesis se utilizó la cepa de *E. faecalis*: OG1RF, adquirida desde el Laboratorio de la Dra. Bárbara E. Murray (Houston, EUA). Esta cepa se cultivó en medio basal nutritivo denominado medio N (1 % (p/v) glucosa (Merck, New Jersey, EUA), 1 % (p/v) peptona (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), 1 % (p/v) fosfato mono hidrógeno de sodio (Merck), 0,5 % (p/v) extracto de levadura (Oxoid)). En los cultivos sólidos en placa (agar N), se utilizó la misma composición del medio N al cual se le adicionó agar bacteriológico al 1,5 % (p/v) (Oxoid). Los cultivos sólidos se realizaron a una temperatura de 37 °C en una estufa Incucell 55R (MMM Group, Alemania). Los cultivos líquidos se efectuaron en una estufa L5I-7016R (Labtech, Salt Lake, EUA) con agitación de 140r.p.m. a 37 °C. Las cepas se almacenaron a -80 °C en medio N 80 % (v/v) y glicerol 20 % (v/v). La cuantificación de absorbancia de los cultivos líquidos se realizó en un espectrofotómetro UV/Visible Biochrom WPA Biowave II (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) a una densidad óptica (DO) de 600 nm.

Reactivos, sales y soluciones.

Los reactivos y sales utilizados en la preparación de medios de cultivo y soluciones se adquirieron en las empresas Merck, Oxoid y Sigma (Illinois, EUA). Las soluciones y medios se prepararon en agua destilada y desionizada adquirida



en Aguas de la fuente (Santiago, Chile) y del laboratorio de Biología del Envejecimiento, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, esterilizada mediante autoclave LS-1 (Rexall, Mississauga, Canadá) durante 15 min a 120 °C. Los kits y enzimas utilizados en los ensayos de biología molecular se adquirieron en las empresas Maccura Biotechnology (Chengdu, China), Qiagen (Duesseldorf, Alemania), Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EUA) y Agilent Technologies (California, EUA).

Partidores.

Todos los partidores para las reacciones de síntesis de ADNc (Tabla 1) y qPCR en tiempo real (Tabla 2), se sintetizaron por Integrated DNA Technologies (Iowa, EUA). El diseño de éstos se llevó a cabo mediante el Programa Primer Premier 3.0 (Primer Biosoft International), utilizando como templado la secuencia de los ARNc identificados en el genoma secuenciado de *E. faecalis* OG1RF (NCBI Taxonomy ID: 474186).



Tabla 1. Partidores utilizados en la síntesis de ADNc de hebra simple. En la tabla se señala el nombre del partidor marcado como indicador, la secuencia del partidor y la temperatura de alineamiento o *melting* (T_m), utilizados en los ensayos de síntesis de ADNc.

| Indicador | Secuencia (5' 3') | T_m °C |
|---------------------|---------------------------|-------------------------|
| ARNnc_1490_ADNc | TTATCTCGGGGGCACTTGC | 60 |
| ARNnc_1959_ADNc | CCCTGTAAATATTACAGAAA | 53 |
| 16S_ADNc | ACCTTCCGATACGGCTA | 62 |
| ARNnc_1666_ADNc | CTATCACCCTAAAATTA AAACTGA | 63 |
| sRNA_069_5_UTR_ADNc | AAGGCGCAA ACTCAAAAATT | 61 |



Tabla 2. Partidores utilizados en las reacciones de amplificación y cuantificación mediante qPCR. En la tabla se señala el nombre del partidor marcado como indicador, la secuencia del partidor y la temperatura de alineamiento o *melting* (T_m), utilizados en los ensayos de cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR).

| Indicador | Secuencia (5' 3') | T_m °C |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| ARNnc_1490_F | AAAGGGACTCGTTGTACGCG | 60 |
| ARNnc_1490_R | GATAGACCAATTCCCCGCGT | 60 |
| ARNnc_1959_F | GTGCCAACGCTTTTTGGTCT | 60 |
| ARNnc_1959R_ | GTGGTGCCGGACATAGTGAA | 60 |
| sRNA_069_5_UTR_F1 | TGAATAAAGAATGGTTGGGCGA | 59 |
| sRNA_069_5_UTR_R1 | TGAAGCTTTCGCCCAACCA | 59 |
| sRNA_078_5_UTR_F2 | ACCTGATTACTATGTGGAAATGA | 55 |
| sRNA_078_5_UTR_R2 | CACTCTTCCTTCATTTCCACA | 55 |
| ARNnc_1666_F | ATCAACTGGCGGTGGTGTTA | 60 |
| ARNnc_1666_R | AACTGACGCAACGGACGA | 60 |
| 16S_F | GTGAGGTAACGGCTCACCAA | 60 |
| 16S_R | TGCTCGGTCAGACTTTCGTC | 60 |



Búsqueda bibliográfica.

La búsqueda actualizada de proteínas de homeostasis de Cu se realizó directamente en la base de datos PubMed (Public MEDLINE), utilizando como palabras claves “*Copper Homeostasis Bacteria*”.

Algoritmos bioinformáticos.

La búsqueda de genes blancos de los ARNnc de *E. faecalis*, se llevó a cabo mediante el programa IntaRNA [29], [30], utilizando como entrada la secuencia nucleotídica de ARNnc de *E. faecalis* en formato FASTA, usando parámetros por defecto. La búsqueda de nuevos componentes de homeostasis de Cu en *E. faecalis*, se llevó a cabo mediante el programa BLASTp [38], [39], utilizando como entrada la secuencia aminoacídica de las proteínas encontradas en la búsqueda bibliográfica comparando contra base de datos aminoacídica de proteínas de *E. faecalis* OG1RF, usando parámetros por defecto. Para la búsqueda de homología entre los ARNnc de las diferentes especies del orden *Lactobacillales* se utilizó el programa BLASTn [38], [39]. Para la selección de resultado, se utilizó como filtro coberturas mayores al 60 y E-value inferiores a 1E-5 para los análisis de BLAST.



Métodos.

Extracción de RNA total.

El ARN total se extrajo de cultivos de la cepa de *E. faecalis* OG1RF crecidos en un medio N sin (basal) y con suplemento de Cu (tratamiento). El protocolo consistió en diluir 1:20 un cultivo crecido durante toda la noche y dejarlo crecer 3 horas con agitación a 37 °C en tubo falcon de 50 mL, posteriormente se ajustó a una concentración de $DO_{600nm} = 0,05$ final en dos tubos falcon 50 mL (A basal, B tratamiento) con medio N fresco creciendo en agitación 140 r.p.m a 37 °C. Pasados 30 minutos, se suplementó el tubo B con $CuSO_4$ a una concentración de 0,5 mM y se dejaron crecer ambos tubos durante 2 horas y 30 minutos más. Luego, se tomaron 3 alícuotas independientes (réplicas biológicas correspondientes a 5 mL de cultivo) de cada tubo (A y B) a las 3 h post tratamiento, constituyendo un total de 6 muestras, correspondientes a 3 réplicas biológicas de las condiciones basal y 3 tratamientos. Con el fin de eliminar el exceso de metal, las alícuotas se centrifugaron a 9.000 r.p.m a 25 °C durante 15 min, se eliminó el sobrenadante luego se resuspende el precipitado en 1 mL de NaCl transfiriéndolos luego a tubos eppendorf. Estos tubos se centrifugaron a 14.000 r.p.m por 3 minutos a temperatura ambiente eliminando luego el sobrenadante. Trabajando en hielo, el precipitado se resuspendió con 800 μ L de NaCl 0,85% frio a 4 °C, el resuspendido se centrifugó a 14.000 r.p.m a temperatura ambiente por 3 minutos resuspendiendo el precipitado en 800 μ L de EDTA 1 mM frio a 4 °C, este nuevo resuspendido se centrifugó a



14000 r.p.m a temperatura ambiente por 3 minutos, eliminado el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado con 800 μL de H_2O frío a 4°C . Finalmente, se centrifugaron los tubos a 14.000 r.p.m a temperatura ambiente por 3 minutos y eliminamos el sobrenadante.

Para el protocolo de extracción de ARN, se recuperó el pellet y se dejó durante 20 minutos a 37°C en presencia de lisozima (10 mg/mL) para lisar las bacterias. Luego de la incubación, se llevó a cabo una primera extracción mediante el kit RNA Mag-Bind RNA Extraction de Maccura Biotechnology (Chengdu, China), proceso automatizado en Auto-Pure32A Maccura Biotechnology (Chengdu, China), se cuantifica ARN y se continua con la utilización del kit QIAGEN RNEasy siguiendo las recomendaciones del fabricante. A fin de descartar contaminación con ADN, las muestras de ARN se trataron con 10 U de DNAasa (Quiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, el ARN se resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas para su cuantificación final.

Cuantificación de ARN y ADNc.

La cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop OneC Microvolumen (Thermo Fisher Scientific Massachusetts, EUA), cargando 1 μL de las muestras de ARN extraídos y ADNc sintetizado obteniendo las razones de absorbancia entre 260/280 nm y 260/240nm, criterio que permite determinar la eventual presencia de proteínas y fenoles en la muestra, respectivamente, los que pueden interferir con la actividad de la enzima



transcriptasa reversa en la síntesis de ADNc. Los resultados fueron expresados en concentración de ng/uL.

Síntesis de ADNc.

La síntesis de ADNc de hebra simple se realizó mediante la utilización del kit RevertAid First Strand ADNc Synthesis de Thermo Scientific (Massachusetts, EUA) con el uso de partidores específicos detallados en la Tabla 2 en la sección de materiales. La reacción de transcripción reversa se realizó a partir de 0,48 µg de ARN total y 2 µL partidores (10 pmol/µL) en un volumen de 20 µL siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se cuantificó a través de espectrofotometría. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior medición por qPCR.

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Mediante qPCR, se analizó la abundancia relativa de los ARNnc seleccionados en la cepa silvestre de *E. faecalis* OG1RF para las 6 muestras de ADNc. La amplificación se efectuó en una mezcla final compuesta por 5 µL de ADNc templado previa dilución 1:200, 12,5 µL de Brilliant II SYBR Green QPCR master mix, 1 µL de cada partidore detallados en Tabla 1 (sección 5.1.3) y agua libre de nucleasas hasta completar volumen total de 25 uL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador CFX96 (Bio-Rad, California, EUA), siendo el programa de reacción de PCR utilizado el que se describe a continuación: a) activación de la enzima, 95 °C por 10 min, b) amplificación, 40 ciclos de: i) desnaturalización, 95 °C por 30



segundos, ii) *Annealing*/Extensión a 60°C por 1 minuto. Cada muestra de ADNc se cuantificó por triplicado. La obtención de los datos crudos se realizó utilizando el programa CFX maestro (Bio-Rad, California, EUA). Los resultados se expresaron como la razón de cambio entre la abundancia normalizada del transcrito para el gen cuantificado en la muestra tratada con respecto a la condición basal. El valor de abundancia normalizado se calculó utilizando como referencia la abundancia de un transcrito que no varía su abundancia en las diferentes condiciones analizadas (ARN 16S, RNA *housekeeping*) [40], mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 1: Razón de cambio normalizado} = \frac{E_f \text{ Gen}(\Delta C_p)}{E_f \text{ normalizador}(\Delta C_p)}$$

E_f = Eficiencia promedio de la pareja de partidores durante todas las reacciones

ΔC_t = Diferencia del ciclo en que se inicia la detección de fluorescencia (ciclo umbral o *cycle threshold*) entre la muestra control y muestra experimental.

Curva de crecimiento.

El objetivo de este experimento fue comparar el tiempo de crecimiento bacteriano entre una cepa bacteriana sin y con exposición a Cu para determinar las condiciones experimentales. A partir de un cultivo líquido, crecido toda la noche en medio N a 37 °C con agitación, se ajustó un inóculo con una $DO_{600nm} = 0,05$ en un tubo control conteniendo 20 mL de medio N. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación a 140 r.p.m hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 1$, alcanzada la DO se inocularon 12 tubos con 20 mL de medio N ajustados a $DO_{600nm} = 0,05$. Pasada 30 min de



incubación a 37 °C con agitación a 140 r.p.m, se ajustaron concentraciones crecientes de Cu desde 0 (basal); 0,1; 0,5 o 2,5 mM adicionando CuSO₄. Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C con agitación a 140 r.p.m. El crecimiento bacteriano se monitoreó mediante registro de absorbancia cada 1 hora durante las primeras 8 h y luego una medición final a las 24 h. Los valores de densidad óptica se utilizaron en el cálculo del tiempo generacional, definido como el tiempo requerido para duplicar la masa de bacterias en un lapso determinado, a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 2: Tiempo generacional} = \ln(2) / \frac{\ln(B2) - \ln(B1)}{t2 - t1}$$

B1 = Densidad óptica cuantificada a tiempo t1.

B2 = Densidad óptica cuantificada a tiempo t2.

t1 = Tiempo inicial, tiempo arbitrario en el cual el cultivo se encuentra en fase exponencial.

t2= Tiempo posterior al tiempo t1 (final), en el cual el cultivo aún encuentra en fase exponencial.

Contenido intracelular de Cu.

Se determinó el contenido intracelular de Cu para la cepa de *E. faecalis* OG1RF, utilizando las condiciones de crecimiento, concentración y tiempo de exposición al metal que se utilizaron para los experimentos de curva de crecimiento. Desde los cultivos, se obtuvieron directamente, alícuotas de 6 mL ajustadas aproximadamente a una DO_{600nm}= 1 (por triplicado) en cada una de las muestras,



las cuales se centrifugaron a 9.500 r.p.m. a 4 °C durante 15 min, se les eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de H₂O estéril mediante vortex, para posteriormente traspasar todo el contenido (entre 1 a 1,5 mL) a un tubo eppendorf de 2 mL, luego estos tubos se centrifugaron a 14.000 r.p.m por 3 min a 25 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de NaCl 0,1 M estéril. Luego los tubos se centrifugaron a 14.000 r.p.m a 25 °C, nuevamente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de EDTA 1 mM estéril, se centrifuga a 14.000 r.p.m por 3 min a 25 °C y se eliminó el sobrenadante, nuevamente se resuspendieron en 1 mL de H₂O estéril, centrifugando por última vez a 14.000 r.p.m por 3 min a 25 °C. Por último, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se guardó a -20 °C para mediciones de metales por TXRF (servicio entregado por el INTA de la Universidad de Chile). Los datos finalmente son declarados en concentraciones de Cu en µg/L.

Conservación de ARNnc.

Utilizando como entrada la secuencia nucleotídica de los ARNnc seleccionados y por medio de la utilización del programa BLASTn se rastrearon posibles homólogos de estos ARN en especies del orden *Lactobacillales* con genoma secuenciado. Estas especies correspondieron a: *Streptococcus pyogenes* MGAS 8232 (*S. pyogenes* MGAS 8232), *Enterococcus hirae* ATCC 9790 (*E. hirae* ATCC 9790), MGAS315 (*S. pyogenes* MGAS 315), *Streptococcus mitis* NCTC12261 (*S. mitis* NCTC12261), *Streptococcus pneumoniae* R6 (*S. pneumoniae*



R6), *Streptococcus mutans* UA159 (*S. mutans* UA159), *Streptococcus agalactiae* 2603V/R (*S. agalactiae* 2603 V/R), *Streptococcus agalactiae* NEM316 (*S. agalactiae* NEM316), *Lactobacillus plantarum* WCFS (*L. plantarum* WCFS), *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (*L. johnsonii* NCC533) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 (*L. lactis* II1403). De los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellos con E-value inferior a $1E-5$ y cobertura superior al 60 % con relación a los ARNnc de *E. faecalis*, las que se definieron bioinformáticamente como homólogas a criterios previamente publicados [41], [42].

Análisis estadístico.

Réplicas técnicas y biológicas para cada experimento se detallan en el pie de las figuras o en la descripción de los protocolos cuando corresponda, reportando el promedio de las mediciones con sus respectivas desviaciones estándar. Los datos se analizaron estadísticamente mediante una prueba de ANOVA, utilizando para esto el software GRAPHPAD PRISMA trial v8.0. Para los experimentos de qPCR se utilizó el método 2 delta-delta Ct [43]. Ambos programas se aplicaron utilizando los parámetros establecidos de base considerando diferencias estadísticamente significativas si $p < 0,05$



Resultados

Identificación de ARNnc y sus posibles blancos transcripcionales en *E. faecalis*.

Los ARNs desempeñan una gran variedad de funciones importantes en organismos vivos, a menudo reguladoras, que se extienden mucho más allá del papel intermediario en la biosíntesis de proteínas. En el contexto de ARNnc, muchas de estas moléculas regulan postranscripcionalmente la expresión génica, por tanto, predecir las interacciones ARNnc-ARNm blanco es de suma importancia a la hora de esclarecer el tipo de regulación y su importancia fisiológica.

Tal como se mencionó, el software IntaRNA es una herramienta bioinformática usada para predecir interacciones entre ARNs previamente utilizada en la detección de estas moléculas en *E. faecalis*. Su modo de operación radica en calcular una puntuación de energía libre combinada de interacción, que consiste en la suma de la energía libre de hibridación y la energía libre requerida para hacer accesibles los sitios de interacción [29], [30]. Además, se aplica la existencia (pero no la ubicación exacta) de una semilla o inicio de hibridación, que puede ser establecida por el usuario. Finalmente, el programa entrega un diagrama de hibridación entre la secuencia “*query*” (en este caso el ARNnc) y el blanco encontrado en el genoma objetivo (en este caso el ARNm), calculando además la energía libre combinada de interacción, criterio utilizado como discriminador de posible interacción.



Tomando esto en consideración, mediante la herramienta IntaRNA se buscaron posibles blancos de regulación para un total de 585 ARNnc codificados en el genoma de la bacteria *E. faecalis* OG1RF (Figura 1). Esta lista está constituida por una biblioteca interna disponible en el laboratorio donde se está realizando la tesis obtenida mediante análisis de ARNseq y los 230 ARNnc declarados previamente en la literatura [35]. Para el total de los 585 ARNnc se identificaron 1804 posibles blancos post transcripcionales, todos ellos con una energía libre combinada de interacción entre -70,00 a -10,00 (Kcal). Del total de interacciones, 517 ocurren en *cis* y 1291 en *trans*, siendo en estos últimos donde se observa el mayor número de interacciones combinadas, lo que supone que este mecanismo podría establecer una regulación múltiple por diversos ARNnc hacia un mismo blanco transcripcional. Se encontraron 1115 posibles genes blancos de regulación transcripcional, correspondiendo aproximadamente al 35,7 % de los genes de la bacteria. En adición, del total de las interacciones en la mayoría de los casos existe un posicionamiento intergénico del ARNnc dentro de un operón, donde gran porción de su secuencia se encuentra codificada en forma anti-sentido con respecto a un gen, interactuando en *cis* con este y en *trans* con los genes adyacentes del mismo operón.

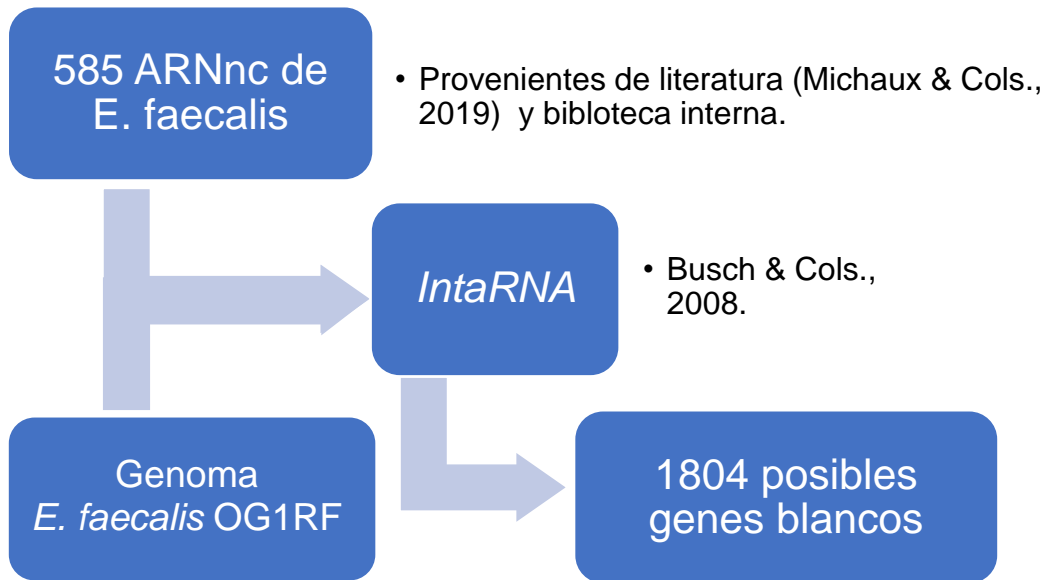


Figura 1. Diagrama de flujo para la identificación de posibles genes blancos.

El esquema muestra los tres grandes componentes en el proceso de identificación, como entrada se utilizaron la secuencia de 585 ARNnc de *E. faecalis* y mediante el programa *IntaRNA*, se lograron identificar diversos 1804 posibles genes blancos.



Clasificación y selección de ARNnc en base a su conservación y posible participación en la respuesta a Cu en *E. faecalis*.

Actualización proteínas de homeostasis de Cu en *E. faecalis*.

Entendiendo que, de preferencia se pretende buscar ARNnc los cuales podrían estar regulando transcritos relacionados con la respuesta a Cu y principalmente su homeostasis, se realizó una actualización del modelo de homeostasis de Cu en *E. faecalis* con el propósito de aumentar las posibilidades de encontrar ARNnc relacionados con el metal. Tal como se mencionó, el control del contenido intracelular del metal en esta bacteria radica principalmente en el operón *cop*. Para complementar este modelo, primero se realizó una búsqueda bibliográfica de proteínas de respuesta a Cu en bacterias (incluyendo *E. faecalis*). Se revisó la literatura existente desde mayo 2006 (fecha de la publicación del operón *cop* en *E. faecalis*) a mayo del 2021. Se encontraron 15 determinantes proteicos involucrados en homeostasis de Cu en otras bacterias, 4 de ellos presentes bacterias Gram positivas y 11 en Gram negativas (Tabla 3). Entre los componentes proteicos en bacterias Gram positivo, la mayoría corresponden a represores transcripcionales o ATPasas tipo P, es decir, componentes clásicos en la respuesta a Cu en bacterias. Mientras que, en Gram negativas, estos componentes son principalmente proteínas transportadoras de membrana externa o proteínas chaperonas ubicadas en la región intermembrana.

Para analizar si estas proteínas están codificadas en *E. faecalis*, se realizó un BLASTp como se describe en la sección de materiales. Los resultados indicaron



que 4 de estos nuevos componentes poseen homología con proteínas codificadas en *E. faecalis* OG1RF (Tabla 4 y Figura 2). El templado ID: QNN30008.1 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) presenta homología con un transportador ABC (EF3106), mientras que los templados con ID: AIE75512.1 (*Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC6714); 5ICQ_A (*Methylocystis parvus* OBBP) y AIE74304.1 (*Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC6714), presentan homología con una misma ATPasa tipo P (EF0875). Interesantemente, esta posible proteína de eflujo no está codificada en el operón *cop*. En relación con otras proteínas tipo Cop, esta nueva ATPasa presenta una alta homología de secuencia con CopB de eflujo de *Enterococcus hirae*, encontrándose conservados motivos y dominios estructurales importantes (Figura 3) [44], [45], abriendo la posibilidad que esta proteína EF0875 sea una nueva ATPasa CopB-like funcional en *E. faecalis* no descrita hasta la fecha.



Tabla 3. Proteínas de homeostasis de Cu en otras bacterias. Resultados de la búsqueda bibliográfica de proteínas participantes en homeostasis de Cu en bacterias.

| ID | Especie | Gram | Anotación | Gen | Ref. |
|------------|---|------|-----------|-------------|------|
| AIE75512.1 | <i>Cyanobacterium Synechocystis</i> sp. PCC 6714 | - | CtaA | - | [15] |
| AIE74304.1 | <i>Cyanobacterium Synechocystis</i> sp. PCC 6714 | - | PacS | <i>pacs</i> | [15] |
| CAB56052.1 | <i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155 | + | MspA | <i>mspA</i> | [15] |
| AAA25906.1 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> | - | NosA | <i>nosA</i> | [15] |
| 2ZFG | <i>Escherichia coli</i> | - | OmpF | <i>ompF</i> | [15] |
| 3WDO_A | <i>Escherichia coli</i> | - | YajR | <i>yajR</i> | [15] |
| AAA69173.1 | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 | - | ExbB | <i>exbB</i> | [15] |
| AAA69172.1 | <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 | - | ExbD | <i>exbD</i> | [15] |
| 5ICQ_A | <i>Methylocystis parvus</i> OBBP | - | MbnE | <i>mbnE</i> | [15] |
| ACN32294.1 | <i>Escherichia coli</i> | - | TolC | <i>tolC</i> | [15] |
| 2XJH_B | <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b | - | Mbn | <i>mbn</i> | [15] |
| BAA09027.1 | <i>Bacillus subtilis</i> | + | YcnK | <i>ycnK</i> | [8] |
| O07434.1 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv | + | RicR | <i>ricR</i> | [8] |
| QNN30008.1 | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | + | PfeT | <i>pfeT</i> | [46] |



Tabla 4. Nuevos posibles candidatos de homeostasis de Cu en *E. faecalis*.

Resultados de BLASTp de la búsqueda de nuevas proteínas participantes en homeostasis de Cu en otras bacterias. Todos los valores presentados superan el filtro de corte.

| Gen | Identidad (%) | E-value | Cobertura (%) | ID <i>E. faecalis</i> | Anotación <i>E. faecalis</i> |
|-------------|----------------------|----------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <i>ctaA</i> | 34 | 6E-111 | 85 | AAO80684.1 | EF0875 |
| <i>pfeT</i> | 40 | 6E-151 | 87 | AAO80684.1 | EF0875 |
| <i>mbnE</i> | 23.6 | 1E-08 | 60 | WP_002378964.1 | EF3106 |
| <i>pacS</i> | 37 | 1E-134 | 84 | AAO80684.1 | EF0875 |

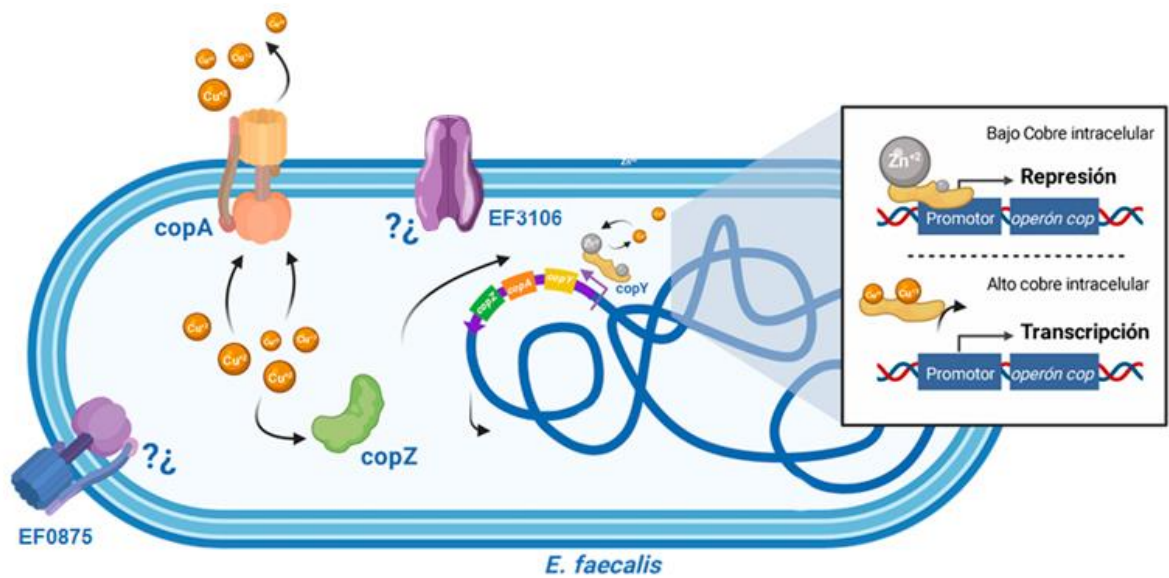


Figura 2. Actualización del modelo de homeostasis de Cu en *E. faecalis* OG1RF. El presente modelo incorpora los posibles nuevos componentes en respuesta a Cu, correspondiendo el gen EF0875 a una ATPasa de tipo P y el gen EF3106 a un transportador ABC.

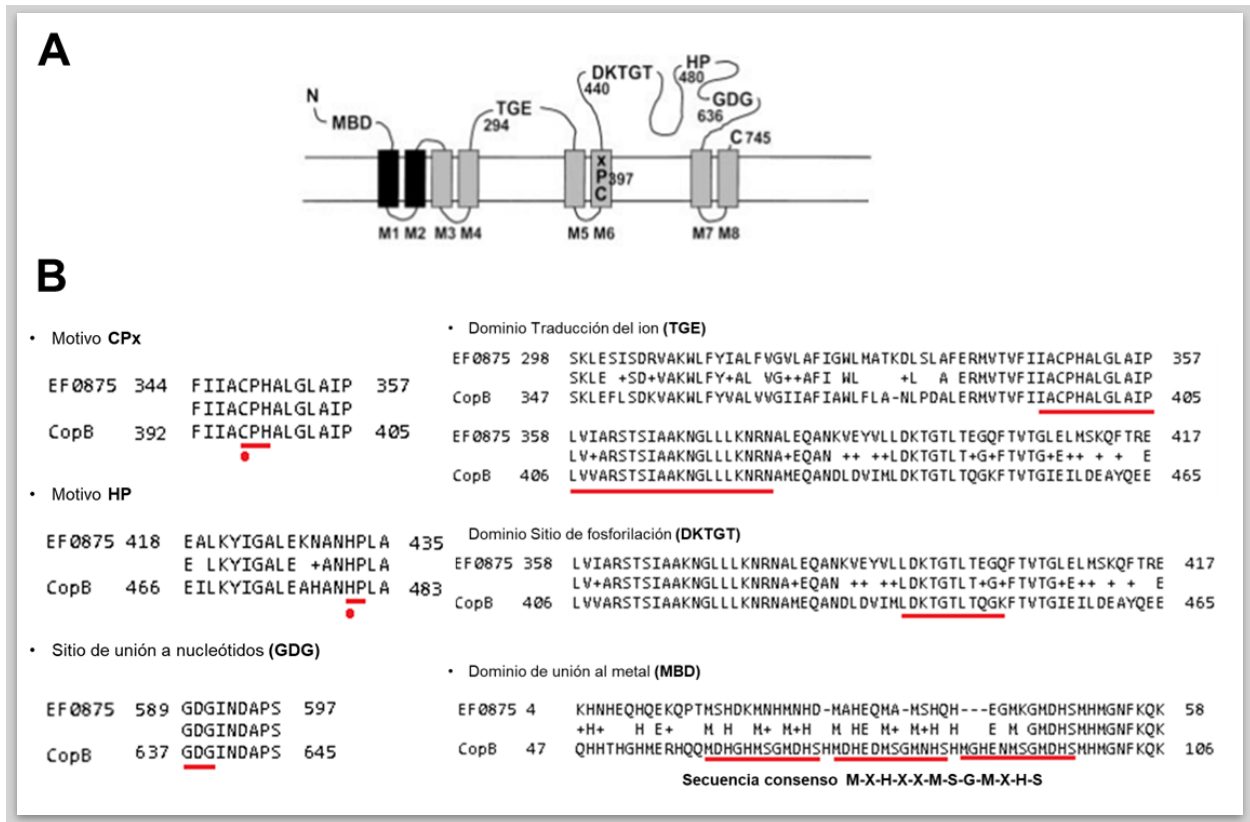


Figura 3. Alineamiento secuencias proteicas entre CopB y EF0875.

Alineamiento entre CopB de *E. hirae* (ID: WP_113842244.1) y una ATPasa tipo P de *E. faecalis* codificada por el gen EF0875 (ID: AAO80684.1). **(A)**. Esquema estructural de CopB indicando zonas de importancia estructural, imagen adaptada [44]. **(B)**. alineamiento de secuencias proteicas en motivos y dominios estructurales y funcionales importantes. Subrayado rojo indica porción de secuencias de interés; círculo rojo indica aminoácidos funcionales esenciales; y, (+) aminoácidos similares al comparar secuencias alineadas.



Selección de ARNnc posiblemente vinculados a la respuesta a Cu de *E. faecalis*.

La actualización del modelo de homeostasis de Cu (Figura 2 y Tabla 4) junto a datos publicados de genes en respuesta a este metal [9], se utilizaron como primer filtro de selección para reducir los 1804 posibles blancos transcripcionales de ARNnc identificados anteriormente y así obtener ARNnc vinculados a la respuesta a Cu de *E. faecalis*. Como resultado de este cruce, se obtuvieron 8 ARNnc (Tabla 5). Todos los genes blancos identificados se expresan diferencialmente ante una exposición a Cu y codifican tanto para proteínas involucradas en homeostasis como proteínas de interés de respuesta a este metal.



Tabla 5. Selección de ARNnc en base a función de su blanco. ARNnc de interés a estudiar, tras aplicar el primer filtro de selección a los genes blancos identificados, correspondiente a genes involucrados en homeostasis de Cu y también genes en respuesta a este metal. La columna Exp, corresponde a la expresión diferencial de los genes ante una exposición a 0,5 mM de CuSO₄, expresada como veces de cambios con respecto a la condición basal [9].

| ARNnc | GenID | Exp | Nombre | Función |
|----------------|--------------|------------|---------------|------------------------------------|
| ARNnc_1490 | EF0297 | 6,99 | <i>copY</i> | represor transcripcional CopY |
| ARNnc_4896 | EF0875 | -1,23 | - | p-ATPasa translocadora de Cu |
| ARNnc_1666 | EF0298 | 6,27 | <i>copA</i> | p-ATPasa translocadora de Cu, CopA |
| ARNnc_6450 | EF0076 | -1,11 | - | Oxidoreductasa |
| sRNA_069_5_UTR | EF1264 | 1,23 | - | Sulfatasa |
| ARNnc_755 | EF0463 | 1,18 | <i>sodA</i> | superóxido dismutasa (Mn) |
| ARNnc_1959 | EF0988 | 3,54 | - | proteína hipotética |
| ARNnc_5819 | EF2925 | 3,31 | - | Proteína de respuesta al frío |



Grado de conservación de ARNnc de interés entre las especies del orden *Lactobacillales*.

Tomando en consideración la elevada conservación del operón *cop* en todo el orden *Lactobacillales*, incluyendo el regulador transcripcional CopY [16], el siguiente paso fue analizar la conservación de los 8 posibles ARNnc candidatos dentro del orden. Para esto, mediante la herramienta BLASTn se rastreó la secuencia de cada uno de los ARNnc en el genoma de 15 especies del orden *Lactobacillales*. En base a literatura [42], se modificaron los criterios por defecto del BLASTn, ampliando los márgenes y puntos de corte dado la baja conservación en general que presentan los ARNnc entre las bacterias. Al disminuir desde 28 (por defecto) a 6 el parámetro del largo de palabra (*wordsize*), se logró obtener posibles homólogos de los ARNnc de *E. faecalis* en otras especies del orden *Lactobacillales* (Tabla 6).

De los resultados obtenidos (Tabla 7), se destaca al ARNnc código ARNnc_755, quien posee la mayor cantidad de posibles homólogos en distintas especies del orden *Lactobacillales*, encontrándose en 11 de las 15 especies analizadas, seguido de esto, se encuentra el ARNnc código ARNnc_5819 con posibles homólogos en 8 especies del total analizadas. Por el contrario, los ARNnc con una menor conservación dentro de las otras especies del orden *Lactobacillales*, corresponden a los ARN de código sRNA_069_05_UTR y ARNnc_1959.

Basado en los resultados obtenidos, se describe una tendencia de alta conservación entre *E. faecalis* y las especies *E. hirae* y *E. faecium* con respecto al



total de las 15 especies analizadas del orden *Lactobacillales*, lo cual era de esperarse dado que todas estas bacterias además comparten el mismo género [10].



Tabla 6. Conservación de ARNnc en el orden *Lactobacillale*. Resumen de los principales resultados de Blastn de secuencias homologas en bacterias del orden *Lactobacillale*. Todos los valores presentados superan el filtro de corte presentado en la sección de materiales y métodos

| ARNnc | Especie | Cobertura (%) | Identidad (%) | E-value |
|----------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| ARNnc_755 | <i>E. faecium ATCC8459</i> | 95 | 79 | 7,50E-116 |
| ARNnc_5819 | <i>E. hirae ATCC9790</i> | 87 | 83,7 | 6,40E-64 |
| sRNA_069_5_UTR | <i>L. lactis Il1403</i> | 91 | 77,8 | 1,30E-05 |
| ARNnc_1959 | <i>E. faecium ATCC8459</i> | 87 | 75,6 | 6,40E-88 |



Tabla 7. Conservación de ARNnc en el orden *Lactobacillale*. Resultados de Blastn de secuencias homologas en bacterias del orden *Lactobacillale*. Todos los valores presentados superan el filtro de corte presentado en la sección de materiales y métodos.

| ARNnc | Especie | Cobertura (%) | Identidad (%) | E-value |
|----------------------------|-------------------------------|---------------|---------------|-----------|
| ARNnc_755 | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 91 | 83,3 | 1,50E-152 |
| | <i>L. subsp lactis</i> II1403 | 93 | 72,5 | 8,30E-41 |
| | <i>S. pyogenes</i> M1GAS | 93 | 70,6 | 6,60E-22 |
| | <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 | 84 | 71,7 | 1,40E-28 |
| | <i>S. pneumoniae</i> R6 | 84 | 71,5 | 6,60E-27 |
| | <i>S. pyogenes</i> MGAS8232 | 93 | 70,2 | 1,40E-18 |
| | <i>S. pyogenes</i> MGAS315 | 80 | 72,6 | 5,20E-13 |
| | <i>S. agalactiae</i> 2603V R | 66 | 75,2 | 4,00E-09 |
| | <i>S. agalactiae</i> NEM316 | 66 | 76,4 | 1,10E-34 |
| | <i>S. pyogenes</i> SSI-1 | 75 | 75,9 | 1,10E-19 |
| | <i>E. faecium</i> ATCC8459 | 95 | 79 | 7,50E-116 |
| ARNnc_5819 | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 87 | 83,7 | 6,40E-64 |
| | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 87 | 85,6 | 8,40E-48 |
| | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 87 | 83,9 | 3,10E-42 |
| | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 87 | 83,1 | 1,40E-40 |
| | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 87 | 82,7 | 1,40E-40 |
| | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 87 | 81,9 | 1,40E-35 |
| | <i>E. hirae</i> ATCC9790 | 87 | 77,8 | 3,10E-22 |
| | <i>L. lactis</i> II1403 | 77 | 79,1 | 6,70E-34 |
| | <i>L. lactis</i> II1403 | 77 | 77,8 | 6,80E-24 |
| | <i>S. pyogenes</i> MGAS315 | 66 | 79,1 | 6,70E-29 |
| | <i>S. agalactiae</i> 2603VR | 62 | 78,8 | 1,10E-26 |
| | <i>S. agalactiae</i> NEM316 | 66 | 78,8 | 1,10E-26 |
| | <i>L. plantarum</i> WCFS1 | 67 | 81 | 3,10E-37 |
| | <i>L. plantarum</i> WCFS1 | 67 | 78,5 | 1,50E-25 |
| | <i>L. plantarum</i> WCFS1 | 67 | 75,9 | 2,50E-18 |
| | <i>S. pyogenes</i> SSI-1 | 66 | 79,1 | 6,70E-29 |
| <i>E. faecium</i> ATCC8459 | 73 | 87 | 2,30E-63 | |



E. faecium ATCC8459 73 84,4 8,50E-43
E. faecium ATCC8459 73 86,3 3,10E-42
 Continuación Tabla 7.

E. faecium ATCC8459 73 81,6 1,40E-35
E. faecium ATCC8459 73 77,3 3,20E-17

sRNA_069_5_UTR

E. faecium ATCC8459 72 88,4 1,30E-15
E. hirae ATCC9790 85 86,4 2,80E-12
L. lactis Il1403 91 77,8 1,30E-05

ARNinc_1959

E. faecium ATCC8459 87 75,6 6,40E-88
E. hirae ATCC9790 83 73,2 4,00E-60



Selección final de ARNnc a cuantificar.

La selección de ARNnc a estudiar, se realizó a partir de la clasificación de los genes blancos identificados en la sección de resultados, usando como criterio la participación de las proteínas codificadas en estos genes blancos en la respuesta a Cu de *E. faecalis*. Este primer criterio utilizado, se compone de dos subcriterios: I) genes codificantes para proteínas participantes en homeostasis de Cu y II) genes expresados diferencialmente ante una exposición Cu [9].

La utilización de estos criterios permitió obtener como resultado 8 ARNnc posiblemente regulando ARNm que codifican para proteínas vinculadas a la respuesta a Cu de *E. faecalis* (Tabla 5). Posteriormente, a estos 8 ARNnc seleccionados preliminarmente, les aplicamos un segundo criterio de selección correspondiente a su conservación dentro del orden *Lactobacillales*, encontrando conservados solo los ARNnc_755, ARNnc_5819, sRNA_069_5_UTR y ARNnc_1959 (tabla 6).

De los ARNnc conservados se seleccionaron para estudiar los sRNA_069_5_UTR y ARNnc_1959, aun cuando ambas moléculas poseen menos homólogos en especies del orden *Lactobacillales* (Tabla 7). Esta selección se basó en la priorización otras características por sobre la conservación, siendo para el sRNA_069_5_UTR la característica de ser el único ARNnc de tamaño pequeño (94 nucleótidos), que además regularía a EF1264, gen codificante para una sulfatasa que podría utilizar Cu como cofactor. A su vez, para la elección de ARNnc_1959 priorizamos la posible regulación de EF0988, gen codificando una proteína



hipotética, permitiendo una mayor proyección a nuevos componentes participantes en respuesta a Cu en *E. faecalis*. Por otra parte, tomando en cuenta la importancia del operón *cop* como primera respuesta ante un exceso de Cu, incorporamos dos ARNnc (ARNnc_1490 y ARNnc_1666) que podrían regular tanto a los genes EF0297 y EF0298 que codifican para el represor transcripcional CopY y la principal ATPasa tipo P de eflujo de Cu, CopA; respectivamente.

Los criterios de clasificación anteriormente expuestos nos permitieron disminuir el universo de candidatos desde 585 a 4 ARNnc que podrían estar relacionados con la respuesta a Cu en *E. faecalis*. (Tabla 8 y Figura 4). Esta lista final se constituye por 4 ARNnc (3 trans y 1 cis) y 4 posibles blancos transcripcionales. Los ARNnc seleccionados a estudiar corresponden a: ARNnc_1490 (423 nucleótidos), ARNnc_1666 (823 nucleótidos), ARNnc_1959 (870 nucleótidos) y sRNA_069_5_UTR (94 nucleótidos).



Tabla 8. Selección final de ARNnc y sus posibles blancos transcripcionales.

La siguiente tabla muestra los ARNnc de interés a estudiar. Exp, corresponde a la expresión diferencial de los genes ante una exposición a 0,5 mM de CuSO₄, expresada como veces de cambios con respecto a la condición basal [9].

| ARNnc | GenID | Exp | Nombre | Función |
|----------------|--------------|------------|---------------|------------------------------------|
| ARNnc_1490 | EF0297 | 6,99 | <i>copY</i> | represor transcripcional CopY |
| ARNnc_1666 | EF0298 | 6,27 | <i>copA</i> | p-ATPasa translocadora de Cu, CopA |
| sRNA_069_5_UTR | EF1264 | 1,23 | - | Sulfatasa |
| ARNnc_1959 | EF0988 | 3,54 | - | proteína hipotética |

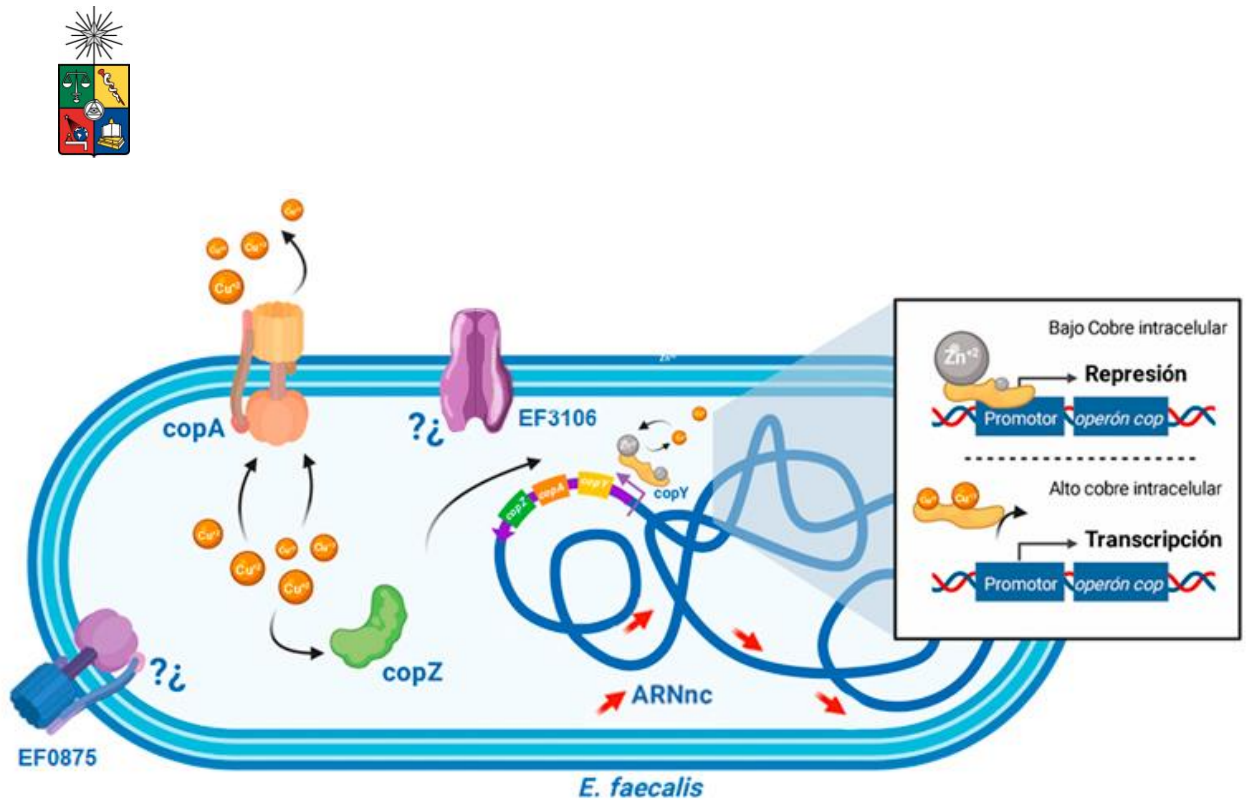


Figura 4. Modelo de *E. faecalis* en respuesta a Cu. El presente modelo incorpora los posibles nuevos componentes en respuesta a Cu, correspondiendo el gen EF0875 a una ATPasa de tipo P y el gen EF3106 a un trasportador ABC y ARNnc (Tabla 8).



Caracterización de ARNnc de interés en respuesta a Cu.

Crecimiento bacteriano bajo exceso de Cu.

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de *E. faecalis* OG1RF en el tiempo a diferentes concentraciones de CuSO_4 en el medio de cultivo. Basados en los resultados obtenidos en experimentos descritos de trabajos anteriores [9], [11], [13], se utilizaron cuatro concentraciones de Cu, basal (cercana a $2 \mu\text{M}$ propio del medio N utilizado), y 0,1 mM, 0,5 mM, 1,5 mM y 2,5 mM de CuSO_4 . Como se muestra en la Figura 5, la curva de crecimiento presenta una forma sigmoidea típica, en la cual es posible distinguir claramente todas las etapas del crecimiento bacteriano. La comparación entre las curvas, indica una disminución en la pendiente en la fase exponencial (entre 3 y 5 h), lo que se refleja en un aumento significativo y progresivo del tiempo generacional (Tabla 9), calculado en estas condiciones en comparación a la curva generada a una concentración basal de Cu. Previamente se había identificado que la cepa silvestre de *E. faecalis* crecida en un medio suplementado con 1 y 3 mM de CuSO_4 [9], aumenta significativamente su tiempo generacional en comparación al crecimiento en medio basal, evidenciando la sensibilidad en la viabilidad que presenta la bacteria frente a la exposición al metal, reafirmando los resultados mostrados en la Figura 5.

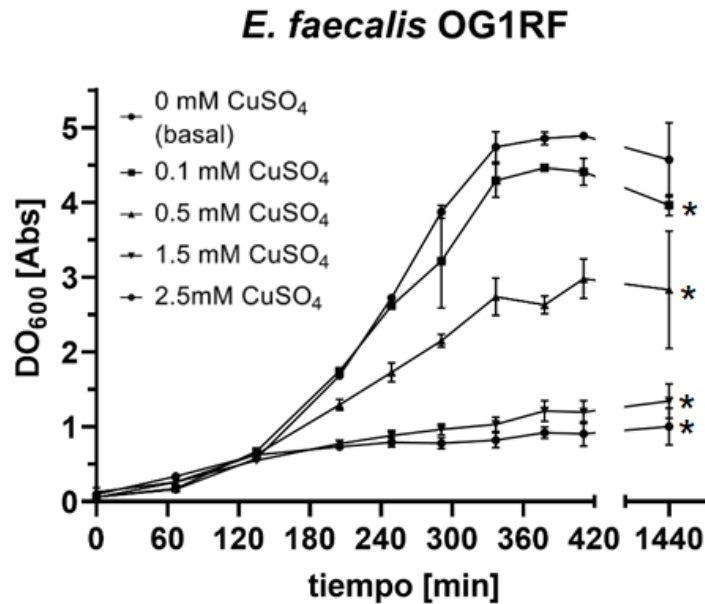


Figura 5. Efecto de la exposición a Cu sobre el crecimiento de *E. faecalis* OG1RF. El gráfico representa la curva de crecimiento de *E. faecalis* OG1RF expuestas a diferentes concentraciones de Cu (basal, tratamientos con 0,1 mM, 0,5 mM, 1,5 mM y 2,5 mM de Cu). Cada punto representa el valor promedio obtenido por absorbancia ($DO_{600 \text{ nm}}$) de tres réplicas biológicas, las barras de error corresponden a la desviación estándar. Asteriscos, indican significancia con respecto a condición basal, ANOVA test $p < 0,05$.



Tabla 9. Tiempo generacional para *E. faecalis* OG1RF expuesta a diferentes concentraciones de Cu. Los datos para los cálculos de los tiempos generacionales corresponden a los tiempos 3 y 5 h de cada curva de crecimiento de la Figura 5. Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas con su respectiva desviación estándar, asteriscos indican significancia con respecto a condición basal, ANOVA test $p < 0,05$.

| Suplementación de CuSO₄ (mM) | Tiempo generacional [min] |
|--|----------------------------------|
| 0 (basal) | 45,21 ± 0,45 |
| 0,1 | 50,80 ± 1,20 |
| 0,5 | 67,33 ± 1,61 * |
| 1,5 | 141,76 ± 7,45 * |
| 2,5 | 309,41 ± 32,96 * |



Resultados de medición de concentración intracelular de Cu por TRXF.

Posteriormente, se determinó el contenido intracelular de Cu, el cual definimos operacionalmente como la cantidad de Cu medido en el sobrenadante generado por centrifugación de células lisadas. Al comparar el contenido entre la condición basal y las condiciones de exposición de Cu, se observa un aumento en la acumulación de Cu intracelular concordante a las concentraciones de CuSO_4 crecientes expuestas, en detalle, la acumulación de Cu aumenta 4 y 9 veces para la condición de 0,1 mM de CuSO_4 y 0,5 mM CuSO_4 respectivamente, ambas en relación con la condición basal (Figura 6), resultados que también se corresponden con datos publicados anteriormente para este mismo ensayo [9].

Estos resultados reafirman que una exposición a una concentración elevada induce un aumento en el contenido intracelular del metal. Considerando que, en la presente tesis vamos a estudiar un estado de homeostasis, descartamos concentraciones de Cu que generen letalidad, pero que sí generen un aumento intracelular del metal estadísticamente significativo. Por tal razón, se seleccionó 0.5 mM de CuSO_4 a las 3 h como el punto para realizar los estudios posteriores de expresión génica.

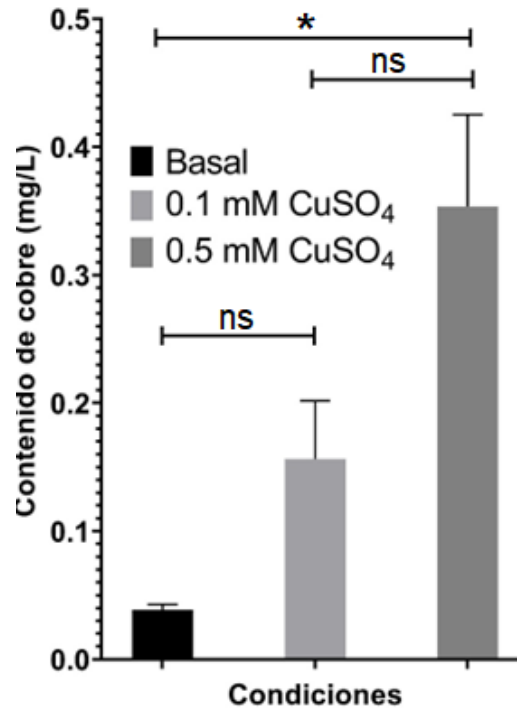


Figura 6. Contenido intracelular de Cu en *E. faecalis* OG1RF expuestas a Cu.

El grafico muestra la acumulaci3n de Cu de *E. faecalis* OG1RF expuestas a 0 mM de CuSO₄ (barras negras), 0,1 mM de CuSO₄ (barra gris claro) y 0,5 mM de CuSO₄ (barra gris oscuro) medida en tres r3plicas biol3gicas con dos r3plicas t3cnicas de medici3n. Asterisco corresponde a diferencias significativas entre la condici3n basal (barra negra) y el tratamiento, las letras ns da cuenta de diferencias no significativas. ANOVA test $p < 0,05$.



Determinación de la abundancia de transcritos de ARNnc en cultivos de *E. faecalis* expuestos a exceso de Cu.

Extracción de ARN y retro transcripción específica.

Definidas las condiciones experimentales en la sección anterior, se generaron 2 conjuntos de muestras de ARN provenientes de 6 cultivos de *E. faecalis*, 3 de ellos suplementados con 0.5 mM de CuSO_4 por 3 h y 3 de ellos crecidos en ausencia de suplementación por 3 h (condición exceso y basal, respectivamente). Posterior a la extracción, en cada muestra se determinaron las razones de absorbancia 260/280 nm y 260/240 nm. Como resultado en las dos muestras analizadas, la absorbancia para los cocientes 260/280 nm fluctuó entre 2,21 y 2,18; y para el cociente 260/240 nm, los valores se encontraron entre 2,39 y 1,9 (Tabla10), valores dentro de los rangos esperados de un ARN de alta calidad para poder ser usado en ensayos de expresión.

Posteriormente, teniendo cuantificadas las muestras de ARN se procedió a la síntesis de ADNc específico de hebra simple, obteniendo 8 muestras distintas (4 por condición). Al medir las razones de absorbancia los rangos fluctúan entre 1,62 y 1,70 para el cociente 260/280 nm y para el cociente 260/240 nm los valores oscilan entre 1,87 y 2,04, tanto para los ADNc sintetizados a partir de ARN extraído desde cultivos en una condición basal (tabla 10), como para los provenientes desde una condición de exceso de Cu (tabla 10), estos valores obtenidos permiten sugerir la existencia de ADN libre de contaminación por agentes orgánicos en cada una de las muestras obtenidas.



En relación con las concentraciones obtenidas de ADNc, al ser una síntesis específica podemos inferir que esta cuantificación de ADN representa los niveles de ARNm de la molécula interés, por tanto, es posible declarar la presencia de ARNc (Tabla 10).



Tabla 10. Extracción de ARN y retro transcripción específica. La tabla muestra las concentraciones y razones de absorbancia obtenidas para cada una de las muestras (ARN extraído y ADNc sintetizado) de cultivos en triplicado de *E. faecalis* OG1RF sin suplementación de Cu (basal) y con suplementación de 0.5 mM CuSO₄ (exceso). Las concentraciones de ADNc se expresan normalizadas con relación a la cantidad ADNc 16s en cada condición. Todos los valores informados corresponden al promedio de 3 réplicas técnicas con su respectiva desviación estándar.

| Condición | Muestra | Concentración (ng/uL) | A260/A280 | A260/A230 |
|------------------|----------------|------------------------------|------------------|------------------|
| Basal | ARN | 1550,47±24,45 | 2,21±0,19 | 2,39±0,12 |
| Basal | ADNc_1959 | 0,78±0,03 | 1,69±0,09 | 1,91±0,04 |
| Basal | ADNc_1490 | 0,75±0,03 | 1,62±0,13 | 1,90±0,10 |
| Basal | ADNc_1666 | 0,97±0,001 | 1,68±0,10 | 1,98±0,07 |
| Basal | ADNc_069_5UTR | 0,99±0,07 | 1,70±0,05 | 2,04±0,05 |
| Basal | ADNc_16s | 1±0 | 1,70±0,11 | 2,03±0,12 |
| Exceso | ARN | 1600,55±16,78 | 2,18±0,16 | 1,95±0,09 |
| Exceso | ADNc_1959 | 0,94±0,03 | 1,72±0,10 | 1,96±0,13 |
| Exceso | ADNc_1490 | 0,69±0,02 | 1,62±0,09 | 1,87±0,15 |
| Exceso | ADNc_1666 | 1,04±0,001 | 1,63±0,02 | 1,88±0,04 |
| Exceso | ADNc_069_5UTR | 0,85±0,01 | 1,68±0,08 | 1,97±0,09 |
| Exceso | ADNc_16s | 1±0 | 1,65±0,11 | 1,90±0,14 |



Cuantificación de la expresión diferencial de los ARNnc.

Con el fin de identificar posibles cambios en las abundancias transcripcionales de los ARNnc en las diferentes condiciones de estudio, las muestras de ADNc anteriormente mencionadas se analizaron mediante qPCR utilizando en base a literatura, el gen 16S como normalizador [40].

Los datos obtenidos por qPCR se procesaron utilizando el método 2 delta-delta Ct [43]. La Figura 7 presenta la cuantificación relativa expresada en veces de cambio de la abundancia transcripcional de los ARNnc frente a un exceso de Cu con respecto a la condición basal, normalizada en relación con la abundancia transcripcional del gen 16S entre ambas condiciones. En todos los casos, los datos evidencian la existencia de diferencias en la abundancia transcripcional, aumentando aproximadamente 8 y 4 veces la abundancia de los ARNnc ARNnc_1959 y ARNnc_069_5_UTR producto de la suplementación con Cu. En contraposición, detectamos que el ncRNA_1490 disminuye a la mitad su expresión en respuesta a Cu. Con relación al ARNnc_1666, informamos que no detectamos la presencia del ARN aun cuando se sintetizó ADNc, esto debido a un problema en inicial en el diseño de los partidos o que las cantidades del ARNnc no son suficientes para realizar la retrotranscripción.

Por último, estos resultados indican que *E. faecalis* responde transcripcionalmente a nivel de sus ARNnc frente a la exposición a Cu, los cuales además podrían estar controlando la abundancia de ARNm vinculados a la homeostasis del metal.

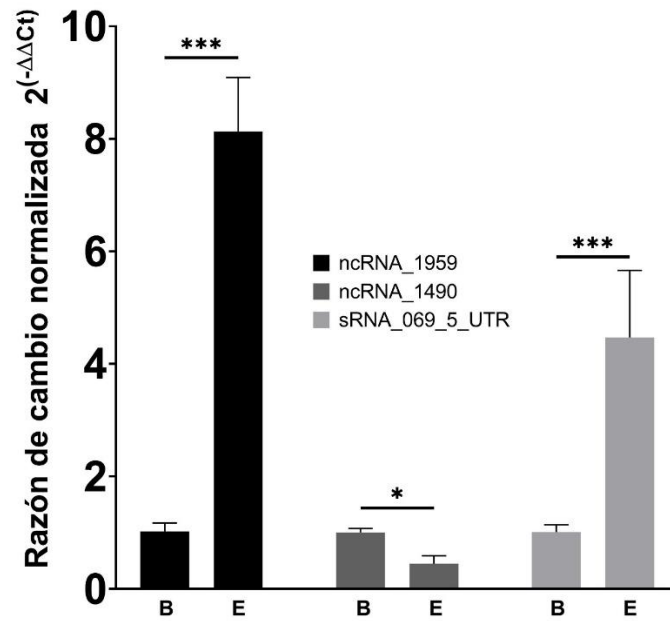


Figura 7. Abundancia relativa de los transcritos de ARNnc en estudio cuantificados mediante qPCR. El gráfico muestra la razón de abundancia relativa al normalizador 16S entre las muestras en condición basal (**B**) y tratamiento con suplementación de 0,5 mM de CuSO₄ (**E**) expresadas como veces de cambio. Los valores corresponden al promedio de tres mediciones (3 réplicas técnicas). Asteriscos indican grado de significancia con respecto a condición basal.



Discusión

Debido a la importancia del Cu para el correcto funcionamiento de diversos procesos metabólicos y, por el contrario, su efecto tóxico producto del desbalance en su concentración, las unidades biológicas han desarrollado diversos mecanismos encargados del control intracelular de la concentración de este metal. Con el propósito de entender el funcionamiento de estos mecanismos, es necesario identificar y caracterizar los reguladores involucrados en este proceso. Es en este contexto, la presente tesis indaga sobre la capacidad de respuesta de los ARNnc codificados en el genoma de *E. faecalis* frente a cambios en la disponibilidad del metal, explorando si existe alguna conexión entre esta respuesta transcripcional y su posible participación en la regulación de transcritos que codifican para proteínas de homeostasis de Cu. Tomando esto último en consideración, a continuación, se discutirán los diversos aspectos referentes a los resultados obtenidos que permitieron avanzar en responder las preguntas y objetivos planteados.



Nuevos componentes de homeostasis de Cu en *E. faecalis*.

Frente a concentraciones tóxicas de Cu, la mayoría de las bacterias utilizan mecanismos de defensa específicos inducidos por este metal [8]. Por tanto, entendiendo que dentro de las funciones de los ARNnc está modular la expresión génica en condiciones de estrés, nos planteamos la opción de participación de estas moléculas en la regulación de los mecanismos de defensa inducidos por este metal. Utilizando esto como criterio, además se podría clasificar y seleccionar ARNnc en base a la respuesta de sus blancos frente a un exceso de Cu.

Con este objetivo, para complementar y actualizar el modelo de homeostasis de Cu de *E. faecalis*, se realizó una búsqueda bibliográfica de nuevos componentes de homeostasis en bacterias, para luego mediante BLASTp se buscaron sus homólogos en el proteoma de *E. faecalis*. De los 14 nuevos componentes encontrados por bibliografía (Tabla 3), cuatro de ellos presentaron homología con proteínas de *E. faecalis* OG1RF (Tabla 4).

Entre ellos se destacan, el gen EF3106 (transportador ABC), el cual posee homología con la proteína periplasmática Gram negativa MbnE, participante de la captación de Cu a través de *chalkophores*, un análogo de los sideróforos de Fe, quienes al parecer coordinan directamente el metal y cuyo mecanismo aún no se encuentra del todo claro [47]. Esta relación entre transportadores ABC y homeostasis de Cu en bacterias Gram positivas no es nueva, de hecho, formarían parte de un tipo de captación de Cu no convencional dependiente de ligandos [48]. En esta



línea, en *Stretomyces thioluteus* se describió un trasportador ABC funcional participante de la captación de *chalkophore* de Cu [49]. Adicionalmente a este sistema se le ha vinculado e incluso acumulación intracelular de GSH en bacterias autotróficas, principal antioxidante natural, como es el caso de *Streptococcus pneumoniae* [50]. Así, el rol de este trasportador (EF3106) en *E. faecalis* podría estar vinculado al control de la homeostasis y los efectos tóxicos del metal [20], al respecto se necesitan más estudios para esclarecer su función, ya sea, dentro del importe de Cu como relacionados a la vía del GSH ante efectos nocivos por excesos de este metal.

Por su parte, el gen EF0875 (ATPasa tipo p) posee homología con 3 ATPasas relacionadas al eflujo de Cu en distintas bacterias, tales como la ATPasas tipo P_{1B} CtaA de *Synechocystis* PCC 6803 y PacS de *Cyanobacteria* [15], y de tipo P_{1B4} la ATPasa PfeT de *B. subtilis* quien presenta homología funcional con ATPasas tipo P_{1B} [46]. Al revisar literatura en *E. faecalis*, no se encontraron referencias que relacionen este gen o su correspondiente proteína con Cu, pero si se describe como una ATPasa que disminuye significativamente su expresión ante la exposición de a sales biliares [49], Tomando en cuenta que la expresión de este gen en exceso de Cu [9] (Tabla 5) disminuye, respuesta opuesta a la expresión del gen que codifica para CopA, la principal ATPasa de eflujo de Cu podríamos suponer que la función de esta ATPasa podría estar relacionada al transporte de otros iones.



Identificación de ARNnc y predicción de blancos regulatorios.

Uno de los objetivos del trabajo consistió en predecir interacciones de ARNnc-ARNm en el genoma de *E. faecalis* OG1RF, para esto, se utilizó como entrada o “*query*” para el programa IntaRNA, 585 secuencias de ARNnc identificados en la misma bacteria. Los datos obtenidos muestran 1804 interacciones, encontrándose 1115 posibles genes blancos de regulación transcripcional, correspondiendo aproximadamente al 35,7 % de los genes de la bacteria. En adición, del total de las interacciones predichas 1291 serían de tipo *trans* y 517 del tipo *cis* (Figura 1), lo cual supone en la mayoría de los casos un posicionamiento intergénico del ARNnc dentro de un operón, donde gran porción de su secuencia se encuentra codificada en forma anti-sentido con respecto a un gen, interactuando en *cis* con este y en *trans* con los genes adyacentes del mismo operón. Al analizar literatura, encontramos que la predominancia de interacciones *trans* en nuestros resultados difiere con lo publicado, puesto que se propone que las interacciones en *cis* dadas por ARNnc y *riboswitches* serían más abundantes en bacterias Gram positivas a causa de la ausencia de chaperonas de ARN globales conocidas como Hfq, CsrA o ProQ en los *Enterococcus* [51], no obstante dado la escasa literatura sobre el tema, no es posible establecer en este punto ningún comentario comparativo de forma definitiva.

Si bien, la predicción de blancos transcripcionales de ARNnc es posible mediante el uso de diversos algoritmos de búsqueda, dentro de estos IntaRNA se



posiciona dentro de los más utilizados para predecir posibles interacciones entre ARNnc-ARNm, tanto en bacteria [52] como en humanos [53], es recomendable utilizar además otros programas para complementar y ratificar los resultados. Por ejemplo, en *E. faecalis* V583 se encontraron otras 302 predicciones mediante el uso del programa sRNATarget, las cuales se sumaron a las predichas por el IntaRNA [51]. De la misma forma, se ha utilizado en conjunto al IntaRNA el programa CopraRNA para la predicción de ARN blancos en *E. faecalis* V583 y *E. faecium* AUS0004 [36]. En esta misma línea para otras bacterias, las predicciones por parte del IntaRNA también se han acompañado por otros algoritmos bioinformáticos tales como BLASTn [54], Fasta3 [55], RNAPredator [56], entre otros. En consideración a los tiempos de la tesis y dado los resultados obtenidos, no se incluyó un segundo programa de búsqueda, sin embargo, no descartamos para futuras investigaciones incluir otra herramienta para identificar nuevos blancos de los ARNnc en estudio.

El estudio de la conservación de los ARNnc viene dado por la creciente disponibilidad de secuencias genómicas completas que ha permitido realizar búsquedas in silico de ARNs en diferentes bacterias. En general, las búsquedas en todo el genoma de genes que codifican para ARNs incluyen muchas características, como secuencias intergénica conservadas, promotores, terminadores y regiones ricas en GC. Constantemente, se están desarrollando nuevos algoritmos para realizar búsquedas predictivas de ARNs en todo el genoma, sin embargo, herramientas para la predicción como análisis de conservación de ARNnc siguen siendo limitadas [57]. A pesar de este escenario, nuestro análisis de conservación y ajuste de criterios en



la búsqueda, de igual forma nos permitió proponer un conjunto de ARNnc conservados dentro del orden Lactobacillales, estrategia que, en conjunto con la selección por función de los blancos de los ARNnc, nos permitió acotar el número de elementos a estudiar.



Abundancia transcripcional de ARNnc en respuesta a cambios en la biodisponibilidad de Cu en *E. faecalis*.

Diversas evidencias experimentales muestran que genes que codifican para componentes involucrados, ya sea directamente en la homeostasis de Cu o que tienen relación con los efectos secundarios basados en la generación de estrés oxidativo, modifican su expresión en respuesta al metal [9], [12], [20], aumentando o disminuyendo la abundancia a nivel de su transcrito. En atención a esto, el diseño del protocolo experimental tuvo por objetivo observar el comportamiento transcripcional de los ARNnc identificados frente a un tratamiento de exposición a Cu. La concentración de exposición se seleccionó considerando una concentración fija máxima que no afectase la viabilidad celular, ya que la mortalidad producto de concentraciones tóxicas, induce respuestas transcripcionales que podrían distorsionar el efecto directo del metal. Estudios previos [9], [11], dan como resultado que concentraciones inferiores a 0,5 mM de CuSO₄ no afecta la velocidad de crecimiento de cultivos de *E. faecalis*, aun cuando aumenta considerablemente el contenido intracelular de este metal, en comparación a cultivos sin exposición. Siendo estos resultados, ratificados durante el desarrollo de la presente tesis sugiriendo *E. faecalis* como un modelo simple y robusto para futuros estudios de homeostasis o genes en respuesta a Cu.

Nuestros resultados indicaron que, en respuesta al exceso de Cu, los ARNnc_1959 y sRNA_069_5_UTR aumentan su abundancia transcripcional aproximadamente 8 y 4 veces, respectivamente; mientras que ARNnc_1490



disminuye a la mitad su abundancia transcripcional (Figura 7) bajo la misma exposición. Adicionalmente, pudimos observar correlaciones positivas entre el aumento de la abundancia transcripcional de ARNnc_1959 y sRNA_069_5_UTR con sus posibles blancos transcripcionales EF0988 y EF1264 respectivamente (Tabla 8) y, por el contrario, una correlación negativa en el caso del ARNnc_1490 y su blanco identificado, *copY* codificado en el operón *cop* de homeostasis de Cu. Estos resultados nos permitieron proponer una posible regulación positiva a nivel post transcripcional para los ARNnc_1959 y sRNA_069_5_UTR, los cuales eventualmente podrían estar estabilizando a sus blancos, por el contrario, considerando el hecho que el transcrito del operón *cop* se sintetiza como una sola unidad, el ARNnc_1490 podría estar inestabilizando al ARNm de todo el sistema de homeostasis de Cu, por lo tanto, su baja de expresión podría permitir una producción mayor de la ATPasa de CopA con el propósito de eliminar Cu de la célula.

Para profundizar en el punto de la regulación sobre el operón *cop*, tal como se ha mencionado los ARNnc regulan a nivel post transcripcional mediante la unión por complementariedad de bases con el ARNm, modulando la traducción y su estabilidad [58]. Uno de los mecanismos de regulación por parte de ARNnc descrito en *E. faecalis*, corresponde al sistema basado en dos ARNs (ARN I y ARN II), necesarios para la herencia estable del plásmido pAD1, los dos ARNs se transcriben convergentemente hacia un terminador intrínseco bidireccional. El ARN I codifica la toxina Fst, cuya traducción es inhibida por la interacción con el ARN II (sRNA),



promoviendo la degradación de ARNm [59]. Esta regulación negativa es el principal mecanismo por el que actúan los ARNnc (tanto en *cis* como *trans*), bloqueando la traducción y/o afectando la estabilidad del ARNm objetivo [60], induciendo la degradación del ARNm directa o indirectamente por parte de exoribonucleasa (PNPasa, ARNasa R, ARNasa) y endoribonucleasas (ARNasa III, ARNasa P y ARNasa Z), ambas altamente conservadas en bacterias Gram positivas. Adicionalmente, la abundancia transcripcional del regulador (ARNnc) es inversamente proporcional a la del ARNm blanco, misma situación ocurrida entre el ARNnc_1490 y ARNm del operón *cop*.

En relación con el posible funcionamiento de los ARNnc_1959 y sRNA_069_5_UTR, ante un traducción activa del ARNm, los sitios de clivaje reconocidos por ARNasa en la secuencia del ARNm no se exponen, existiendo una protección ante ARNasas por parte del ribosoma, aumentando la estabilidad del ARNm [61]. En este contexto, existiría a nivel fisiológico un modelo de competencia por el acceso a distintos sitios de unión en el ARNm, donde los sitios de unión a ribosoma promueven la estabilidad del ARNm y, por el contrario, el acceso a estos sitios de clivaje por parte de ARNasas disminuyen la estabilidad. Es en este contexto donde los ARNnc jugarían un rol clave modulando la estabilidad/degradación al interaccionar con sus ARNm objetivos. A raíz de los resultados obtenidos para ARNnc_1959 y sRNA_069_5_UTR, podríamos explicar la correlación positiva entre la abundancia transcripcional de los ARNnc y sus respectivos genes codificantes de ARNm objetivos, mediante un modelo donde el ARNnc al interaccionar con el ARNm



objetivo genere un cambio conformacional, liberando el sitio de unión al ribosoma o descubriendo un nuevo sitio de procesamiento que potencie la traducción.

Al revisar literatura, encontramos que este modelo no ha sido descrito en *E faecalis*, pero si en otras bacterias Gram positivas. En *Clostridium perfringens*, se describe un ARNnc de 386 nucleótidos, VR-RNA hibridando en el extremo 5' UTR del ARNm *colA*, codificante para una colagenasa. La interacción VR-RNA – *colA*, genera un sitio de escisión en el extremo 3' de *colA*, que una vez procesado genera una nueva conformación con el sitio RBS accesible, aumentando la estabilidad y vida media del ARNm [62]. Otro mecanismo similar fue descrito en *Staphylococcus aureus*, en esta bacteria esta codificado el ARNnc RNAIII, el cual actúa como un ARN regulatorio bifuncional, puesto que regula negativamente como también positivamente a diversos ARNm. Este molécula regulatoria estabiliza al ARNm *hla* por al interaccionar en su extremo 5' con la región 5 UTR del mensajero *hla*, en esta conformación se desestabiliza una estructura que atrapa la región RBS del ARNm, liberándola [63]. Otros modelos de estabilización de ARNm por parte de ARNnc, no relacionados a promover el acceso a la región RBS, corresponden al mecanismo de FasX de *Streptococcus pyogenes*. En este caso, el ARNnc estabiliza al ARNm *ska*, codificante para el factor de virulencia estreptoquinasa. FasX interacciona por complementariedad de bases con los primeros 9 nucleótidos de *ska*. En esta conformación no se exponen los sitios de clivaje reconocidos por la ARNasa J1 con actividad 5'-3' exoribonucleasa, puesto que esta ARNasa reconoce al menos 5 nucleótidos extendidos en el extremo 5' del ARNm [64]. En resumen, todos estos



mecanismos de regulación positiva podrían aplicar a la acción de los ARNnc_1959 y sRNA_069_5_UTR de *E. faecalis*, al respecto mayor estudios se requieren para la caracterización de estos ARNnc lo cual abre una nueva de investigación en el campo de la homeostasis de Cu para esta bacteria.

Finalmente, los experimentos planteados nos permitieron proponer nuevos componentes de la respuesta a Cu de *E. faecalis*. Identificando ARNnc expresados diferencialmente en respuesta al metal sugiriendo la acción de nuevos mecanismos de regulación para futuros estudios.



Conclusiones

Los protocolos bioinformáticos de búsqueda de componentes de homeostasis de Cu en bacteria permitieron realizar un incremento importante en el conocimiento de este proceso en *E. faecalis*, estrategia que eventualmente puede ser replicada para futuras actualizaciones del modelo.

Los resultados de expresión obtenidos para los ARNnc_1959, ARNnc_1490 y sRNA_069_5_UTR, proporciona por primera vez datos sobre la participación de elementos reguladores del tipo ARNnc en respuesta a Cu, tanto en *E. faecalis* como en otras bacterias.

En base a la predicción de los blancos transcripcionales para los ARNnc en estudio, es posible proponer que participan regulando transcritos involucrados en la homeostasis de Cu (operón *cop*) y el control sobre los efectos tóxicos el metal, como la generación de estrés oxidativo en *E. faecalis*.

Es necesario declarar que la función y regulación específica de los ARNnc estudiados dentro de este proceso, en particular, la validación experimental de la interacción con posibles blancos es una pregunta aun no resuelta y que ofrece mucha proyección a futuro.

Finalmente, la estrategia utilizada y los resultados obtenidos nos permitieron reafirmar el uso de *E. faecalis* como un modelo de estudio simple y robusto para estudiar la homeostasis de Cu, respuestas transcripcionales y la identificación de nuevos mecanismos de regulación vinculados al Cu.



Bibliografía

- [1] L. J. Stewart, D. Thaqi, B. Kobe, A. G. McEwan, K. J. Waldron, and K. Y. Djoko, "Handling of nutrient copper in the bacterial envelope," *Metallomics*, vol. 11, no. 1, pp. 50–63, 2019, doi: 10.1039/c8mt00218e.
- [2] Y. Yoshida, S. Furuta, and E. Niki, "Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1210, no. 1, pp. 81–88, 1993, doi: 10.1016/0005-2760(93)90052-B.
- [3] A. S. Steunou, M. Babot, M. Bourbon, R. Tambosi, A. Durand, S. Liotenberg, A. Krieger-Liszkay, Y. Yamaichi, S. Ouchane, "Additive effects of metal excess and superoxide, a highly toxic mixture in bacteria," *Microb. Biotechnol.*, vol. 13, no. 5, pp. 1515–1529, 2020, doi: 10.1111/1751-7915.13589.
- [4] P. F. Predki and B. Sarkar, "Effect of replacement of 'zinc finger' zinc on estrogen receptor DNA interactions.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 9, pp. 5842–5846, 1992, doi: 10.1016/S0021-9258(18)42630-0.
- [5] A. Giachino and K. J. Waldron, "Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways," *Mol. Microbiol.*, vol. 114, no. 3, pp. 377–390, 2020, doi: 10.1111/mmi.14522.
- [6] J. Arguello, D. Raimunda, and T. Padilla-Benavides, "Mechanisms of copper homeostasis in bacteria," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 3, 2013, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00073>



- [7] C. Andreini, I. Bertini, and A. Rosato, "A hint to search for metalloproteins in gene banks," *Bioinformatics*, vol. 20, no. 9, pp. 1373–1380, 2004, doi: 10.1093/bioinformatics/bth095.
- [8] C. Rademacher and B. Masepohl, "Copper-responsive gene regulation in bacteria," *Microbiology*, vol. 158, no. 10, pp. 2451–2464, 2012, doi: 10.1099/mic.0.058487-0.
- [9] A. Reyes-Jara, M. Latorre, G. López, A. Bourgoigne, B. E. Murray, V. Cambiazo and M. González, "Genome-wide transcriptome analysis of the adaptive response of *E. faecalis* to copper exposure," *BioMetals*, vol. 23, no. 6, pp. 1105–1112, 2010, doi: 10.1007/s10534-010-9356-7.
- [10] S. M. McBride, V. A. Fischetti, D. J. LeBlanc, R. C. M. Jr, and M. S. Gilmore, "Genetic Diversity among *E. faecalis*," *PLOS ONE*, vol. 2, no. 7, p. e582, 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000582.
- [11] M. Latorre, F. Olivares, A. Reyes-Jara, G. López, and M. González, "CutC is induced late during copper exposure and can modify intracellular copper content in *E. faecalis*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 406, no. 4, pp. 633–637, 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.109.
- [12] M. Latorre, M. Low, E. Gárate, A. Reyes-Jara, B. E. Murray, V. Cambiazo and M. González, "Interplay between copper and zinc homeostasis through the transcriptional regulator Zur in *E. faecalis*†," *Metallomics*, vol. 7, no. 7, pp. 1137–1145, 2015, doi: 10.1039/c5mt00043b.



- [13] A. S. Reyes-Jara, "E. faecalis un modelo para el estudio del manejo y regulación de Cu intracelular," 2007, <http://repositorio.conicyt.cl/handle/10533/179477>
- [14] M. Latorre, J. Galloway-Peña, J. H. Roh, M. Budinich, A. Reyes-Jara, B. E. Murray, A. Maass, M. González "E. faecalis reconfigures its transcriptional regulatory network activation at different copper levels†," *Metallomics*, vol. 6, no. 3, pp. 572–581, 2014, doi: 10.1039/c3mt00288h.
- [15] A. Andrei, Y. Öztürk, B. Khalfaoui-Hassani, J. Rauch, D. Marckmann, P.-I. Trasnea, F. Daldal and H.-G. Koch, "Cu Homeostasis in Bacteria: The Ins and Outs," *Membranes*, vol. 10, no. 9, Art. no. 9, 2020, doi: 10.3390/membranes10090242.
- [16] A. Reyes, A. Leiva, V. Cambiazo, M. A. Méndez, and M. González, "Cop-like operon: Structure and organization in species of the Lactobacillale order," *Biol. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 87–93, 2006, doi: 10.4067/S0716-97602006000100010.
- [17] M. Solioz and J. V. Stoyanov, "Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 27, no. 2–3, pp. 183–195, 2003, doi: 10.1016/S0168-6445(03)00053-6.
- [18] Z. H. Lu and M. Solioz, "Copper-induced Proteolysis of the CopZ Copper Chaperone of *Enterococcus hirae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 47822–47827, 2001, doi: 10.1074/jbc.M106218200.
- [19] Z. Huat Lu, C. T. Dameron, and M. Solioz, "The *Enterococcus hirae* paradigm of copper homeostasis: Copper chaperone turnover, interactions, and transactions," *Biometals*, vol. 16, no. 1, pp. 137–143, 2003, doi: 10.1023/A:1020709307589.



- [20] M. C. Abrantes, M. de F. Lopes, and J. Kok, "Impact of Manganese, Copper and Zinc Ions on the Transcriptome of the Nosocomial Pathogen *E. faecalis* V583," *PLOS ONE*, vol. 6, no. 10, p. e26519, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0026519.
- [21] M. Fabbri, L. Girnita, G. Varani, and G. A. Calin, "Decrypting noncoding RNA interactions, structures, and functional networks," *Genome Res.*, vol. 29, no. 9, pp. 1377–1388, 2019, doi: 10.1101/gr.247239.118.
- [22] T. Mizuno, M. Y. Chou, and M. Inouye, "A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA).," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 81, no. 7, pp. 1966–1970, 1984, doi: 10.1073/pnas.81.7.1966.
- [23] S. Brantl and R. Brückner, "Small regulatory RNAs from low-GC Gram-positive bacteria," *RNA Biol.*, vol. 11, no. 5, pp. 443–456, 2014, doi: 10.4161/rna.28036.
- [24] M. G. Jørgensen, J. S. Pettersen, and B. H. Kallipolitis, "sRNA-mediated control in bacteria: An increasing diversity of regulatory mechanisms," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*, vol. 1863, no. 5, p. 194504, 2020, doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194504.
- [25] N. Christopoulou and S. Granneman, "The role of RNA-binding proteins in mediating adaptive responses in Gram-positive bacteria," *FEBS J.*, vol. 289, no. 7, pp. 1746–1764, 2022, doi: 10.1111/febs.15810.
- [26] C. Michaux, C. Martini, S. A. Lecheheb, A. Budin-Verneuil, P. Cossette, M. Sanguinetti, A. Hartke, N. Verneuil and J.-C. Giard, "CspR, a Cold Shock RNA-



Binding Protein Involved in the Long-Term Survival and the Virulence of *E. faecalis*,”
J. Bacteriol., vol. 194, no. 24, pp. 6900–6908, 2012, doi: 10.1128/JB.01673-12.

[27] C. Michaux and J.-C. Giard, “New Insight into Cold Shock Proteins: RNA-binding Proteins Involved in Stress Response and Virulence,” in *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 873–880, 2016, doi: 10.1002/9781119004813.ch85.

[28] S. Gottesman and G. Storz, “Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 12, p. a003798, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a003798.

[29] A. Busch, A. S. Richter, and R. Backofen, “IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions,” *Bioinformatics*, vol. 24, no. 24, pp. 2849–2856, 2008, doi: 10.1093/bioinformatics/btn544.

[30] M. Mann, P. R. Wright, and R. Backofen, “IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA–RNA interactions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. W1, pp. W435–W439, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx279.

[31] S. DebRoy, P. Gao, D. A. Garsin, B. R. Harvey, V. Kos, I. F. Nes and M. Solheim, “Transcriptional and Post Transcriptional Control of Enterococcal Gene Regulation,” in *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190422/>



- [32] I. T. Paulsen, L. Banerjee, G. S. A. Hyers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T.D. Read, D.E. Fouts, J.A. Eisen, S.R. Gill, J.F. Heidelberg, H. Tettelin, R.J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R.T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay and C.M. Fraser, "Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *E. faecalis*," *Science*, vol. 299, no. 5615, pp. 2071–2074, 2003, doi: 10.1126/science.1080613.
- [33] T. Bae, B. Kozlowicz, and G. M. Dunny, "Two targets in pCF10 DNA for PrgX binding: their role in production of Qa and prgX mRNA and in regulation of pheromone-inducible conjugation" Edited by M. Gottesman," *J. Mol. Biol.*, vol. 315, no. 5, pp. 995–1007, 2002, doi: 10.1006/jmbi.2001.5294.
- [34] P. Gao, K. L. Pinkston, S. R. Nallapareddy, A. van Hoof, B. E. Murray, and B. R. Harvey, "*E. faecalis* rnjB Is Required for Pilin Gene Expression and Biofilm Formation," *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 20, pp. 5489–5498, 2010, doi: 10.1128/JB.00725-10.
- [35] K. Shioya, C. Michaux, C. Kuenne, N. Verneuil, A. Budin-Verneuil, T. Hartsch, A. Hartke and J.-C. Giard "Genome-Wide Identification of Small RNAs in the Opportunistic Pathogen *E. faecalis* V583," *PLOS ONE*, vol. 6, no. 9, p. e23948, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0023948.
- [36] C. Michaux, E. E. Hansen, L. Jenniches, M. Gerovac, L. Barquist, and J. Vogel, "Single-Nucleotide RNA Maps for the Two Major Nosocomial Pathogens *E. faecalis* and *Enterococcus faecium*," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 10, 2020, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600325>.



- [37] C. Michaux, A. Hartke, C. Martini, S. Reiss, D. Albrecht, A. Budin-Verneuil, M. Sanguinetti, S. Engelmann, T Hain, N. Verneuil and J.-C. Giard, “Involvement of *E. faecalis* Small RNAs in Stress Response and Virulence,” *Infect. Immun.*, vol. 82, no. 9, pp. 3599–3611, 2014, doi: 10.1128/IAI.01900-14.
- [38] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool,” *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [39] T. L. Madden, R. L. Tatusov, and J. Zhang, “[9] Applications of network BLAST server,” in *Methods in Enzymology*, vol. 266, Academic Press, pp. 131–141, 1996, doi: 10.1016/S0076-6879(96)66011-X.
- [40] S. Wu, Y. Liu, L. Lei, and H. Zhang, “Endogenous antisense *walR* RNA modulates biofilm organization and pathogenicity of *E. faecalis*,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–1, 2021, doi: 10.3892/etm.2020.9501.
- [41] J. Livny and M. K. Waldor, “Identification of small RNAs in diverse bacterial species,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 10, no. 2, pp. 96–101, 2007, doi: 10.1016/j.mib.2007.03.005.
- [42] S. Diederichs, “The four dimensions of noncoding RNA conservation,” *Trends Genet.*, vol. 30, no. 4, pp. 121–123, 2014, doi: 10.1016/j.tig.2014.01.004.
- [43] X. Rao, X. Huang, Z. Zhou, and X. Lin, “An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis,” *Biostat. Bioinforma. Biomath.*, vol. 3, no. 3, pp. 71–85, 2013, PMID: 25558171.



- [44] K.-D. Bissig, H. Wunderli-Ye, P. W. Duda, and M. Solioz, "Structure–function analysis of purified *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase: effect of Menkes/Wilson disease mutation homologues," *Biochem. J.*, vol. 357, no. 1, pp. 217–223, 2001, doi: 10.1042/bj3570217.
- [45] A. Odermatt, H. Suter, R. Krapf, and M. Solioz, "Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 17, pp. 12775–12779, 1993, doi: 10.1016/S0021-9258(18)31455-8.
- [46] G. Guan, A. Pinochet-Barros, A. Gaballa, S. J. Patel, J. M. Argüello, and J. D. Helmann, "PfeT, a P1B4-type ATPase, effluxes ferrous iron and protects *Bacillus subtilis* against iron intoxication," *Mol. Microbiol.*, vol. 98, no. 4, pp. 787–803, 2015, doi: 10.1111/mmi.13158.
- [47] G. E. Kenney and A. C. Rosenzweig, "Chalkophores," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 87, no. 1, pp. 645–676, 2018, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012300.
- [48] M. Solioz, "Copper Homeostasis in Gram-Positive Bacteria," in *Copper and Bacteria: Evolution, Homeostasis and Toxicity*, M. Solioz, Ed. Cham: Springer International Publishing, pp. 21–48, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-94439-5_3.
- [49] L. Wang, M. Zhu, Q. Zhang, X. Zhang, P. Yang, Z. Liu, Y. Deng, Y. Zhu, X. Huang, L. Han, S. Li, and J. He, "Diisonitrile Natural Product SF2768 Functions as a Chalkophore That Mediates Copper Acquisition in *Streptomyces thioluteus*," *ACS Chem. Biol.*, vol. 12, no. 12, pp. 3067–3075, 2017, doi: 10.1021/acscchembio.7b00897.



- [50] A. J. Potter, C. Trappetti and J. C. Paton, "Streptococcus pneumoniae uses glutathione to defend against oxidative stress and metal ion toxicity". *Journal of bacteriology*, vol. 194, no. 22, pp. 6248-6254, 2012, <https://doi.org/10.1128/JB.01393-12>
- [51] Y. Cao, Y. Zhao, L. Cha, X. Ying, L. Wang, N. Shao, and W. Li, "sRNATarget: a web server for prediction of bacterial sRNA targets," *Bioinformatics*, vol. 3, no. 8, pp. 364–366, 2009. doi: 10.6026/97320630003364
- [52] E. Sonnleitner, N. Gonzalez, T. Sorger-Domenigg, S. Heeb, A. S. Richter, R. Backofen, P. Williams A. Huttenhofer, D. Haas, and U. Blasi, "The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal," *Mol. Microbiol.*, vol. 80, no. 4, pp. 868–885, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07620.x.
- [53] D. T. Starczynowski, R. Morin, A. McPherson, J. Lam, R. Chari, J. Wegrzyn, F. Kuchenbauer, M. Hirst, K. Tohyama, R. K. Humphries, W. L. Lam, M. Marra and A. Karsan, "Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations," *Blood*, vol. 117, no. 2, pp. 595–607, 2011, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-277012>
- [54] S. Chen, A. Zhang, L. B. Blyn, and G. Storz, "MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 20, pp. 6689–6697, 2004, doi: 10.1128/JB.186.20.6689-6697.2004.
- [55] C. Pichon and B. Felden, "Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among



pathogenic strains,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 40, pp. 14249–14254, 2005, doi: 10.1073/pnas.0503838102.

[56] F. Eggenhofer, H. Tafer, P. F. Stadler, and I. L. Hofacker, “RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. suppl_2, pp. W149–W154, 2011, doi: 10.1093/nar/gkr467.

[57] P. Kaur and P. P. Balgir, “Prediction Expression Analysis and Target Validation of Bacterial Small RNAs,” in *Advances in Animal Biotechnology and its Applications*, S. K. Gahlawat, J. S. Duhan, R. K. Salar, P. Siwach, S. Kumar, and P. Kaur, Eds. Singapore: Springer, pp. 3–18, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-4702-2_1.

[58] L. S. Waters and G. Storz, “Regulatory RNAs in Bacteria,” *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 615–628, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.043.

[59] K. E. Weaver, “Emerging plasmid-encoded antisense RNA regulated systems,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 10, no. 2, pp. 110–116, 2007, doi: 10.1016/j.mib.2007.03.002.

[60] D. Lalaouna, M. Simoneau-Roy, D. Lafontaine, and E. Massé, “Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1829, no. 6–7, pp. 742–747, 2013, doi: 10.1016/j.bbagr.2013.02.013.

[61] S. Durand, A. Tomasini, F. Braun, C. Condon, and P. Romby, “sRNA and mRNA turnover in Gram-positive bacteria,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 39, no. 3, pp. 316–330, 2015, doi: 10.1093/femsre/fuv007.

[62] N. Obana, Y. Shirahama, K. Abe and K. Nakamura, “Stabilization of *Clostridium perfringens* collagenase mRNA by VR-RNA-dependent cleavage in 5’



leader sequence,” *Molecular Microbiology*, vol. 77, pp. 1416-1428, 2010, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07258.x>

[63] E. Morfeld, D. Taylor, A. von Gabain, and S. Arvidson, “Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII,” *The EMBO Journal*, vol. 14, pp. 4569-4577, 1995, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00136.x>

[64] E. Ramirez-Peña, J. Treviño, Z. Liu, N. Perez, and P. Sumbly, “The group A *Streptococcus* small regulatory RNA FasX enhances streptokinase activity by increasing the stability of the ska mRNA transcript,” *Mol. Microbiol.*, vol. 78, no. 6, pp. 1332–1347, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07427.x.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Caracterización de ARN no codificantes de respuesta a cobre en *Enterococcus faecalis*

Jorge Humberto Torres Robles

MEMORIA DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIOQUÍMICO

Director de Memoria

Dr. Mauricio Latorre Mora
Laboratorio de Bioingeniería
Instituto de Ciencias de la Ingeniería
Universidad de O'Higgins

Profesor patrocinante de Memoria

Dra. Valentina Parra Ortiz
Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Chile

2022