

UCh-FC  
Biotecnología  
L258  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**CutC: Caracterización bioinformática, análisis transcripcional y estudio del efecto sobre la homeostasis de cobre en *Enterococcus faecalis***

Memoria de Título Entregada a la  
Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular



Por

**Mauricio Alejandro Latorre Mora**

Diciembre, 2010  
Santiago – Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Mauricio González Canales.  
Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica.  
INTA – Universidad de Chile.

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

**“CutC: Caracterización bioinformática, análisis transcripcional y estudio del efecto sobre la homeostasis de cobre en *Enterococcus faecalis*”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular presentada por:

**MAURICIO ALEJANDRO LATORRE MORA**

**Director de Memoria de Título**

Dr. Mauricio González Canales

Mauricio González Canales

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dr. Carlos Jerez Guevara

Carlos Jerez Guevara

Dra. Cecilia Vergara Montecinos

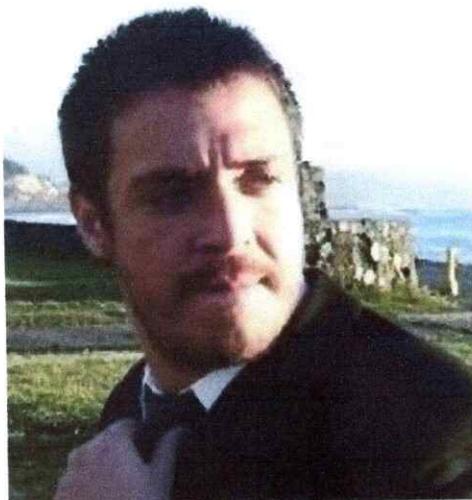
C. Vergara Montecinos

Santiago de Chile, \_\_\_\_\_ 2011.



*A mi Mamá*

*y mi Nina*



En Santiago de Chile, un 17 de septiembre de 1981 nace el Señor Mauricio Alejandro Latorre Mora. A sus cortos cinco años de edad, parte su aventura en las áreas del conocimiento al ingresa al Glorioso Liceo Experimental Manuel de Salas, lugar donde termina con éxito toda su enseñanza escolar. En su andar por las diversas materias y caminos de la vida, desarrolla su pasión incondicional por las ciencias biológicas, llevándolo en el año 2001, a tomar la decisión de entrar a la Ilustre Universidad de Chile a estudiar la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Hoy, este seminario de título marca el punto final para convertirse en un flamante profesional, sin embargo, es solo el primer paso en el arduo, desafiante y gratificante mundo científico...

## AGRADECIMIENTOS



En esta oportunidad quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí en todo momento, dándome su apoyo incondicional, su ayuda y cariño.

En primer lugar doy gracias a mi familia, mi Mamá *Georgina* y tía *Nina* por su constante preocupación y amor desde el momento en que nací, cuidándome y protegiéndome en cada una de las etapas de mi vida. A mi polola *Carola*, por su amor y compañía. A mis amigos y hermanos *Inos*, *Gori*, *Heri*, *Possy* y a mis segundas familias los *Rusiñol* y los *Medi*, a todos gracias por los gratos e inolvidables momentos vividos y por vivir.

Gracias Profe *Mauricio* por la confianza depositada en mí, sus palabras y consejos, por la oportunidad de desarrollarme en lo profesional y personal hasta el día de hoy. A la Dra. *Cambiazo*, por su ejemplo como profesional y consejos en los momentos indicados. A mis compañeros y amigos del Laboratorio, *Ange* por todo lo enseñado, a *Jano*, *Pata*, *Frudito*, *Negro*, *Chodar*, *Talia*, *Miriam*, *Luchito*, *Juan Carlos*, *Paty*, *Carolina*, *Lupe*, *Angélica Chica*, *Andrea*, *Paty Chen*, *Pix*, *Impacto* y *Calixto*, por su experiencia y ayuda. Gracias *Pipo* y *Leo*, por su ayuda en la tremenda tarea de administrar de la gerencia LBEG. Al Dr. *Maass*, por brindarme un espacio en su Laboratorio y proyectos. A mis amigas de la carrera, *Cita Lore*, *Cita Cinthia*, *Solange* y *Catita Elfa* por esas noches de estudio, lecciones y ayuda. A los profesores de la Universidad, por su formación y disposición a entregar sus conocimientos. A mis amigos del Doctorado, en especial al *Loco James* por su ayuda con los análisis y a la *Vale* por su paciencia infinita.

Y a todos aquellos quienes con un simple consejo o una palabra de ánimo impulsaron este trabajo y mi desarrollo como Ingeniero en Biotecnología Molecular,

gracias.

## INDICE DE CONTENIDOS



DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
INDICE DE CONTENIDOS .....	v
INDICE DE TABLAS .....	ix
INDICE DE FIGURAS .....	x
INDICE DE ANEXOS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCION .....	1
1. La dualidad del cobre .....	1
2. El operon <i>cop</i> de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	3
3. Identificación de candidatos, creación y aplicación Cu-BDP .....	4
4. Propiedades estructurales y funcionales de homólogos de CutC .....	5
5. Hipótesis .....	8
6. Objetivo general .....	8
7. Objetivos específicos .....	8



MATERIALES Y METODOS .....	10
1. MATERIALES .....	10
1.1. Cepas y condiciones de cultivo .....	10
1.2. Reactivos, sales y soluciones .....	11
1.3. Partidores .....	11
1.4. Algoritmos bioinformáticos .....	13
2. METODOS .....	14
2.1. Caracterización <i>in silico</i> .....	14
2.1.1. Características de la secuencia aminoacídica de CutC .....	14
2.1.2. Grado de conservación de la estructura primaria de CutC en el orden <i>Lactobacillale</i> .....	14
2.2. Biología molecular .....	16
2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	16
2.2.2. Electroforesis .....	16
2.2.3. Verificación de la cepa $\Delta cutC$ de <i>E. faecalis</i> OG1RF .....	17
2.3. Ensayos de expresión génica .....	18
2.3.1. Extracción de RNA total .....	18
2.3.2. Cuantificación y calidad del RNA .....	19
2.3.3. Síntesis de cDNA y transcripción reversa .....	19
2.3.4. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) .....	20
2.4. Protocolos de caracterización microbiológicos .....	21



2.4.1. Concentración mínima inhibitoria de cobre (CMI) .....	21
2.4.2. Curva de crecimiento .....	22
2.4.3. Contenido intracelular de cobre .....	23
2.5. Análisis estadístico .....	24
RESULTADOS .....	25
1. Caracterización y análisis <i>in silico</i> .....	25
1.1. Predicción de estructura secundaria y terciaria de la proteína CutC de <i>E. faecalis</i> ....	25
1.2. Grado de conservación de la proteína y operon <i>cutC</i> en especies del orden <i>Lactobacillale</i> .....	28
2. Determinación de la abundancia del transcrito de <i>cutC</i> en cultivos de <i>E. faecalis</i> expuestos a Cu .....	32
2.1. Verificación de la calidad de las muestras de RNA y cDNAs .....	32
2.2. Validación del gen normalizador <i>gdh</i> para ensayos de qPCR en las muestras de cDNA .....	36
2.3. Cuantificación por qPCR de la abundancia del transcrito <i>cutC</i> en cultivos de <i>E.</i> <i>faecalis</i> .....	39
3. Caracterización de la cepa mutante para el gen <i>cutC</i> de <i>E. faecalis</i> .....	41
3.1. Verificación de la mutación del gen <i>cutC</i> en la cepa de <i>E. faecalis</i> OG1RF .....	41
3.2. Concentración mínima inhibitoria de cobre (CMI) .....	43
3.3. Curvas de crecimiento .....	45
3.4. Contenido intracelular de Cu .....	49



DISCUSION .....	51
CONCLUSIONES .....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	65
ANEXOS .....	69

## INDICE DE TABLAS



<b>Tabla 1.</b> Partidores utilizados en las reacciones de amplificación y cuantificación mediante	
PCR .....	12
<b>Tabla 2.</b> Determinación de la abundancia relativa del normalizador <i>gdh</i> .....	38
<b>Tabla 3.</b> Tiempo generacional para las cepas silvestre y $\Delta cutC$ de <i>E. faecalis</i> expuestas a	
diferentes concentraciones de Cu .....	47

## INDICE DE FIGURAS



<b>Figura 1.</b> Alineamiento global y predicción de estructura secundaria de CutC de <i>E. faecalis</i> y <i>S. flexneri</i> .....	26
<b>Figura 2.</b> Proyección tridimensional de la estructura terciaria predicha para CutC de <i>E. faecalis</i> .....	27
<b>Figura 3.</b> Alineamiento global de las secuencias aminoacídicas de CutC identificadas en especies del orden <i>Lactobacillale</i> .....	30
<b>Figura 4.</b> Organización de <i>cutC</i> en el genoma de las diferentes especies del orden <i>Lactobacillale</i> .....	31
<b>Figura 5.</b> Verificación de la calidad de los RNAs .....	34
<b>Figura 6.</b> Verificación por PCR convencional de la calidad de los RNAs y cDNAs .....	35
<b>Figura 7.</b> Abundancia relativa del transcrito <i>cutC</i> cuantificada mediante qPCR .....	40
<b>Figura 8.</b> Esquema del diseño y verificación de la mutación $\Delta cutC$ de <i>E. faecalis</i> .....	42
<b>Figura 9.</b> Concentración mínima inhibitoria de Cu en agar y caldo .....	44
<b>Figura 10.</b> Efecto de la exposición a Cu sobre el crecimiento la cepa $\Delta cutC$ .....	46
<b>Figura 11.</b> Curva de crecimiento de las cepas silvestre y $\Delta cutC$ expuestas a Cu .....	48
<b>Figura 12.</b> Contenido de Cu en las cepas silvestre y $\Delta cutC$ expuestas a Cu .....	50

## INDICE DE ANEXOS



<b>Anexo 1.</b> Protocolo de construcción de la base de datos Cu-BDP .....	70
<b>Anexo 2.</b> Estadística general de la base de datos de proteínas cristalografiadas vinculadas a Cu .....	71
<b>Anexo 3.</b> Aplicación y anotación de resultados Cu-BDP .....	72
<b>Anexo 4.</b> Lista de candidatos involucrados en la homeostasis de Cu en <i>E. faecalis</i> .....	73
<b>Anexo 5.</b> Resumen XVII Congreso Chileno de Microbiología, Pucón, Chile 2005 .....	74
<b>Anexo 6.</b> Protocolo de construcción de la cepa mutante de <i>E. faecalis</i> OG1RFVKan: <i>cutC</i> mediante disrupción génica .....	75
<b>Anexo 7.</b> Resumen XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología – ALAM, Pucón, Chile 2006 .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

1TWD:	Código PDB - CutC <i>S. flexneri</i>
AAS:	Espectrometría de absorción atómica
ATP7a:	ATPasa transportadora de eflujo de Cu Menkes
ATP7b:	ATPasa transportadora de eflujo Cu Wilson
Blast:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BlastP:	Blast de proteínas
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
CopA:	ATPasa transportadora de eflujo Cu
<i>copA</i> :	Gen que codifica para la proteína CopA
CopB:	ATPasa transportadora de captación de Cu
<i>copB</i> :	Gen que codifica para la proteína CopB
CopY:	Regulador transcripcional - Represor operon cop
<i>copY</i> :	Gen que codifica para la proteína CopY
CopZ:	Chaperona de Cu
<i>copZ</i> :	Gen que codifica para la proteína CopZ
Cp:	Punto de cruce ( <i>Crossing point</i> )
Cu:	Cobre
Cu-PDB:	Base de datos de proteínas cristalografiadas vinculadas a Cu
dNTP:	Desoxinucleótidos trifosfatos
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Acido etilendiamino tetra acético
Ef:	Eficiencia de la reacción de qPCR
Ln	Logaritmo natural
Log:	Logaritmo en base 10
MOPS:	Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NCBI:	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PDB:	<i>Protein Data Bank</i>
PHI-Blast:	<i>Pattern Hit Initiated</i> - Blast
ppb:	Partes por billon
PROTEUS:	<i>Protein Secondary Structure Prediction Software</i>
qPCR:	PCR en tiempo real ( <i>Real Time Polimerase Chain Reaction</i> )
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
RNA:	Acido ribonucleico
RNAi:	Acido ribonucleico interferente
RND	Proteína de resistencia, nodulación y división celular
SHOPS:	<i>Show Operon Structures</i>

TAE:	Tampón tris-acetato EDTA
TIGR:	<i>The Institute of Genome Research</i>
TIM	Triofosfato isomerasa
Tm:	Tiempo de fusión ( <i>melting</i> )
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U:	Unidades enzimáticas
UV:	Ultra violeta
VIS:	Espectro de luz visible
VMD:	<i>Visual Molecular Dynamics Software</i>

## RESUMEN

El cobre es un micronutriente esencial requerido desde organismos procariontes hasta eucariontes. Su esencialidad radica principalmente en la participación como cofactor de una serie de enzimas que intervienen en procesos de respiración celular, transporte de hierro y protección frente a radicales libres. Sin embargo, un exceso de este elemento puede resultar tóxico para la célula, acción debida principalmente a su capacidad de generar radicales libres los cuales pueden dañar el DNA, proteínas y membranas celulares. El adecuado suministro de cobre celular requiere de mecanismos moleculares que den cuenta del control de su concentración intracelular: genes y proteínas capaces de responder activamente a fluctuaciones del metal, cuyo propósito fundamental es mantener la homeostasis celular. Actualmente, desconocemos el total de elementos involucrados en este proceso celular. En este contexto, el presente seminario de título tuvo como objetivo principal estudiar la participación de CutC dentro homeostasis de cobre en *Enterococcus faecalis*.

La metodología aquí empleada, permitió determinar bioinformáticamente que CutC mantiene características estructurales con homólogos descritos en otros organismos, en los cuales se destacan posibles aminoácidos conservados con potenciales funciones de coordinación para el metal. Además, se logró por primera vez posicionar a *cutC* como un gen cuya expresión se induce frente a estímulos de cobre, respuesta que se correlaciona directamente con el aumento en la concentración intracelular del metal producto de la ausencia de la proteína, resultados que sugieren una posible participación en los mecanismos encargados del eflujo de cobre en la *E. faecalis*. Cabe resaltar, que los datos generados en este trabajo apoyan la línea de investigación realizada hasta el momento para CutC, sin embargo, la función y relación específica de esta proteína en la homeostasis de cobre es una pregunta aún no resuelta.

## ABSTRACT

Copper is an essential micronutrient required from prokaryotes to eukaryotic organisms. Copper essentiality lies in its participation as a cofactor of several enzymes involved in processes such as cellular respiration, iron transport and protection from free radicals. However, an excess of this element may be toxic to the cell, mainly due to its ability to generate free radicals, which can damage DNA, proteins and cell membranes. In order to sustain an adequate supply of copper, the cell requires molecular mechanisms that establish a control over its intracellular concentration: genes and proteins that are able to respond to fluctuations in the abundance of the metal, whose main purpose is to maintain cellular homeostasis. Currently, the total number of elements involved in this cellular process is unknown. In this context, this undergraduate thesis main objective was to study the participation of CutC in *Enterococcus faecalis* copper homeostasis.

By using a bioinformatic approach it was found that CutC retains certain structural features from homologous proteins described in other organisms, among which the putative conservation of amino acids with the potential ability to coordinate the metal is specially noteworthy. In addition, it was demonstrated for the first time that *cutC* is a gene whose expression is induced by a copper stimulus, and this response is directly correlated with the increase in intracellular metal concentration when the protein is absent in the cell. These results suggest a possible role for CutC in the mechanisms responsible for copper efflux in *E. faecalis*. It should be noted that although the data generated in this study support previous knowledge regarding this protein, its function and specific relationship with copper homeostasis is still an unresolved question.

## INTRODUCCION

### 1. La dualidad del cobre

El cobre (Cu) es un micronutriente esencial tanto para organismos procariontes como eucariontes<sup>1</sup>. En la naturaleza, el metal se encuentra en su estado oxidado ( $\text{Cu}^{+2}$ ) o reducido ( $\text{Cu}^{+1}$ ), cualidad que posibilita su participación como aceptor o dador de electrones en la oxidación de diferentes sustratos. En los sistemas biológicos, el Cu es utilizado como cofactor de metalo-enzimas que participan en procesos de respiración celular, transporte de hierro y protección frente a radicales libres<sup>2, 3</sup>. Tales características hacen del Cu un elemento de transición fundamental para la realización de una serie de procesos bioquímicos en forma normal. Sin embargo, en exceso, puede inducir la generación de radicales libres a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton<sup>4</sup>, los cuales son capaces de dañar membranas celulares, proteínas y DNA<sup>5</sup>. Además, el Cu puede unirse directamente a grupos sulfhidrilos de proteínas e incluso desplazar a otros metales que actúan como co-factores, lo que conduce a inactivación enzimática y/o a la pérdida de estructura proteica<sup>6</sup>.

La dualidad que presenta el Cu, resultó en la existencia de sistemas regulatorios específicos que mantengan el control de su concentración en la célula (homeostasis)<sup>1</sup>. A la fecha, las principales etapas descritas en procariontes y eucariontes en el manejo celular de este metal son<sup>7</sup>: i) Captación: realizada vía proteínas de membrana encargadas de su incorporación hacia el interior de la célula, ii) Almacenamiento y distribución intracelular: ejecutado por proteínas que lo unen transitoriamente con el objetivo de su transporte o contención al interior de la célula, tales como chaperonas de Cu y metalotioneínas, iii)

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.

Se ha observado en humanos, que disfunciones de los componentes homeostáticos del Cu son capaces de generar diferentes patologías. Un ejemplo de éstas, son las enfermedades de Menkes y de Wilson<sup>8, 9</sup>, producidas por mutaciones en genes que codifican para las ATPasas de eflujo. ATP7a y ATP7b, respectivamente. El Síndrome de Menkes es una enfermedad ligada al cromosoma X, que produce una deficiencia del metal, con un consiguiente deterioro mental progresivo, hipotermia y anomalías del tejido conectivo, todo lo cual finalmente lleva a la muerte del individuo aproximadamente a los tres años de edad. La enfermedad de Wilson es una patología autosómica, que se caracteriza por excreción biliar defectuosa del metal, lo que produce una acumulación del Cu principalmente en el hígado, seguida por trastornos neurológicos, psiquiátricos, renales, hematológicos, endocrinos y hepáticos<sup>10</sup>.

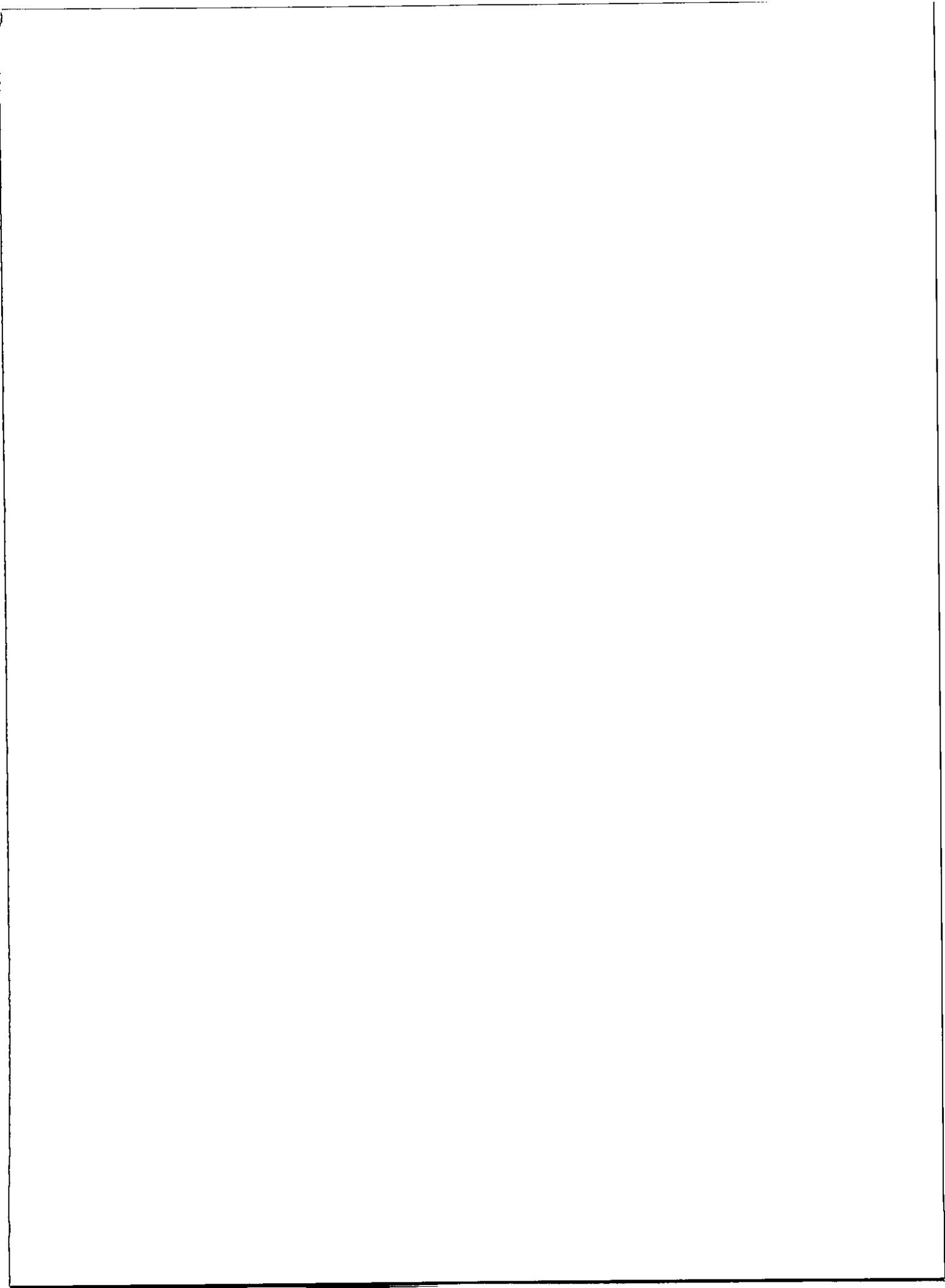
En atención a la importancia del control celular del Cu, es necesario identificar y caracterizar las proteínas sensibles a estímulos del metal, capaces de responder frente a diferentes concentraciones del mismo y que, eventualmente podrían estar implicados de forma directa en el control del contenido celular de este elemento (mecanismos de homeostasis) o indirectamente a través de otros procesos celulares, actuando por ejemplo sobre metabolismo basal, reparación celular, mecanismo de defensa antioxidantes, entre otros. En conjunto, ambos tipos de componentes permitirían evitar los efectos dañinos derivados del déficit y exceso del metal.

Con el propósito de identificar las proteínas sensibles a estímulos de Cu, la elección de un modelo biológico simple, en el cual se puedan identificar de una manera fácil y

rápida dichas proteínas y que además permita el control de la mayor cantidad de variables posibles (en este caso la exposición a Cu), es de vital importancia para entender los efectos a nivel celular asociados a la protección y utilización del metal. En este contexto, la utilización de modelos bacterianos presenta amplias ventajas, las cuales favorecen su elección al momento de entender el manejo celular del metal, entre las cuales destacan: su fácil y rápida manipulación genética, el reducido tiempo de generación, el bajo costo asociado al manejo en cultivo, además de interesantes proyecciones biotecnológicas. Su simplicidad en comparación a los modelos eucariontes, así como la gran cantidad y variedad de genomas secuenciados disponibles a la fecha, posiciona a los modelos bacterianos como una gran alternativa en la búsqueda de nuevos componentes relacionados con el control intracelular del Cu.

## 2. El operón *cop* de *Enterococcus faecalis*

Uno de los mecanismos moleculares que controlan el contenido de Cu, mejor descritos hasta la fecha, es el operón *cop* de *Enterococcus hirae* (*E. hirae*)<sup>11</sup>. Este operón, está compuesto por genes que codifican para las ATPasas CopA (captación) y CopB (eflujo), la chaperona CopZ (tráfico intracelular), cuya función es la de dirigir el Cu hacia el factor de transcripción CopY (represor), el cual es finalmente el encargado de regular la expresión del operón<sup>12</sup>. A pesar que el operón *cop* de *E. hirae* da cuenta de un modelo biológico simple del manejo del Cu, la ausencia de la secuencia genómica para esta bacteria, es una limitante en la búsqueda de nuevos componentes capaces de complementar la respuesta a estímulos del metal o que estén implicados en su homeostasis.



En un estudio de genómica comparada sobre el operón cop, nuestro laboratorio identificó a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), entre las 9 especies del orden *Lactobacillales* secuenciadas, como la especie filogenéticamente más cercana a *E. hirae* con un operón *tipo-cop* codificado en su genoma<sup>13</sup>. La caracterización molecular y fisiológica de los componentes de este operón, nos permitió describir y caracterizar 3 homólogos para las proteínas CopY, CopA y CopZ con funciones similares a las descritas en *E. hirae*<sup>14, 15</sup>.

De esta forma, la presencia del operón cop, sumado a su genoma secuenciado y anotado, posicionan a *E. faecalis* como un excelente modelo para identificar y caracterizar nuevas proteínas vinculadas a la homeostasis de Cu.

### **3. Identificación de candidatos, creación y aplicación Cu-BDP**

Si bien, actualmente contamos con más de 900 genomas bacterianos anotados<sup>16</sup>, desconocemos el total de proteínas que en procariontes podrían estar participando en el control de las concentraciones intracelulares de Cu o vinculadas directamente a él utilizándolo como cofactor. Por otra parte, considerando que la mayoría las proteínas involucradas en el manejo celular de Cu en bacterias han sido conservadas estructural y funcionalmente en eucariontes, la búsqueda de nuevos componentes que complementen la función del operón Cop en *E. faecalis* abre la posibilidad de contribuir a caracterizar este proceso en otros sistemas biológicos.

Con este objetivo, adoptamos un protocolo bioinformático propuesto por *Andreini y cols.*<sup>17</sup>, el cual permitió construir una base de datos de proteínas con motivos de unión a metales (ANEXOS 1, 2), que posteriormente se utilizó como templatado para la identificación de nuevos componentes sobre el genoma de *E. faecalis* (ANEXOS 3). Como

resultado, se obtuvo además de los componentes del operón *cop*, un total de 13 posibles candidatos de *E. faecalis* (ANEXO 4), los cuales finalmente se jerarquizaron tomando en cuenta Información disponible en la literatura sobre su relación con el metal, donde la proteína CutC, se posicionó como el mejor candidato que, eventualmente, podría responder a estímulos de Cu a nivel transcripcional, y que a su vez podría participar en la homeostasis del metal, modificando el contenido intracelular del mismo.

#### 4. Propiedades estructurales y funcionales de homólogos de CutC

La proteína CutC fue identificada como una posible componente de la homeostasis de Cu por el grupo de *Rouch* en 1989<sup>18</sup>. En este trabajo, se observó que la mutante nula para *cutC* en *Escherichia coli* disminuye su viabilidad frente a un exceso de Cu extracelular, lo cual se asoció a una mayor acumulación intracelular del metal en comparación a la cepa silvestre.

Con el objetivo de clarificar la estructura de esta proteína y su posible interacción directa con Cu, *Zhu y cols.*, obtuvieron el cristal para CutC de *Shigella flexneri* (*S. flexneri*)<sup>19</sup>. El análisis permitió ubicar a CutC en la familia de proteínas con estructura de barriles tipo trifosfato isomerasa (barriles TIM), familia que se caracteriza por presentar una configuración tridimensional de ocho láminas betas que conforman un poro central rodeado por ocho hélices alfa, propio de proteínas citoplasmáticas, presente al menos, en 15 sub familias de enzimas<sup>20</sup>. No obstante, en este estudio, no se describen es su estructura, aminoácidos específicos encargados de la coordinación del metal, puesto que no se obtuvieron átomos de Cu en el cristal.

A nivel transcripcional, estudios posteriores realizados en la bacteria *Xylella fastidiosa*<sup>21</sup>, mostraron que frente a pulsos crecientes de Cu extracelular, se produce un aumento en la abundancia de transcrito para *cutC*, lo que da cuenta de una probable respuesta del gen frente a la exposición al metal, la cual es acompañada por una disminución de la viabilidad celular.

Experimentos recientes revelan que CutC no sólo se encuentra en organismos procariontes. Homólogos de esta proteína han sido identificados en humanos, los cuales presentan una localización sub-celular citoplasmática, con una distribución tisular a nivel del RNA, similar a la de proteínas vinculadas con el eflujo del metal<sup>22</sup>. Paralelamente, ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real muestran una disminución del transcrito *cutC* en el nematodo *Caenorhabditis elegans*<sup>23</sup>, cuando éste es expuesto a concentraciones extracelulares crecientes de Cu, evidenciando una respuesta transcripcional opuesta a los experimentos realizados en la bacteria *X. fastidiosa*. Sin embargo, el silenciamiento parcial (*knock-down*) del gen mediante técnicas de RNAi, si bien no cambia la concentración total celular del metal, ni la viabilidad en *C. elegans*, afecta la morfología y desarrollo embrionario del organismo que presenta menores niveles de la proteína. Esto último, da cuenta de que CutC, además de ser un componente capaz de responder transcripcionalmente frente a Cu, podría vincularse adicionalmente a procesos relacionados con la diferenciación durante el desarrollo, además de su posible participación en la homeostasis del metal.

En resumen, los criterios de búsqueda bioinformática de proteínas vinculadas a Cu dentro del genoma de *E. faecalis*, los datos relacionados con la estructura de esta proteína y las evidencias que indican que responde transcripcionalmente frente a estímulos del metal, sugieren que, CutC podría estar involucrada en la homeostasis del Cu, asociada

posiblemente al control del contenido intracelular del mismo. Sin embargo, no existen evidencias que den cuenta de una relación entre la respuesta transcripcional *cutC* y su efecto sobre la concentración intracelular de Cu frente a cambios temporales en la disponibilidad del metal, investigación que, permitiría proponer una relación entre la cantidad de CutC y su efecto sobre la homeostasis del Cu.

Con el propósito de avanzar en el conocimiento sobre la participación de CutC sobre el control intracelular del metal, en este trabajo de tesis se propuso determinar si la ausencia de CutC afecta la concentración intracelular de Cu en el modelo de *E. faecalis*, así como, caracterizar la respuesta transcripcional temporal de *cutC* frente a la exposición del metal.

Estas dos aproximaciones nos permitirían posicionar a CutC como un nuevo elemento de respuesta a Cu en *E. faecalis*, que en conjunto con el operón *cop*, podrían estar participando en mecanismos de transporte, acumulación o distribución de Cu en la célula.

## 5. Hipótesis

La exposición a Cu, induce cambios en la abundancia del transcrito que codifica para CutC los cuales se correlacionan con variaciones en la concentración intracelular del metal producto de la ausencia de la proteína.

## 6. Objetivo general

Determinar la abundancia del transcrito que codifica para la proteína CutC durante la exposición a Cu de *E. faecalis* y cuantificar la concentración intracelular del metal en ausencia de la proteína bajo las mismas condiciones de tratamiento.

## 7. Objetivos Específicos

### a. Caracterizar a CutC de *E. faecalis* a través de análisis *in silico*

Estudiar el grado de similitud entre CutC de *E. faecalis* y el cristal obtenido previamente de su homólogo en *S. flexneri* mediante predicción y comparación de la estructura secundaria y terciaria. Así como también, determinar el grado de conservación de la proteína CutC y la organización genómica del gen *cutC* de *E. faecalis* dentro del orden *Lactobacillale*.

**b. Determinar los perfiles de expresión del gen *cutC* de *E. faecalis* en respuesta a la exposición a Cu**

Utilizar ensayos de PCR en tiempo real con el propósito de cuantificar abundancias del transcrito *cutC* en cultivos de *E. faecalis* sometidos a diferentes tiempos de exposición a una concentración no letal Cu.

**c. Caracterización fenotípica de la mutante nula del gen *cutC* de *E. faecalis* en la homeostasis intracelular de Cu**

Realizar diferentes protocolos microbiológicos de exposición a Cu, con el objetivo de comparar el comportamiento entre una cepa mutante de *E. faecalis* para el gen *cutC* y la cepa silvestre, estudiando principalmente la viabilidad celular y el contenido intracelular de Cu.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. MATERIALES

#### 1.1. Cepas y condiciones de cultivo

En la presente tesis se utilizaron las cepas de *E. faecalis*: OG1RF, adquirida desde el laboratorio de la doctora Barbara Murray de la Universidad de Texas – EUA y la cepa mutante nula OG1RF $\nabla$ Kan:*cutC* ( $\Delta cutC$ , en esta tesis), construida previamente en el laboratorio de la Dra. Murray en colaboración con nuestro laboratorio<sup>14</sup>.

Todas las cepas utilizadas se cultivaron 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 monohidrógeno 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)<sup>14</sup>. Solo en el caso de la cepa mutante  $\Delta cutC$ , fue necesario adicionar al cultivo el antibiótico kanamicina a una concentración final de 2 mg/mL. Los cultivos sólidos se realizaron a una temperatura de 37 °C en una estufa *Precision Incubator 300* (Mettler, Schwabach, Alemania). Los cultivos líquidos se efectuaron en una estufa L5I-7016R (Latech, Salt Lake, EUA) con agitación de 140 r.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 y de ácidos nucleicos se realizó en un espectrofotómetro MBA2000-

UV/VIS (Perkin Elmer, New York, EUA) a una densidad óptica (DO) de 600 nm y 240/260/280 nm respectivamente.

## **1.2. 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 la empresa TCL (Santiago, Chile), esterilizada mediante autoclave LS-1 (Rexall, Mississauga, Canadá) durante 25 min. Los kits y enzimas utilizados en los ensayos de biología molecular se adquirieron en las empresas Invitrogen (California, EUA), Roche (Basilea, Suiza), Qiagen (Duesseldorf, Alemania) y Promega (Wisconsin, EUA).

## **1.3. Partidores**

Todos los partidores para las reacciones de PCR tanto convencional como en tiempo real (tabla 1), se sintetizaron por Alpha DNA (Quebec, Canadá). El diseño de éstos se llevó a cabo mediante el Programa Primer Premier 3.0 (Primer Biosoft International), utilizando como templatado el genoma secuenciado de *E. faecalis* V583<sup>24</sup>.

**Tabla 1. Partidores utilizados en las reacciones de amplificación y cuantificación mediante PCR.** 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 la verificación de la cepa mutante para el gen *cutC* y los ensayos de cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) para el transcrito de *cutC*.

Indicador	Secuencia (5' 3')	$T_m$ (°C)
gdh_s	GCGGCTATTATGACCACAG	56
gdh_a	TCTTCAGAATAAAGGCGGA	56
$\Delta cutC$ _s	TGGACCGTGGTGGAGTGTA	56
pTEX4577_a	AGCGGATAACAATTTCACAC	56
cutC_s	CCCCAAGCCATTCAAAAAG	60
cutC_a	CGCCAGCGTATGCTAAGAC	60

#### 1.4. Algoritmos bioinformáticos

La predicción de la estructura secundaria para CutC de *E. faecalis*, se efectuó ingresando la secuencia aminoacídica en formato FASTA directamente al programa PROTEUS (<http://wks16338.biology.ualberta.ca/proteus/>)<sup>25</sup>. La representación tridimensional de la proteína se generó por homología a través del programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)<sup>26</sup>, utilizando como templado los datos cristalografiados de CutC de *S. flexneri* obtenidos directamente de la base de datos de proteínas disponible en <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, Id-PDB: 1TWD y posteriormente visualizada mediante el programa descargable VMD v1.8.6 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)<sup>27</sup>.

La búsqueda de proteínas homólogas de CutC de *E. faecalis* en especies del orden *Lactobacillale*, se llevó a cabo mediante el programa BlastP (<http://blast.jcvi.org/cmrbblast/>)<sup>28</sup>, utilizando como entrada la secuencia aminoacídica codificada para el gen *cutC* de *E. faecalis* en formato FASTA, la cual se obtuvo directamente desde la base de datos del Instituto de Investigación Genómica Microbiana (TIGR-CMR, <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>, Locus EF2667).

Los alineamientos posteriores entre las secuencias aminoacídicas de especies del orden *Lactobacillales* y CutC de *E. faecalis*, se realizaron a través del algoritmo ClustalW v1.4 disponible a través del editor de secuencias descargable BIOEDIT (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)<sup>29</sup>. La predicción de la organización genómica del gen *cutC* (presencia de operones) en cada una de las especies del orden *Lactobacillale*, se llevó a cabo mediante el programa SHOPS (<http://www.bioinformatics.med.uu.nl/shops/>)<sup>30</sup>.

Todas las herramientas bioinformáticas se utilizaron en forma estándar, basadas en las referencias citadas y siguiendo las recomendaciones correspondientes indicadas por los autores.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Caracterización *in silico***

#### **2.1.1. Características de la secuencia aminoacídica de CutC**

Previamente se ha descrito que CutC es una proteína conservada desde especies procariontes hasta eucariontes. Su estructura secundaria se caracteriza por la presencia de ocho láminas beta y ocho hélices alfa que espacialmente forman un barril TIM característico de proteínas citoplasmáticas. Basándonos en esta información, se realizó una predicción de la estructura secundaria para la proteína CutC de *E. faecalis* mediante el algoritmo PROTEUS y una proyección tridimensional de su posible estructura terciaria a través del programa SWISS-MODEL, los cuales se compararon con la información presente en la literatura.

#### **2.1.2. Grado de conservación de la estructura primaria de CutC en el orden**

##### ***Lactobacillale***

Utilizando como entrada la secuencia aminoacídica de CutC (EF2667) y por medio de la utilización del programa BlastP se rastrearon posibles homólogos de esta proteína en

especies del orden *Lactobacillales* con su genoma secuenciado<sup>13</sup>. Estas especies correspondieron a: *Streptococcus pyogenes* MGAS8232 (*S. pyogenes* MGAS8232), *Streptococcus pyogenes* MGAS315 (*S. pyogenes* MGAS315), *Streptococcus mitis* NCTC12261 (*S. mitis* NCTC12261), *Streptococcus pneumoniae*R6 (*S. pneumoniae* R6), *Streptococcus mutans* UA159 (*S. mutans* UA159), *Streptococcus agalactiae* 2603V/R (*S. agalactiae*2603V/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 aquellas proteínas con puntajes (score) inferiores a  $1E^{-10}$ , con una identidad superior al 30 % y una similitud superior al 50 % en relación a CutC de *E. faecalis*, las que se definieron bioinformáticamente como homólogas por identidad<sup>17</sup>. Posteriormente, se realizó un alineamiento global utilizando el algoritmo ClustalW con todas las secuencias rescatadas, lo que permitió determinar el grado de conservación global de la proteína en todo el orden. Finalmente, con objeto de estudiar la conservación de la organización de *cutC* en los genomas de las diferentes especies del orden, con la herramienta SHOPS se determinó en cada uno de los casos, la posibilidad de formar operones con otros genes.

## 2.2. Biología Molecular

### 2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Tanto la verificación de la calidad del RNA como la mutación de la cepa OG1RF  $\Delta cutC$  de *E. faecalis* se realizaron a través de experimentos de PCR convencional. En ambos casos, la amplificación se efectuó en una mezcla final de 20  $\mu$ L, compuesta por 8 ng/ $\mu$ L de cDNA templado, tampón PCR 1 X,  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, partidores 0,2 pM c/u, TAQ Polimerasa 5 U (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Massachusetts, EUA), siendo el programa de reacción de PCR utilizado el que se describe a continuación: a) Desnaturalización inicial a 94 °C por 10 mins, b) 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, asociación de los partidores por 30 s con  $T_m$  específica para cada pareja de partidores utilizados (tabla 1), extensión a 72 °C por 60 s, y c) extensión final, 72 °C durante 10 mins. En los ensayos de PCR convencional en colonia, el cDNA se reemplazó por 1  $\mu$ L de una resuspensión de una colonia bacteriana en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

### 2.2.2. Electroforesis

Muestras de DNA y cDNA se fraccionaron mediante geles de agarosa al 1 % p/v en tampón TAE 1 X (ácido acético 20 mM, Tris 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5), utilizando la misma solución como tampón electroforético. La tinción de los geles se llevó a cabo mediante la adición de bromuro de etidio al 0,1 % v/v.

Previo a la electroforesis las muestras de RNA (1 µg aprox.) se desnaturalizaron en una solución de formamida 36 % (v/v), formaldehído 4 % (v/v), MOPS 0,8 X y bromuro de etidio 0,4 % (v/v), a 70 °C por 15 min, las cuales posteriormente se enfriaron en hielo por 5 min. El fraccionamiento de las muestras de RNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,2 % p/v en condiciones desnaturalizantes agregando formaldehído al 7 % (v/v) y MOPS 1 X. Como tampón electroforético se utilizó una solución de MOPS 1 X.

Los geles de agarosa conteniendo muestras de DNA y RNA se observaron en un transiluminador de luz UV modelo TFX 20.M (Vilber Lourmat). Todas las fotografías de los geles se capturaron a través de una cámara digital Dc290 (Kodak).

### 2.2.3. Verificación de la cepa $\Delta cutC$ de *E. faecalis* OG1RF

La cepa mutante para el gen *cutC* de *E. faecalis* (cepa OG1RF) fue construida en el laboratorio de la Dra. Bárbara Murray<sup>14</sup>. La construcción de la cepa mutante se llevó a cabo a través del protocolo de disrupción génica, el cual consiste en clonar un fragmento interno del gen *cutC* de 430 pb en el vector suicida pTEX4577 (resistente a kanamicina)<sup>31</sup>. La cepa OG1RF es transformada con esta construcción (pTEX4577-*cutC*) mediante electrotransformación, siendo posteriormente los transformantes seleccionados en agar N con 2 mg/mL kanamicina, luego de 24 hs de incubación. El detalle de éste y otros protocolos utilizados se encuentra en la sección de anexos (ANEXOS 8). La confirmación de la mutante utilizada en esta tesis se llevó a cabo mediante PCR en colonia (ver sección 2.1.1). En la reacción, se utilizó una pareja de partidores  $\Delta cutC_s$  y pTEX4577\_a, diseñados para amplificar un fragmento de 340 pb, el cual abarca tanto un segmento del gen

*cutC* como del vector pTEX4577. La presencia del amplicón del tamaño indicado se verificó mediante electroforésis. Como control negativo de la mutación se utilizó la cepa silvestre de *E. faecalis* OG1RF.

## **2.3. Ensayos de expresión génica**

### **2.3.1. Extracción de RNA total**

El RNA total se extrajo de células provenientes de cultivos de la cepa de *E. faecalis* OG1RF crecidos en un medio N sin (control) y con suplemento de Cu (tratamiento). El protocolo consistió en ajustar una alícuota obtenida desde un cultivo crecido durante toda la noche a una concentración de  $DO_{600nm} = 0,05$  final en dos matraces (A control, B tratamiento) con medio N fresco. Cuando los cultivos frescos alcanzaron una  $DO_{600nm} = 1$ , se suplementó el matraz B con  $CuSO_4$  hasta alcanzar una concentración de 0,5 mM. Luego, de la adición de Cu, se tomaron 2 alícuotas independientes (réplicas biológicas correspondientes a 6 mL de cultivo con una  $DO_{600nm} = 2$ ) de cada matraz (A y B) a los tiempos de 15, 45, 90 y 135 min, constituyendo un total de 16 muestras, correspondientes a 2 réplicas biológicas de los matraces control y tratamiento para los 4 tiempos. Las alícuotas se centrifugaron a 14.000 r.p.m durante 2 min. Con el objeto de eliminar el exceso del metal el pellet celular se lavó 3 veces en forma sucesiva con una solución tampón de fosfato salino pH 7,4 (PBS).

Para la obtención del RNA en las muestras, se utilizó el kit de extracción de RNA de Quiagen, previa adición de lisozima a una concentración final de 10 mg/mL por 20 min a 37 °C al pellet celular obtenido luego de los lavados. A fin de descartar contaminación con

DNA, las muestras de RNA se trataron con 10 U de DNAasa (Quiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, el RNA se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para posteriormente cuantificar y verificar su calidad e integridad.

### 2.3.2. Cuantificación y calidad del RNA

La calidad de la muestra se verificó a través de electroforesis en geles desnaturalizantes (ver sección 2.2.2), en los cuales, se verificó la presencia de dos bandas características correspondientes a las unidades ribosomales 16S y 23S. La cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría (ver sección 1.1), calculando las razones de absorbancia entre 260/280 nm y entre 260/240 nm, 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 cDNA. Contaminaciones con DNA se controlaron a través de PCR convencional (ver sección 2.2.1), utilizando la pareja de partidores cutC\_s/cutC\_a. Como resultado se espera no obtener ningún tipo de amplificación, lo que indica la ausencia de DNA. Como control positivo de la reacción se utilizó como sustrato un PCR en colonia de la cepa OG1RF.

### 2.3.3. Síntesis de cDNA - Transcripción reversa

La síntesis de cDNA de doble hebra se realizó *in vitro* mediante el uso de partidores al azar (*random primers*). La reacción de transcripción reversa se realizó a partir de 2  $\mu$ g de RNA total y 1  $\mu$ L partidores (3  $\mu$ g/ $\mu$ L) en un volumen de 15  $\mu$ L. La reacción se incubó por 5 min a 70 °C. Pasado este tiempo, se adicionaron 1,25  $\mu$ L de dNTP (10 nM), 0,5  $\mu$ L de

RNasin (40 U/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L de M-MLV buffer (5 X) y 1  $\mu$ L de la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega 200 U/ $\mu$ L). Finalmente, se agregó agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25  $\mu$ L. La mezcla final se incubó durante 1 hora a 37 °C y las muestras se almacenaron a -20 °C.

El cDNA se cuantificó a través de espectrofotometría (ver sección 1.1), verificando su calidad mediante la amplificación del gen *cutC* a través de PCR convencional (ver sección 2.2.1).

#### **2.3.4. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)**

Mediante qPCR, se analizó la abundancia relativa del transcrito para el gen *cutC* en la cepa silvestre de *E. faecalis* OG1RF en las 16 muestras de cDNA. Cada reacción se llevó a cabo utilizando el kit qPCR Supermix UDG (Invitrogen) en capilares de vidrio a partir de 50 ng de cDNA en un volumen final de 10  $\mu$ L. La mezcla final contenía además BSA 1 X, 0,1 pM de cada partidor y 5  $\mu$ L de enzima Platinum SYBR Green (Invitrogen). El protocolo de amplificación se ingresó al termociclador a través del programa Light Cycler v3.5 (Roche) y se desglosa en: a) activación de la enzima, 95 °C por 10 mins, b) amplificación, 40 ciclos de: 1) desnaturalización, 95 °C por 3 min, 2) asociación de los partidores, por 10 segundos a la temperatura correspondiente para cada pareja de partidores incluida en la tabla 1 (*gdh* y *cutC*), 3) extensión, por 15 segundos a 72 °C y 4) curva de desnaturalización, incremento de la temperatura a una tasa de 0.1 °C/segundo desde la temperatura de asociación de los partidores hasta 99 °C. Este último punto permitió verificar la ausencia de productos inespecíficos en la reacción. Cada muestra de cDNA se cuantificó por triplicado.

La obtención de los datos se realizó utilizando el programa LightCycler Software v3.5 (Roche).

Los resultados se expresaron como la razón de cambio entre la abundancia normalizada del transcrito para el gen pregunta en la muestra control y la muestra tratada. 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 (*housekeeping*), mediante la siguiente ecuación<sup>32</sup>:

$$\text{Ec 1: Razón de cambio normalizado} = \frac{\text{Ef cutC}^{(\Delta\text{Cp})}}{\text{Ef normalizador}^{(\Delta\text{Cp})}}$$

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

$\Delta\text{Cp}$  = Diferencia del ciclo en que se inicia la detección de fluorescencia (punto de cruce o *crossing point*, Cp) entre la muestra control y muestra experimental

## **2.4. Protocolos de caracterización microbiológica**

### **2.4.1. Concentración mínima inhibitoria de cobre (CMI)**

Este ensayo permite determinar la concentración mínima de Cu, en el medio de cultivo, capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Para ello, a partir de un cultivo líquido crecido toda una noche en medio N a 37 °C con agitación, se ajustó un inóculo con una  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1$ , el cual se utilizó en: a) CMI-agar: Se sembraron 5 diluciones seriadas del inóculo (factor de dilución = 10) en diferentes placas con agar N suplementadas con concentraciones crecientes de  $\text{CuSO}_4$  (0 (basal) – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 mM), luego se

incubaron durante 16 h a 37 °C, finalmente se registró la concentración de CuSO<sub>4</sub> en la cual no se observa crecimiento celular para cada una de las diluciones sembradas, b) CMI-caldo: Se adicionó 50 µL del inóculo a tubos con 5 mL de caldo N suplementados con concentraciones crecientes de CuSO<sub>4</sub> (0 (basal) – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5 – 4,0 – 4,5 – 5,0 mM), entonces los cultivos se incubaron durante 16 hs a 37°C con agitación (140 rpm). Pasado este tiempo, se realizó una inspección visual de cada tubo anotando la concentración de CuSO<sub>4</sub> en la cual la turbidez en el medio no se observa. En ambos experimentos la CMI de Cu se definió como la menor concentración de Cu en la cual no se observó crecimiento bacteriano, tanto para la cepa de *E. faecalis* OG1RF silvestre, como para la cepa  $\Delta cutC$ .

#### 2.4.2. 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. A partir de un cultivo líquido, crecido toda la noche en medio N a 37 °C con agitación, se ajustó un inóculo con una OD<sub>600nm</sub> = 0,05 en un matraz control conteniendo 50 mL de medio N y en otros tres matraces experimentales con 50 mL de medio N suplementados con 0,5 - 1,0 o 3,0 mM de CuSO<sub>4</sub>. Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C con agitación a 140 rpm. El crecimiento bacteriano se monitoreó mediante registro de absorbancia y la cuantificación de la viabilidad a través de recuentos en placa cada 1 hora durante las primeras 8 hs y luego una medición final a las 24 hs. Este ensayo se realizó en paralelo en ambas cepas de *E. faecalis* (OG1RF silvestre y  $\Delta cutC$ ), utilizando las mismas condiciones de cultivo. Los valores de

densidad óptica, se utilizaron en el cálculo del tiempo generacional requerido para duplicar la masa de bacterias en un lapso determinado, a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Ec 2: Tiempo generacional} = \frac{\text{Log (B2)} - \text{Log (B1)}}{t2 - t1} \times 95,6$$

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

95,6 = Factor de conversión Ln / Log

### 2.4.3. Contenido intracelular de cobre

Se determinó el contenido intracelular de Cu para las cepas silvestre y *ΔcutC*, utilizando las condiciones de crecimiento, concentración y tiempo de exposición al metal que se utilizaron para los experimentos de extracción de RNA. Desde los cultivos, se obtuvieron directamente, alícuotas ajustadas aproximadamente a una  $DO_{600nm} = 6$  (por duplicado) en cada una de las muestras, las cuales se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 1 min, se les eliminó el sobrenadante y el exceso del metal mediante 3 lavados sucesivos con PBS 1 X, NaCl 0,15 M, glicina 50 mM a pH 3,5, EDTA 1,0 mM, resuspendiendo finalmente las células en 1 mL de PBS. Con el propósito de lisar las células, las muestras se sometieron a 5 pulsos de sonicación de 15 segundos, con 5 segundos de reposo entre cada pulso utilizando un sonicador modelo OMNI-ruptor 250 (OMNI, Kennesaw, EUA).

Inmediatamente lisadas las células, se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 30 min a 4 °C, posteriormente se extrajo independientemente 100 µL del sobrenadante de cada tubo para cuantificación de proteínas, y otros 100 µL para digerirlos con 250 µL HNO<sub>3</sub> 0,1 N ultra puro (Merck) a 75 °C por 24 hs. Finalmente se determinó luego de la digestión el contenido de Cu mediante espectrometría de absorción atómica (AAS) en un horno de grafito SIMMA 6100 (Perkin Elmer), cuyo límite de detección circunda las partes por billón (ppb). Los resultados de cada medición se normalizaron con los valores obtenidos de su cuantificación de proteínas correspondientes.

## **2.5. Análisis estadístico**

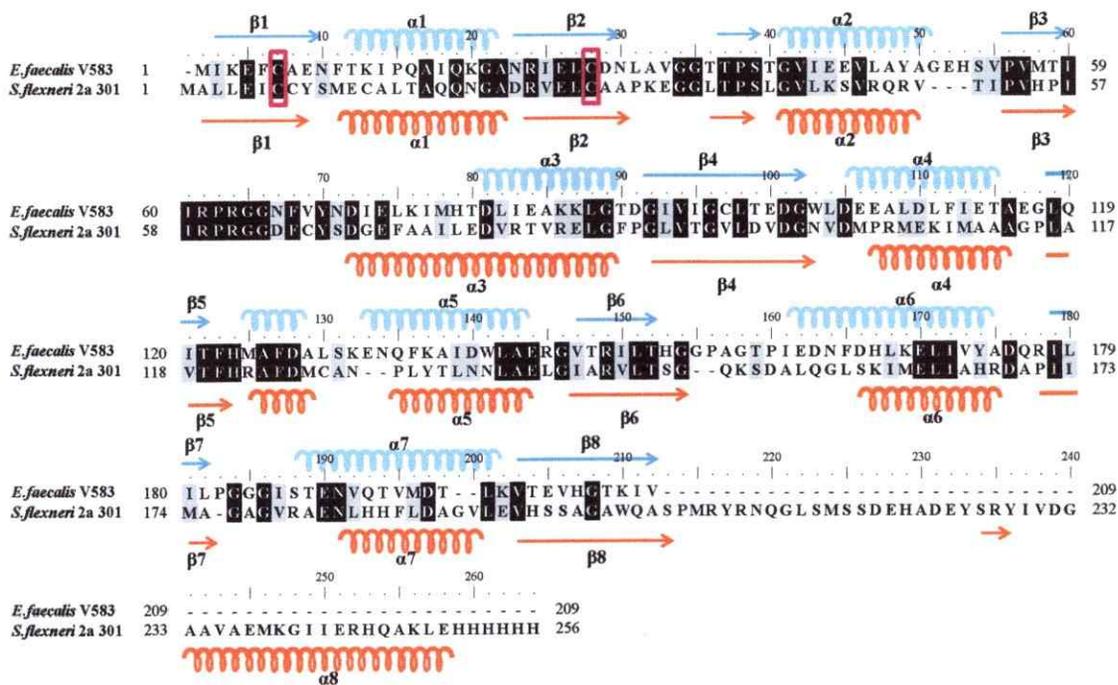
Réplicas técnicas y biológicas para cada experimento se detallan en el pie de las figuras o en la descripción de los protocolos cuando corresponda, reportando el promedio de las mediciones con sus respectivas desviaciones estándar. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un test de ANOVA, utilizando para esto el software GRAPHPAD PRISMA trial v5.0. Para los experimentos de qPCR se utilizó el algoritmo REST reportado en referencia 34. Ambos programas se aplicaron utilizando los parámetros establecidos de base considerando diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

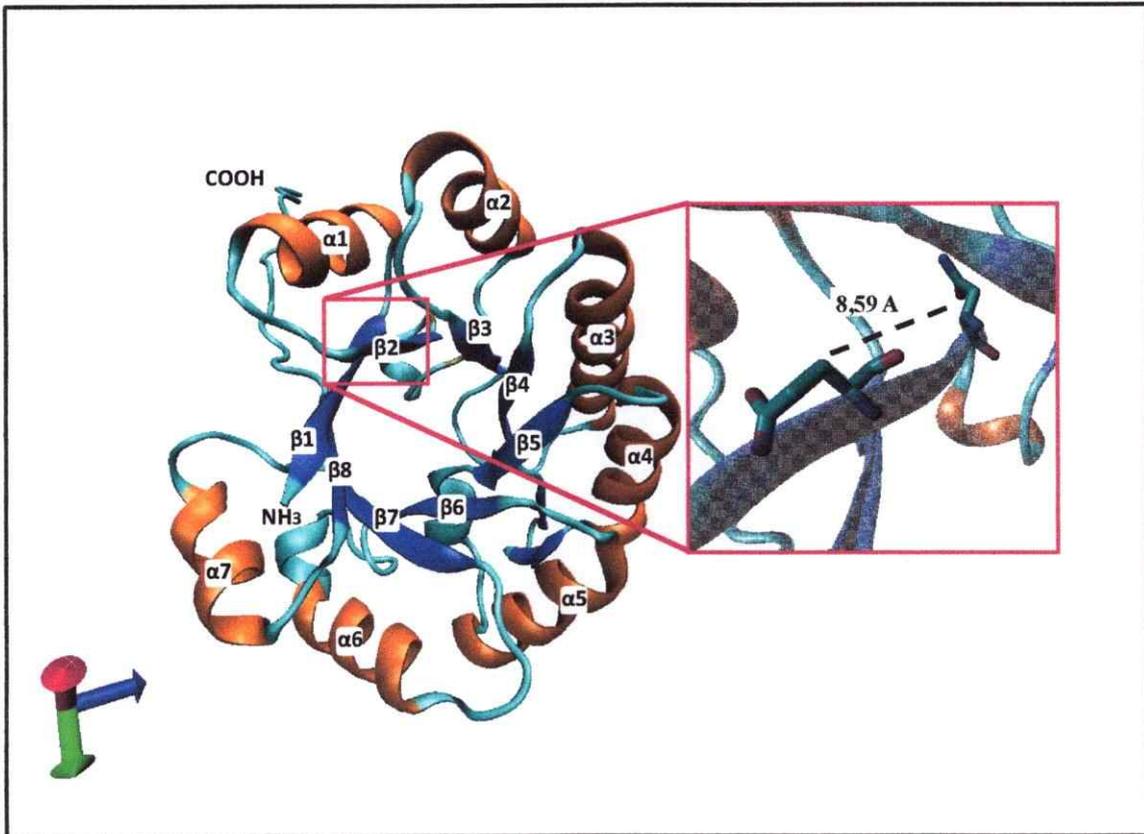
### 1. Caracterización y análisis *in silico*

#### 1.1. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la proteína CutC de *E. faecalis*

La proteína CutC de *E. faecalis* posee un total de 209 aminoácidos codificados en el gen EF2667<sup>24</sup>. Previamente se ha descrito que homólogos de esta proteína exhiben una estructura clásica de la familia de las proteínas con plegamiento del tipo barriles TIM<sup>19</sup>, muy conservada desde organismos procariontes hasta eucariontes, la cual se caracteriza por presentar una configuración tridimensional de ocho láminas betas que conforman un poro central rodeado por ocho hélices alfa, propio de diversas proteínas citoplasmáticas<sup>20</sup>. Con el fin de determinar si CutC de *E. faecalis* mantiene esta característica, se realizó una predicción de la estructura secundaria y terciaria utilizando como template la estructura cristalografiada de CutC obtenida de *S. flexneri*. Si bien, la identidad global a nivel de la estructura primaria entre estas proteínas es cercana al 27 %, la predicción de la estructura secundaria para CutC de *E. faecalis* es prácticamente la misma que CutC de *S. flexneri* (figura 1), es decir presenta un total de 8 láminas betas, intercaladas por 7 hélices alfa, las cuales se distribuyen de igual forma en la secuencia de ambas proteínas. La proyección tridimensional obtenida, es consistente con la predicción de estructura secundaria, en la cual, las 8 láminas betas conforman un poro central rodeado por 7 hélices alfa formando una estructura de barril tipo TIM (figura 2), evidenciando que CutC de *E. faecalis* podría conservar el mismo plegamiento que sus homólogos descritos en otras especies.



**Figura 1. Alineamiento global y predicción de estructura secundaria de CutC de *E. faecalis* y *S. flexneri*.** La figura muestra las secuencias alineadas de CutC de *E. faecalis* V583 (gi|NP\_816304.1) y *S. flexneri* 2a 301 (gi|1TWDA). Con fondo negro se destacan los residuos idénticos y en gris los similares. Rectángulos en rojo indican cisteínas conservadas en el extremo amino terminal del alineamiento. Símbolos azules y naranjas corresponden a la predicción de estructura secundaria (flechas = lámina beta  $\beta$ , espiral = hélice alfa  $\alpha$ ) para la secuencia de CutC de *E. faecalis* y *S. flexneri* respectivamente. Hélices alfa y láminas beta que conforman el poro central se encuentran enumeradas.



**Figura 2. Proyección tridimensional de la estructura terciaria predicha para CutC de *E. faecalis*.** El modelo muestra la disposición de un monómero de la proteína CutC en tres planos (X rojo, Y verde, Z azul). En naranja y azul se marcan las hélices alfa y láminas beta respectivamente, enumeradas de amino a carboxilo terminal las que constituyen el poro central. El cuadrante rojo es un acercamiento de las cisteínas 6 y 27 conservadas en las especies del orden (ver figura 3). La línea punteada negra indica la distancia entre los carbonos centrales de ambas cisteínas.

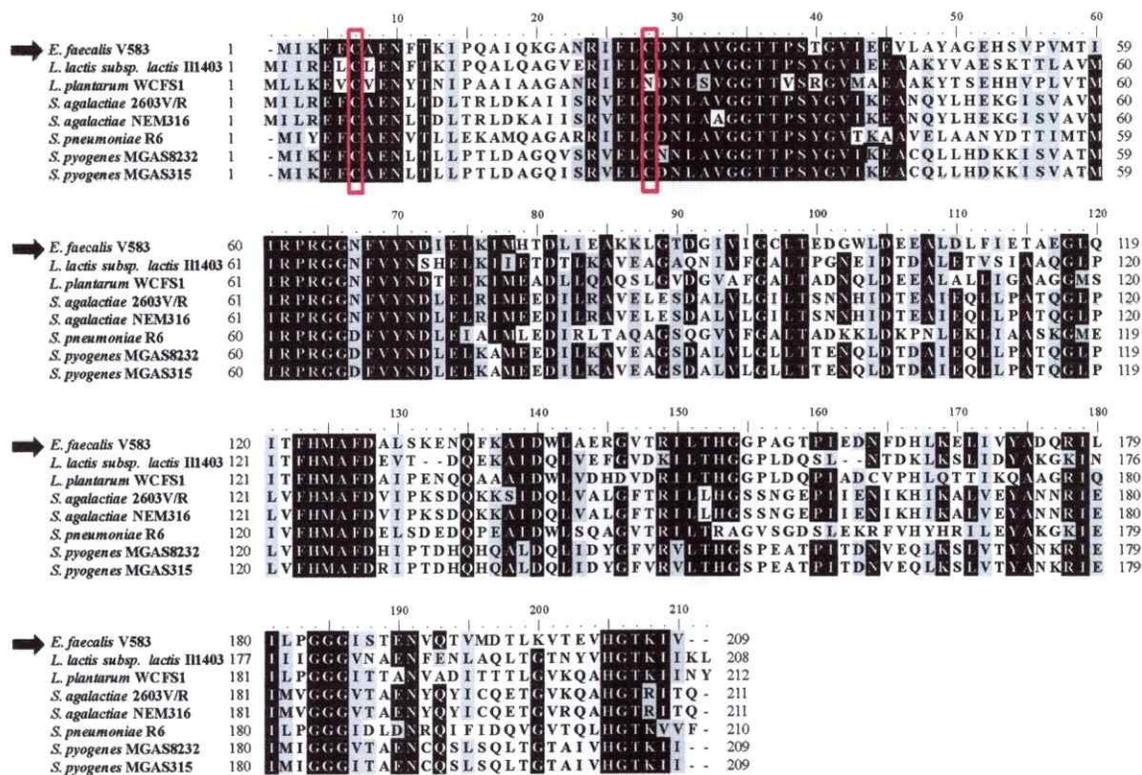
## 1.2. Grado de conservación de la proteína y operón *cutC* en especies del orden *Lactobacillale*

Con el objetivo de determinar el grado de conservación de la proteína en especies del orden *Lactobacillale*, se utilizó el algoritmo BlastP en la búsqueda de homólogos de esta proteína en nueve especies del mismo orden con su genoma secuenciado, las cuales presentan un operón *tipo-cop* codificado<sup>15</sup>.

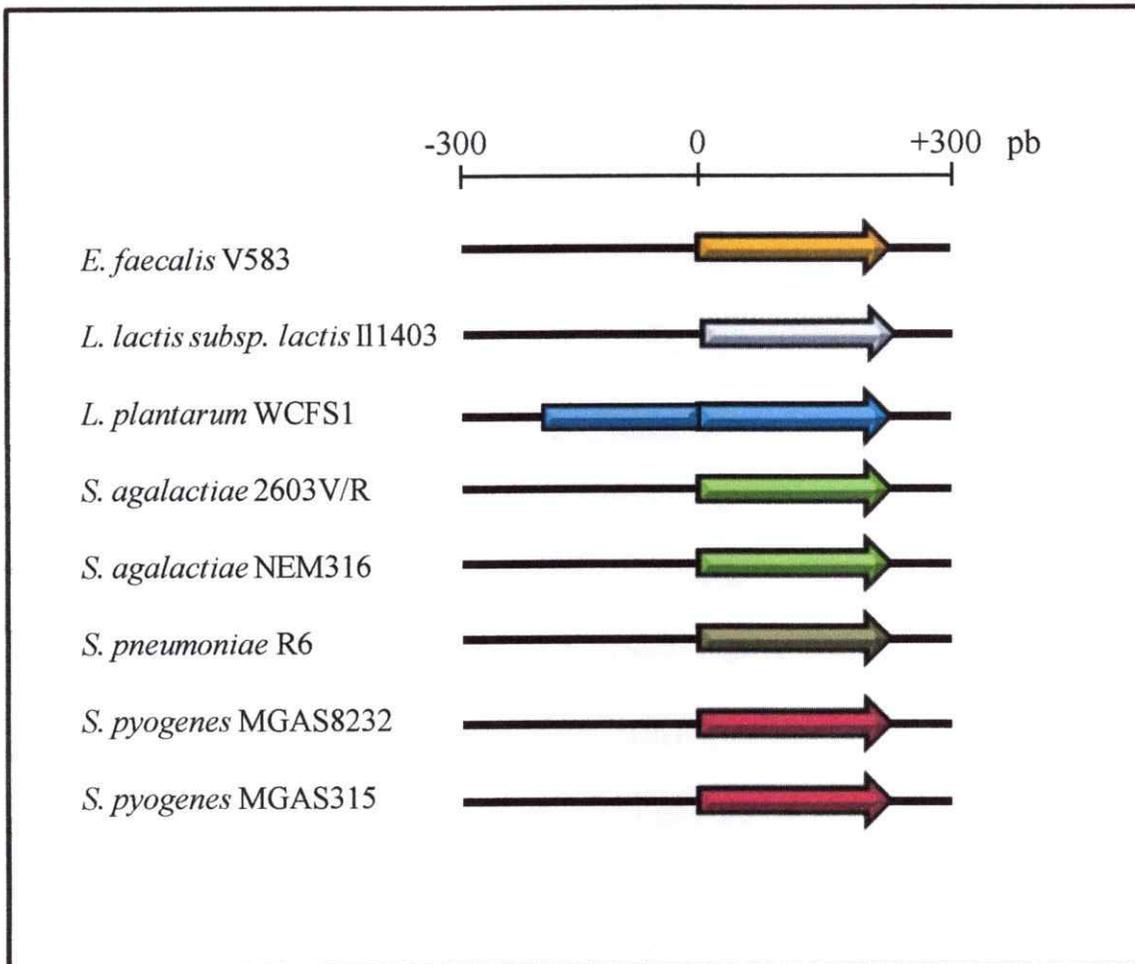
Los resultados muestran que la proteína CutC se encuentra codificada, además de en *E. faecalis*, en siete cepas bacterianas del orden distribuidas en cinco especies: *S. agalactiae*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. La figura 3, presenta el alineamiento global realizado a través del programa ClustalW de las proteínas CutC identificadas. En general, se observa un alto porcentaje de identidad global (sobre el 45%) distribuida en forma homogénea a lo largo de la proteína y un tamaño similar (cercano a los 210 residuos) a CutC de *E. faecalis*. Con respecto a la identificación de residuos potencialmente involucrados en la coordinación de Cu, todas las proteínas analizadas contienen un par de cisteínas altamente conservadas en el extremo amino terminal, residuos que presenta una alta frecuencia de aparición en proteínas que unen metales.

Diversos antecedentes, dan cuenta que los genes que participan en la homeostasis de Cu conservan su organización en operones dentro de las especies del orden *Lactobacillale*<sup>13</sup>. Basados en esto y utilizando el programa SHOPS, se comparó la organización de *cutC* de *E. faecalis* con las cinco especies identificadas en el punto anterior. Los resultados muestran que, a excepción de *L. plantarum*, *cutC* conserva su estructura de operón monocistrónico en las demás especies del orden, es decir no comparte

el mismo operón con otros genes del genoma, transcribiéndose posiblemente como una unidad transcripcional independiente (figura 4).



**Figura 3. Alineamiento global de las secuencias aminoacídicas de CutC identificadas en especies del orden *Lactobacillales*.** La figura muestra las secuencias alineadas de CutC de: *E. faecalis* V583 (gi|NP\_816304.1), *L. lactis subsp. lactis* III1403 (gi|NP\_268151), *L. plantarum* WCFS1 (gi|NP\_785710), *S. agalactiae* 2603V/R (gi|NP\_688561.1), *S. agalactiae* NEM316 (gi|NP\_736057), *S. pneumoniae* R6 (gi|NP\_358732), *S. pyogenes* MGAS315 (gi|NP\_606692) y *S. pyogenes* MGAS8232 (gi|NP\_606692.1). Residuos idénticos y similares se destacan en fondo negro y gris respectivamente. Cajas rojas indican cisteínas conservadas en el extremo amino terminal del alineamiento.



**Figura 4. Organización de *cutC* en el genoma de las diferentes especies del orden *Lactobacillales*.** Los genes corresponden a las especies listadas en la figura 3. La flecha en color representa el gen *cutC* dentro del genoma de cada especie. Los números representan el tamaño en pares de bases (pb) de la región genómica mostrada en la figura. el valor 0 indica el inicio de la traducción de la proteína de cada gen. Para el caso de *L. plantarum* WCFS1, el rectángulo azul corresponde al gen (gi|NP\_785710.1) que codifica para una proteína sin función conocida que forma parte del operón de *cutC*.

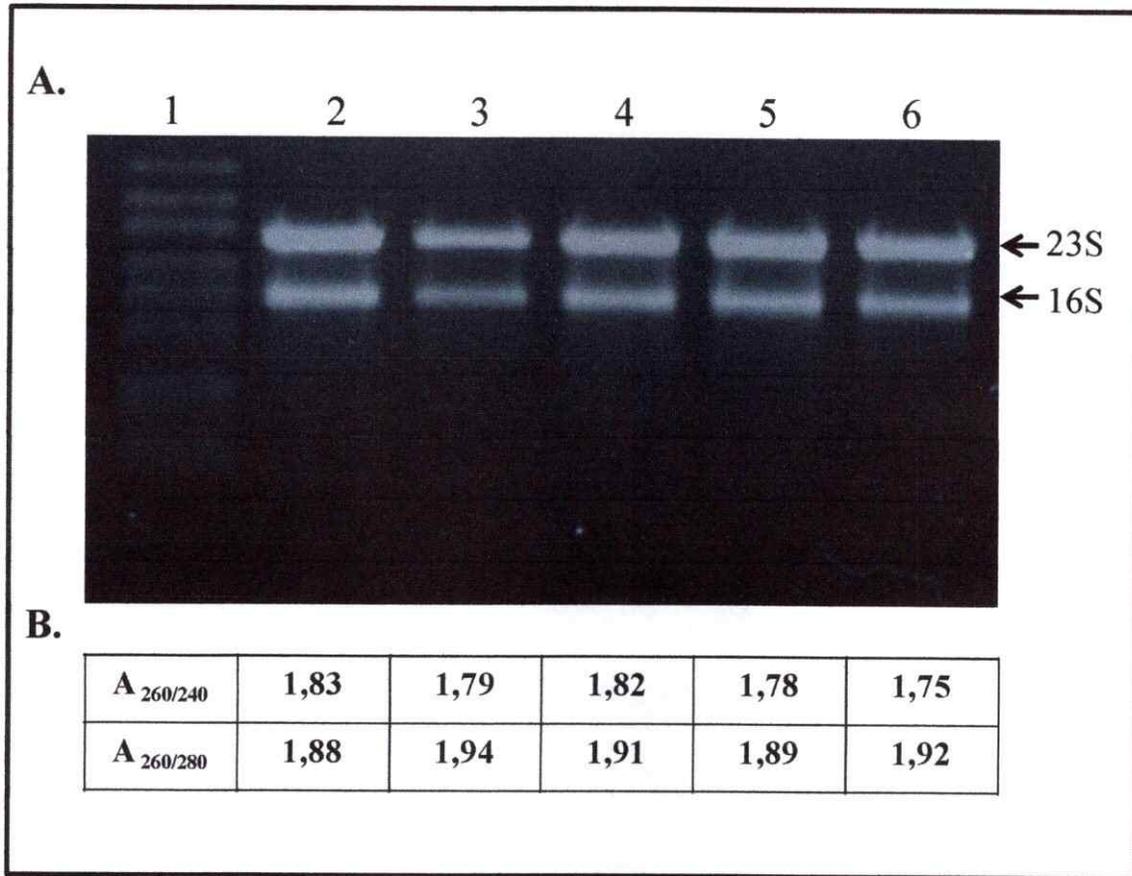
## 2. Determinación de la abundancia del transcrito de *cutC* en cultivos de *E. faecalis* expuestos a Cu

### 2.1. Verificación de la calidad de las muestras de RNA y cDNAs

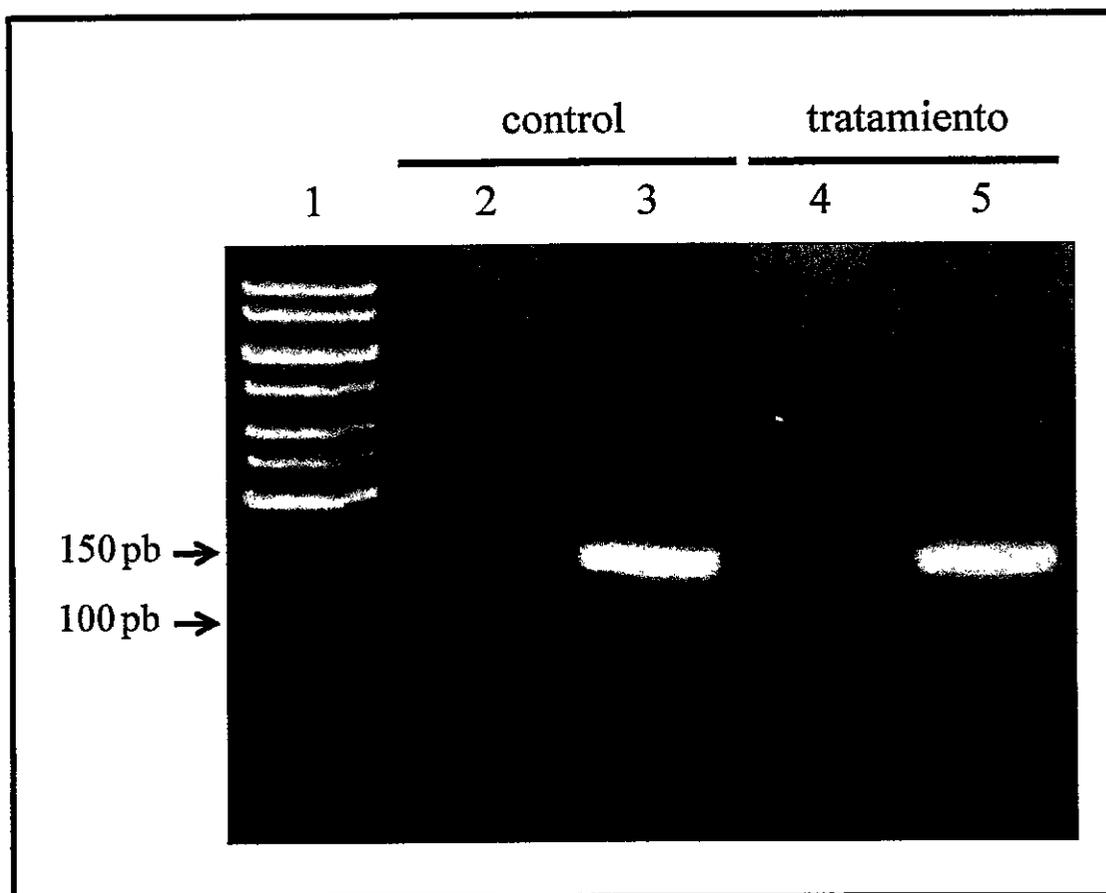
Se generó un total de 16 muestras de RNA, que corresponden al duplicado de cuatro cultivos de *E. faecalis* expuestos por distintos tiempos a Cu y sus correspondientes controles mantenidos sin suplemento del metal. Es importante mencionar que remanentes de Cu, aún presentes después de los lavados realizados tras la extracción del RNA, pueden degradar las muestras y distorsionar todas las lecturas siguientes. Por este motivo, las muestras se sometieron a diversos controles de calidad tanto para el RNA obtenido, como para el cDNA sintetizado. En primer lugar se realizó una electroforesis en geles denaturantes de agarosa, con el objetivo de observar la presencia de los RNAs ribosomales 16S y 23S (figura 5A). En todas las muestras, se observó claramente la migración de dos bandas bien definidas del tamaño indicado para ambos RNA, dando cuenta de la integridad del RNA extraído. El segundo criterio utilizado, fue la medición de las razones de absorbancia 260/280 nm y 260/240 nm; consistente con una calidad adecuada, los rangos para el cociente 260/280 nm fluctuaron entre 1,8 y 2,1; y para el cociente 260/240 nm, los valores se encontraron entre los valores 1,7 y 1,9 para todas las muestras analizadas (figura 5B).

La ausencia de DNA en las muestras de RNA y la presencia de cDNA luego de la retrotranscripción, se verificó a través de PCR convencional utilizando partidores para la amplificación del transcrito *cutC*. La figura 6 da cuenta de la migración de dos muestras representativas (control y expuesta a 0,5 mM por 135 min) de RNA y cDNA posterior a la

reacción de PCR. Acorde con lo esperado, en la imagen no se observa la presencia de amplificación en las muestras de RNA y por el contrario, se distingue claramente un amplicón del tamaño correspondiente a un segmento del transcrito *cutC* en ambas muestras de cDNA sintetizado, cercano a las 140 pb. Estos resultados permitieron verificar la pureza del RNA y presencia de cDNA, el cual fue utilizado en los siguientes ensayos de qPCR.



**Figura 5. Verificación de la calidad de los RNAs.** El panel A muestra la migración en una electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa al 1,5% de los RNA extraídos desde los cultivos de *E. faecalis* control (carril 2) y tratado con 0,5 mM de  $\text{CuSO}_4$  (exposición 15 min carril 3, 45 min carril 4, 90 min carril 5 y 135 min carril 6). Las flechas indican la migración de las subunidades mayores (23S) y menores (16S) del RNA ribosomal. Se utilizó como estándar de tamaño 1  $\mu\text{g}$  de RNA *ladder* de Invitrogen. El panel B describe las razones de absorbancia obtenidos en las diferentes longitudes de onda en cada una de las muestra de RNA.



**Figura 6. Verificación por PCR convencional de la calidad de los RNAs y cDNAs.** La figura muestra los productos de amplificación por PCR convencional de las muestras de RNA (carriles 2 y 4) y cDNAs (carriles 3 y 5) para las muestras de *E. faecalis* control y tratamiento con 0,5 mM de CuSO<sub>4</sub> durante 135 min. El carril 1 corresponde al estándar de tamaño 50 bp DNA ladder (Invitrogen).

## 2.2. Validación del gen normalizador *gdh* para ensayos de qPCR en las muestras de cDNA

Diferencias en las cantidades de RNA entre las muestras, así como diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción durante la síntesis de cDNA, son fuentes de potenciales errores experimentales en la cuantificación a través de los ensayos de qPCR, dificultando la comparación directa de la abundancia de los diferentes transcritos entre las muestras del estudio. Con el propósito evitar estos errores, se hace necesaria la utilización de un gen normalizador que permita corregir estas diferencias. Con esta finalidad, se utiliza un gen que en teoría, no presenta diferencias significativas a nivel de abundancia de transcrito entre las muestras control y los diferentes tratamientos y además, presenta una baja variabilidad en cada una de las mediciones. Este gen se denomina gen normalizador o *housekeeping*. Estudios previos realizados en *E. faecalis*, y verificados por nuestro laboratorio<sup>15, 33</sup>, registran el uso del gen EF1004 que codifica para la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (enzima implicada en metabolismo basal) como normalizador, el cual cumple con todas las características mencionadas. Brevemente, los datos indican que el transcrito de EF1004, no exhibe diferencias significativas entre el ciclo en el cual se empieza a detectar el aumento de fluorescencia (punto de cruce o *crossing point*, Cp) de las muestras control y las experimentales, dando cuenta de cantidades totales de RNA equivalentes iniciales entre muestras<sup>34</sup>. De un total de 3 mediciones independientes para cada muestra, efectivamente no se identificaron diferencias significativas entre los Cp de las mediciones, estableciéndose razones de abundancia de alrededor de 1 (tabla 2).

Por otra parte, la ejecución del qPCR requiere considerar principalmente el diseño, tiempo y temperatura de asociación de los partidores; basados en el principio de

amplificación de la técnica de PCR, la eficiencia máxima esperada en cada ciclo de amplificación deber ser cercana a 2, siendo valores superiores a 1,6 aceptados como correctos<sup>34</sup>. En los qPCR que se realizaron en las 16 muestras de cDNA, los valores de eficiencias fueron superiores a 1,7 por cada ciclo, dando cuenta de una correcta aplicación de la técnica.

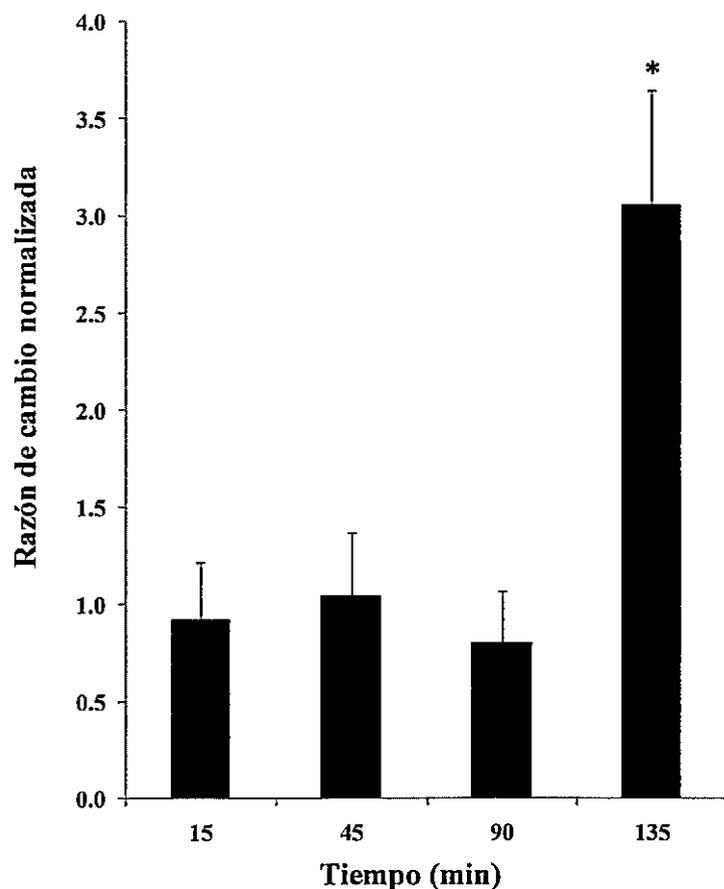
**Tabla 2. Determinación de la abundancia del normalizador *gdh*.** Los valores de Cp indicados, son el promedio de las dos réplicas biológicas por muestra cuantificadas en triplicado mediante qPCR con su respectiva desviación estándar. La razón de abundancia ( $Ef^{\Delta Cp}$ ) se calculó a través de la ecuación 1 (ver sección 2.3.4. de MyM).

Muestra	Cp control	Cp tratamiento	$Ef^{\Delta Cp}$
15 min	15,09 ± 0,27	15,12 ± 0,35	1,05 ± 0,21
45 min	15,28 ± 0,23	15,31 ± 0,28	1,11 ± 0,14
90 min	15,18 ± 0,34	15,05 ± 0,44	0,95 ± 0,46
135 min	15,22 ± 0,25	15,28 ± 0,38	1,18 ± 0,36

### 2.3. Cuantificación por qPCR de la abundancia del transcrito *cutC* en cultivos de *E. faecalis*

Este ensayo nos permitió cuantificar la abundancia del transcrito para los genes *cutC* en muestras de cDNA generadas independientemente a partir de dos series de cultivos celulares (muestras control y tratamiento, pareadas en una cinética de exposición a Cu durante 15, 45, 90 y 135 min). La elección de estas condiciones se basó en la utilización de una concentración y tiempos de exposición a Cu que no afectasen la viabilidad celular, la cual se determinó en estudios previos realizados en nuestro laboratorio. En ellos se determinó que una concentración máxima de 0,5 mM no produce cambios en la densidad óptica, ni en el recuento de células viables entre la condición control y la tratada<sup>15</sup>.

La figura 7, presenta los resultados de qPCR obtenidos en un total de seis mediciones para cada una de las condiciones en estudio. El gráfico muestra que no existen diferencias significativas de abundancia de transcrito entre los cultivos control y tratados en los tiempos 15, 45 y 90 min de exposición a Cu. Sin embargo, una exposición prolongada de 135 min, muestra un aumento cercano a 3 veces en la abundancia en comparación al cultivo sin exposición. Estos resultados sugieren una respuesta transcripcional de *cutC* a largos períodos de exposición al metal, dando cuenta de una posible respuesta tardía del gen frente al estímulo de Cu.

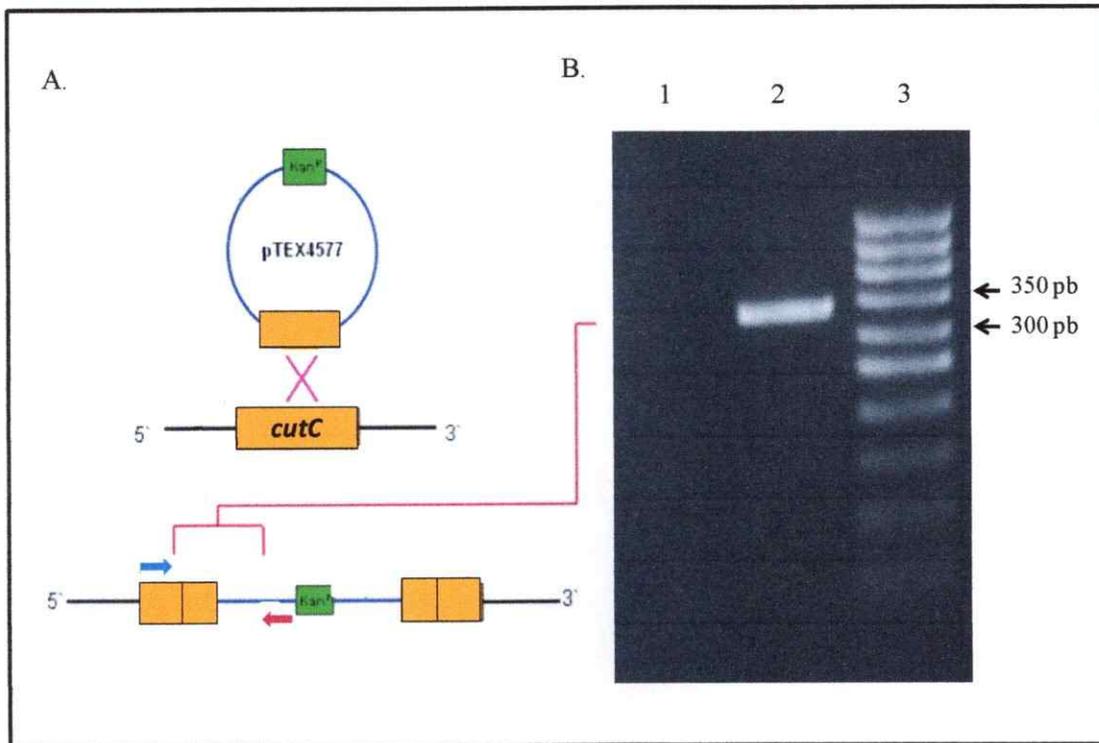


**Figura 7. Abundancia relativa del transcrito *cutC* cuantificada mediante qPCR.** El gráfico muestra la razón de abundancia relativa al normalizador *gdh* (EF1004) entre las muestras tratamiento (15, 45, 90 y 135 min de exposición con 0,5 mM de  $\text{CuSO}_4$ ) y control. Los valores corresponden al promedio de seis mediciones (2 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas). El asterisco da cuenta de diferencias significativas de abundancia entre la muestra control y tratamiento (REST,  $p < 0.05$ ).

### 3. Caracterización de la cepa mutante para el gen *cutC* de *E. faecalis*

#### 3.1. Verificación de la mutación del gen *cutC* en la cepa de *E. faecalis* OG1RF

La generación de la cepa mutante para el gen *cutC* de *E. faecalis* ( $\Delta cutC$ ) se llevó a cabo mediante la técnica de disrupción genética, la cual consistió básicamente en interrumpir el gen mediante la inserción por recombinación homóloga del vector pTEX4577-*cutC*. Debido a que el vector puede transponer a otras regiones del genoma, se verificó la inserción del vector y disrupción específica de *cutC* con el objeto de verificar el correcto uso de la cepa mutante. Para ello se realizó un PCR convencional en colonia capaz de amplificar solamente un segmento del gen *cutC* y el vector pTEX4577. Como control negativo de la mutación, se utilizó la cepa silvestre de *E. faecalis* OG1RF; los resultados de la amplificación y el esquema del diseño experimental se muestran en la figura 8. El amplicón obtenido posee un tamaño cercano a los 340 pb, el cual corresponde al esperado utilizando la pareja de primarios  $\Delta cutC_s$  y pTEX4577\_a, dato que confirma la interrupción del gen producto de la inserción del vector.



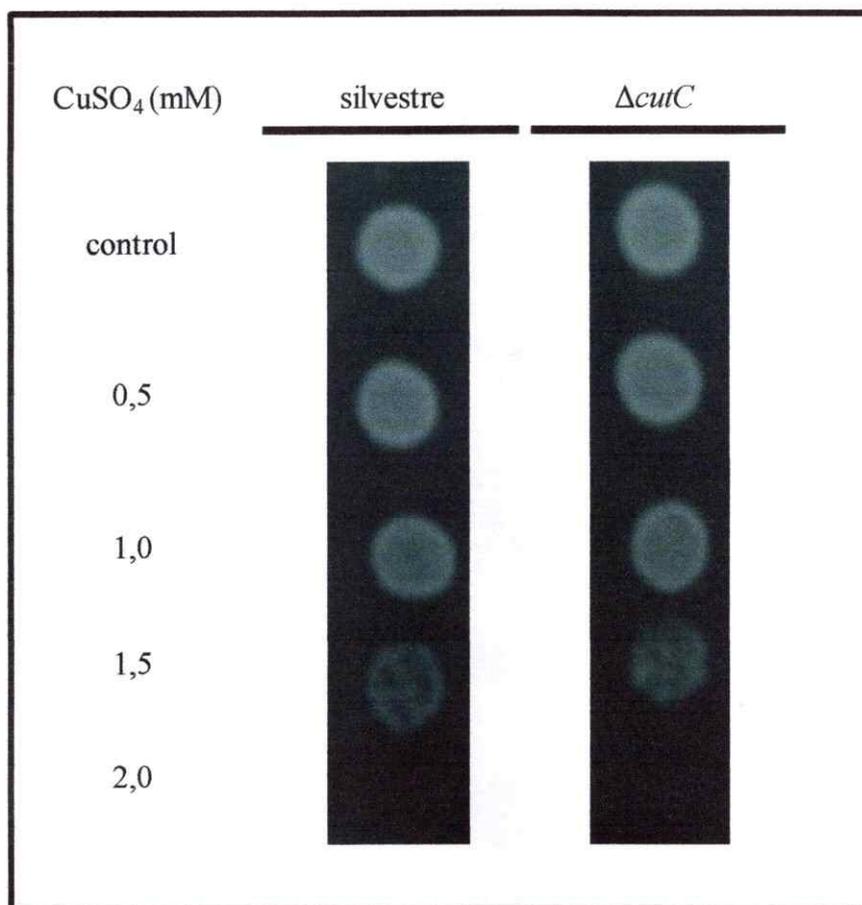
**Figura 8. Esquema del diseño y verificación de la mutación  $\Delta cutC$  de *E. faecalis*.** El panel A muestra la inserción del vector pTEX4577-*cutC* (caja verde = gen de resistencia a kanamicina, caja naranja = región central de 430 pb del gen *cutC* clonada en el vector) en la región genómica de *cutC* en *E. faecalis*. Flechas azules y rojas corresponden a los partidores  $\Delta cutC_s$  y pTEX4577<sub>a</sub> respectivamente. El panel B muestra el resultado de la amplificación un fragmento del vector y el gen *cutC* de *E. faecalis*, carril 1 cepa silvestre, carril 2 cepa mutante  $\Delta cutC$  y carril 3 estándar de tamaño 50 bp DNA ladder (Invitrogen).

### 3.2. Concentración mínima inhibitoria de cobre (CMI)

El propósito del presente experimento fue determinar el rango de concentraciones de Cu en los cuales se producen cambios en la viabilidad celular en la cepa mutante y silvestre, para luego verificar el efecto del metal sobre la velocidad de crecimiento en función del tiempo, a través de una curva de crecimiento. Estudios previos habían permitido determinar que la cepa silvestre no es capaz de sobrevivir a concentraciones extracelulares de  $\text{CuSO}_4$  superiores a 4,0 mM en caldo y 2,0 mM en agar, a diferencia de la cepa mutante para la proteína transportadora de eflujo CopA ( $\Delta\text{copA}$ ), cuya viabilidad es más sensible frente a concentraciones crecientes del metal, lo cual se refleja en una disminución a la mitad en la CMI tanto para caldo, como para en agar en comparación con la cepa silvestre<sup>15</sup>.

Tomando en cuenta estos antecedentes, se determinó la CMI para la cepa  $\Delta\text{cutC}$  de *E. faecalis*. Los resultados indican que la cepa mutante para el gen *cutC* no tolera concentraciones superiores a 4,0 mM y 2,0 mM en cultivos de agar y caldo respectivamente, valores que no presentan diferencias significativas en comparación con los de la cepa silvestre (figura 9), luego de observar las placas de cultivo suministradas con diferentes concentraciones de Cu y la inspección visual (ausencia de turbidez) en los cultivos líquidos, luego de la administración del metal durante 24 horas de cultivo.

A.



B.

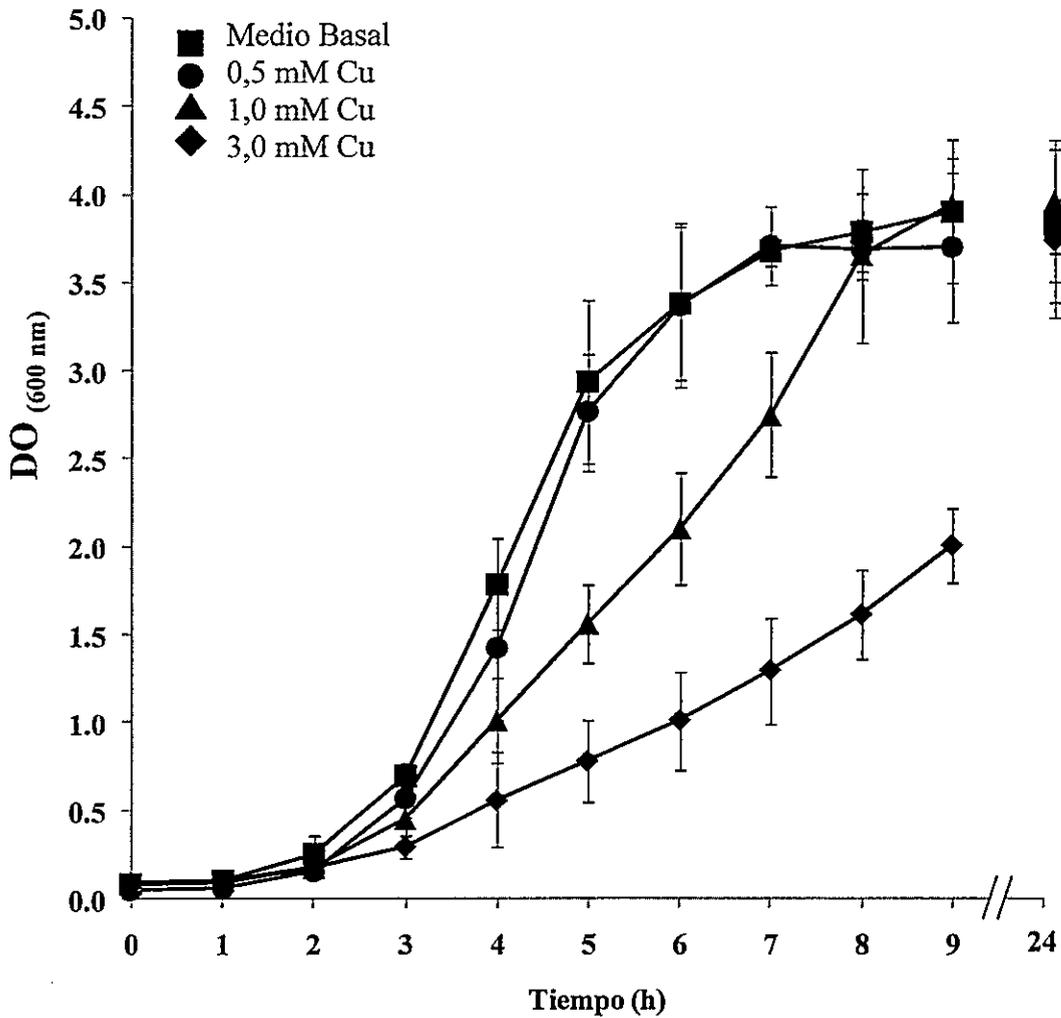
Cepa	CMI-caldo
silvestre	4,0 ± 0,5
$\Delta cutC$	4,0 ± 0,5

**Figura 9. Concentración mínima inhibitoria de Cu en agar y caldo.** El panel A muestra el resultado del crecimiento en placa (control agar N) de la cepa silvestre y  $\Delta cutC$  de *E. faecalis* expuesta a diferentes concentraciones de Cu en el medio (CMI-agar). El panel B da cuenta del resultado obtenido en el ensayo de CMI-caldo, el valor corresponde al promedio y desviación estándar de la concentración mínima de  $CuSO_4$  (mM) en la cual no se observó turbidez en el medio de cultivo líquido (n=3).

### 3.3. Curvas de crecimiento

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de la cepa  $\Delta cutC$  en el tiempo a diferentes concentraciones de  $CuSO_4$  en el medio de cultivo. Basados en los resultados obtenidos en los experimentos de CMI-caldo, se utilizaron cuatro concentraciones Cu, basal (cercana a 2  $\mu M$  propio del medio N utilizado), intermedia (0,5 mM), alta (1,0 mM) y extrema (3,0 mM). Como se muestra en la figura 10, la curva de crecimiento para la cepa  $\Delta cutC$  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 horas), lo que se refleja en un aumento significativo y progresivo del tiempo generacional, calculado en estas condiciones en comparación a la curva generada a una concentración basal de Cu (tabla 3).

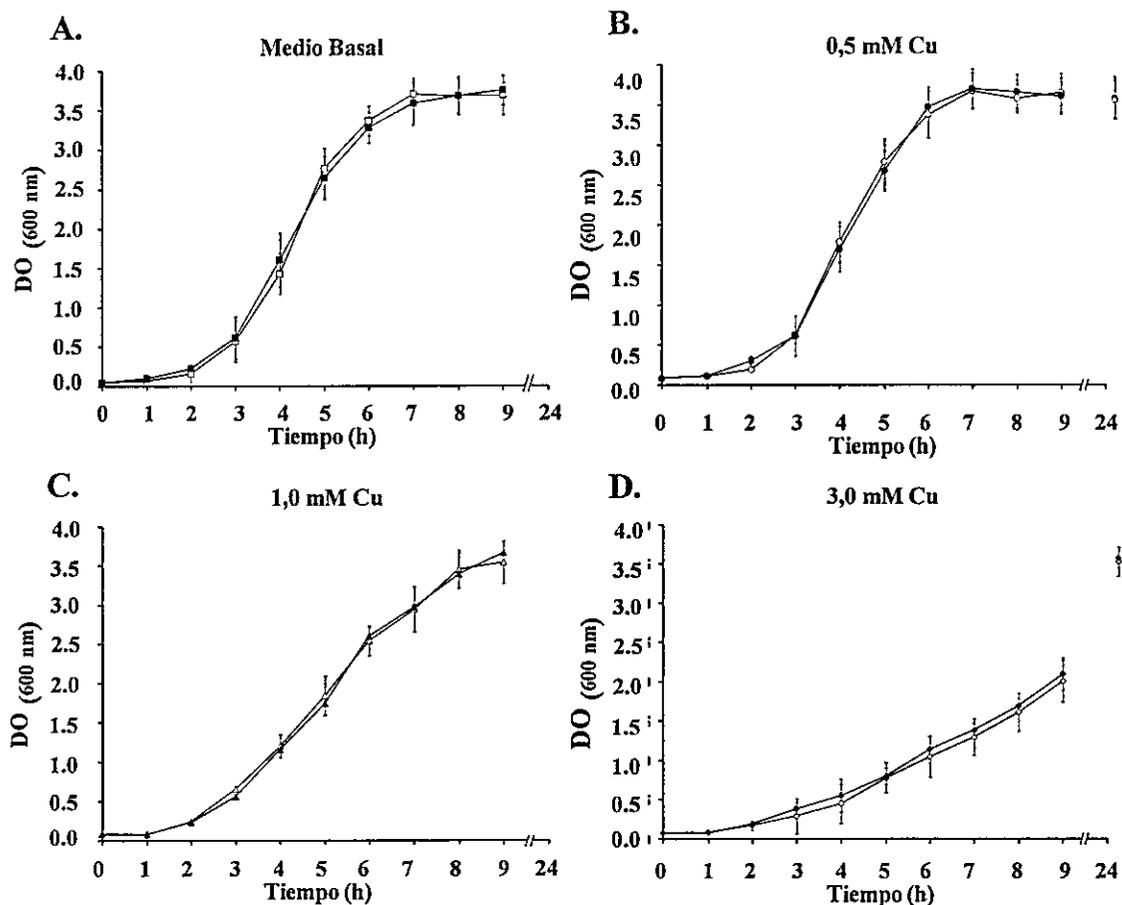
Previamente se había identificado que la cepa silvestre de *E. faecalis* crecida en un medio suplementado con 1 y 3 mM de  $CuSO_4$ , aumenta significativamente su tiempo generacional en comparación al crecimiento en medio basal, evidenciando la sensibilidad en la viabilidad que presenta la bacteria frente a la exposición al metal<sup>15</sup>. Considerando estos resultados, se realizaron bajo las mismas condiciones de cultivo (en paralelo), curvas de crecimiento y luego se calculó el tiempo generacional en ambas cepas ( $\Delta cutC$  y silvestre; figura 11 y tabla 3). Los resultados reflejan que la cepa  $\Delta cutC$  en todas las condiciones de exposición utilizadas, no presenta diferencias significativas tanto en las curvas de crecimiento como en los tiempos generacionales, corroborando lo datos en los experimentos de CMI.



**Figura 10. Efecto de la exposición a Cu sobre el crecimiento la cepa  $\Delta cutC$ .** El gráfico representa la curva de crecimiento de la cepa mutante  $\Delta cutC$  expuestas a diferentes concentraciones de Cu (basal, tratamientos con 0,5 mM, 1,0 mM y 3,0 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.

**Tabla 3. Tiempo generacional para las cepas silvestre y  $\Delta cutC$  de *E. faecalis* expuestas 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 10, calculados mediante el uso de la ecuación 2 (ver sección 2.4.2 de MyM). Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas con su respectiva desviación estándar.

CuSO <sub>4</sub> (mM)	Tiempo generacional (min)	
	Silvestre	$\Delta cutC$
control	44,2 ± 5,2	43,9 ± 4,9
0,5	46,2 ± 6,1	48,3 ± 6,1
1,0	62,1 ± 4,9	65,9 ± 5,5
3,0	91,2 ± 5,6	89,1 ± 4,9

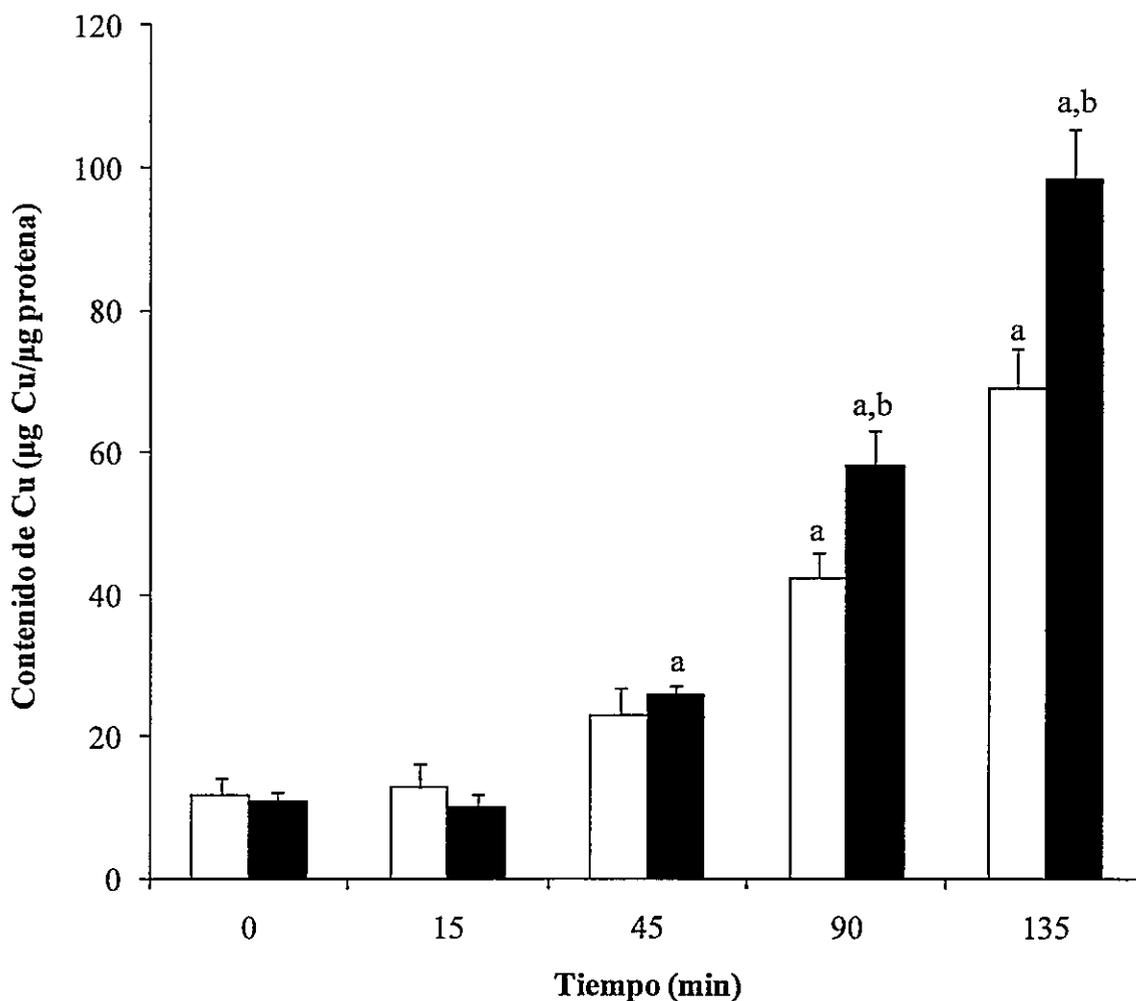


**Figura 11. Curva de crecimiento de las cepas silvestre y  $\Delta cutC$  expuestas a Cu.** En los paneles A-D, se presentan los valores de absorbancia (DO<sub>600 nm</sub>) obtenidos durante el crecimiento de la cepa silvestre de *E. faecalis* (figuras blancas,  $\square \circ \triangle \diamond$ ) y mutante  $\Delta cutC$  (figuras negras,  $\blacksquare \bullet \blacktriangle \blacklozenge$ ) expuestas a diferentes concentraciones de Cu: panel A medio basal, panel B, C y D tratamientos con Cu. Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error corresponden a la desviación estándar.

### 3.4. Contenido intracelular de Cu

Finalmente, 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 mediante sonicación<sup>15</sup>. Al comparar el contenido entre una cepa silvestre y una mutante para un gen en particular, el ensayo permite sugerir una posible participación de la proteína ausente sobre en los mecanismos de homeostasis del metal encargados de la acumulación, captación y eflujo, sin embargo, no da cuenta del tráfico intracelular del Cu. Por consiguiente, se estudió el efecto de la ausencia de la proteína CutC sobre la cantidad de Cu intracelular. Para ello, bajo las mismas condiciones en las cuales se extrajo RNA para los experimentos de qPCR (16 muestras totales), se cuantificó la concentración intracelular del metal.

Los datos indican que en la cepa  $\Delta cutC$  al igual que la cepa silvestre, aumenta significativamente el contenido de Cu intracelular en función del aumento del pulso extracelular utilizado, llegando a aumentar este valor hasta 10 veces a los 135 min de exposición en comparación al tiempo cero de tratamiento (figura 12). Además, se observa que a partir de los 90 minutos la cepa mutante muestra una diferencia significativa en el contenido del metal al compararla con la cepa silvestre. Estos resultados, sugieren la participación de la proteína CutC en el mecanismo de eflujo del metal.



**Figura 12. Contenido intracelular de Cu en las cepas silvestre y  $\Delta cutC$  expuestas a Cu.** El gráfico muestra la acumulación de Cu en el tiempo de la cepa silvestre (barras blancas) y mutante  $\Delta cutC$  de *E. faecalis* (barras negras) medida en tres réplicas biológicas con dos réplicas técnicas de medición de absorbancia. La letra a corresponde a diferencias significativas entre la condición control (tiempo cero) y el tratamiento, la letra b da cuenta de diferencias significativas para una condición entre la cepa silvestre y mutante  $\Delta cutC$ . ANOVA test  $p < 0.05$ .

## DISCUSION

Dada 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 las proteínas involucradas en este proceso. Es en este contexto, la presente tesis puso a prueba la participación de CutC dentro de la homeostasis del Cu en la bacteria *E. faecalis*, planteándose una hipótesis de trabajo, que exploró la conexión entre la respuesta transcripcional del gen y el efecto de su ausencia frente a cambios temporales en la disponibilidad del metal. Tomando esto último en consideración, a continuación, se discutirán los diversos aspectos referentes a la metodología y resultados obtenidos que permitieron avanzar en responder las preguntas y objetivos planteados.

### *Caracterización y análisis in silico*

Se diseñó una estrategia *in silico* en la cual se utilizaron diversos algoritmos bioinformáticos que permitieron caracterizar a CutC de *E. faecalis*, integrando la información disponible para esta proteína en otras especies. Mediante el uso, principalmente, de los datos cristalografiados de CutC de *S. flexneri*; se logró obtener una predicción de la estructura secundaria y terciaria (Figuras 1 y 2) para la proteína. Los resultados de ambos modelos, proponen a CutC de *E. faecalis* como un posible componente

de la familia de barriles tipo TIM, con una cadena polipeptídica que se dispone espacialmente con siete alfa hélices que rodean un poro central formado por ocho láminas beta. Adicional a esta información, actualmente también se sabe que proteínas de ésta familia, son capaces de coordinar metales divalentes. Tal es el caso de las enzimas fosfotriesterasa (detoxificación de organofosfatos)<sup>35</sup> y aminoacilasa (síntesis de aminoácidos)<sup>36</sup> que utilizan átomos de zinc como co-factores, siendo esta última inhibida además por Cu y Cadmio.

En la secuencia de CutC de *E. faecalis*, y en directa relación con su posible capacidad de interacción con Cu, se identificaron dos cisteínas (C6 y C27) dentro del barril (láminas beta1 y beta2), las cuales se encuentran conservadas en CutC de *S. flexneri* (Figura 1), siendo este aminoácido el que presentó una mayor frecuencia de aparición en motivos destinados a coordinar este metal<sup>17</sup>. Al rastrear el motivo generado por estas dos cisteínas (C-x(20)-C) en la base de datos construida (Cu-PDB), se encontró una alta similitud con los motivos C-x(2)-C-x(21)-C y C-x(18)-C presentes en el dominio cristalografiado de una metalotioneína obtenida desde la levadura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>37</sup>, proteína encargada de la reserva de Cu celular. Sin embargo, dadas las propiedades fisicoquímicas del metal, para establecer una unión estable con la proteína, se requieren de al menos 4 residuos, los cuales en general, no deben tener una distancia mayor de 10 Å entre ellos<sup>17, 38</sup>. Tomando esto en consideración, una opción de coordinación que permitiría adjudicar funcionalidad al motivo de 2 cisteínas conservadas, es la estructura cuaternaria que adopta la proteína, tal como declaran los autores del estudio cristalográfico. Al parecer, CutC opera como un homodímero constituido por los dos barriles TIM<sup>19</sup>, siendo esta configuración la que probablemente, permitiría establecer la coordinación utilizando el par de cisteínas presentes en ambos monómeros. Una segunda opción, es sustentada por el hecho que dentro de la

misma secuencia de CutC de *E. faecalis*, también encontramos dos residuos de glicinas conservados (G33 y G34) entre la lámina beta 2 y la hélice 3 de la estructura cercana, las cuales, además de las cisteínas, también pueden establecer interacciones electrostáticas con el Cu<sup>17</sup>, constituyéndose así, el plano de coordinación requerido para la unión del metal en la proteína ya que se encuentra dentro del rango de 10 Å en el modelo predicho.

Una vez finalizado el análisis de la estructura de la proteína, y tomando en consideración el conocimiento adquirido sobre la homeostasis de Cu dentro del orden *Lactobacillales*<sup>13</sup>, el siguiente paso fue verificar el grado de conservación de CutC en las especies del orden que presentan un operón cop codificado en su genoma.

Los resultados muestran que del total de especies estudiadas, 7 contienen un gen homólogo que codifica para una proteína tipo-CutC (Figura 3). CutC se conserva en todos los casos, tomando valores de identidad global superiores al 45% en su secuencia aminoacídica. Adicionalmente, en la mayoría de las especies, *cutC* mantiene una organización de operón monocistrónico, siendo la excepción *L. plantarum*, especie en la cual comparte el operón con un gen que codifica para una proteína de función no conocida (Figura 4).

Tal como se ha descrito anteriormente, si bien el operón cop está presente en diferentes especies del orden, solo CopY (regulador transcripcional) se encuentra codificado en todas las especies, siendo *L. plantarum*, el organismo que presenta las mayores diferencias de organización en el operón en comparación a las otras especies estudiadas, lo cual también se ve reflejado en la organización de CutC, sugiriendo posibles divergencias en el manejo del metal para esta especie, las cuales se basarían, principalmente, en mecanismos de homeostasis dirigidos por otras proteínas.

En resumen, el análisis *in silico* indica que CutC se encuentra conservada en la mayoría de las especies del orden *Lactobacillales* analizadas, manteniendo en general, una estructura génica de operón monocistrónico. En cuanto a su relación directa con el metal, a pesar que los residuos altamente conservados de cisteínas se distribuyen en forma compatible con esta posibilidad según el modelo derivado de los datos cristalográficos de *S. flexneri*, se requieren pruebas directas que permitan confirmar que CutC de *E. faecalis* es capaz de coordinar el metal.

### ***La expresión de cutC se induce en células expuestas a Cu***

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<sup>2, 39-41</sup>, aumentando o disminuyendo la abundancia de su transcrito. En atención a esto, se diseñó un protocolo experimental que tuvo por objetivo observar el comportamiento transcripcional de *cutC* frente a un tratamiento temporal de exposición a Cu.

El objetivo principal de esta estrategia fue aportar con evidencias sobre el efecto del Cu en la expresión del gen, para ello se diseñó una estrategia experimental, en la cual se tomaron en cuenta fundamentalmente, cuatro consideraciones:

i) La elección de cultivos celulares crecidos en paralelo (control y tratamiento con Cu), a fin de controlar el efecto propio del crecimiento a través del tiempo, el cual podría afectar la expresión de *cutC* durante el experimento.

ii) La concentración y tiempo de exposición a Cu, 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 distorsionan el efecto directo del metal. Estudios previos<sup>15</sup>, dan como resultado que 0,5 mM de CuSO<sub>4</sub> no afecta la velocidad de crecimiento de cultivos de *E. faecalis*, en comparación a cultivos sin exposición. Siendo este resultado, ratificado durante el desarrollo de la presente tesis (Tabla 3). En cuanto a los tiempos de exposición, éstos se seleccionaron tomando en cuenta la posible respuesta transcripcional de la bacteria y la manipulación de las muestras. Estudios previos de microarreglos realizados en *E. faecalis*<sup>42</sup>, muestran la presencia de cambios transcripcionales ya a los 15 min de exposición a Eritromicina, tiempo seleccionado como temprano en el diseño utilizado en esta tesis. La elección de los tiempos 45, 90 y 135 min se basó en el tiempo generacional promedio de *E. faecalis*, el cual fluctúa alrededor de los 45 min cuando es expuesta a 0,5 mM de CuSO<sub>4</sub>. Estos criterios permitieron definir una curva de exposición dividida en una respuesta temprana (15 min), media temprana (45 min), media tardía (90 min) y tardía (135 min).

ii) Los volúmenes, concentraciones y tratamientos de las muestras, se ajustaron principalmente al propósito de obtener una concentración y calidad óptima de RNA, las cuales estuviesen dentro de los rangos requeridos para una correcta síntesis de cDNA y posteriores ensayos de qPCR. Al respecto, diversos estudios declaran que residuos de metales en muestras de RNA pueden afectar tanto la estabilidad molecular, como la reacción de retrotranscripción<sup>34</sup>. Por lo tanto, considerando los tratamientos con Cu utilizados, se implementó un protocolo de tres lavados sucesivos con quelantes de metales y sales, previo a proceder con el protocolo de extracción. Los resultados obtenidos (Figuras 5

y 6), confirman una alta estabilidad y pureza tanto de las muestras de RNA como de cDNA, lo cual permitió realizar correctamente los experimentos de cuantificación de transcritos.

iv) En todo experimento de qPCR es de vital importancia contar con un gen normalizador que permita equiparar las diferencias asignadas a la cantidad inicial de RNA utilizado o a las ocurridas durante el paso de la retrotranscripción. Dada la información existente en la literatura sobre normalizadores para *E. faecalis*<sup>33</sup>, los experimentos realizados tuvieron como objetivo verificar que para estímulos de Cu, el gen EF1004 cumple con los parámetros estandarizados de clasificación de normalizadores<sup>33</sup>. Los resultados indican que no existen diferencias significativas en la abundancia transcripcional del gen (Tabla 2), lo que nos permitió su utilización para comparar abundancia de *cutC* entre muestras en los experimentos de qPCR.

Una vez establecidas las condiciones experimentales, se procedió a cuantificar la abundancia de transcrito que codifica para *cutC*. La figura 7 muestra que, tras una exposición tardía (135 min) a una concentración no letal de Cu, se induce la expresión del gen *cutC* cerca de tres veces en comparación al cultivo no tratado. Este resultado es consistente con lo observado en otro modelo bacteriano en el cual también se describen cambios en la abundancia del transcrito para *cutC* frente a la exposición a Cu. Efectivamente, se observó un aumento del transcrito en biopelículas de la bacteria *X. fastidiosa* cuando éstas son expuestas durante 24 hs a 3, 4, 5, 6 y 7 mM de CuSO<sub>4</sub>, alcanzando un máximo de expresión a una concentración de 5 mM<sup>21</sup>. Este patrón de cambio transcripcional no se observa para un homólogo de CutC presente en el eucarionte *C. elegans* suplementado con altas concentraciones del metal durante 24 horas, las cuales disminuyen en un 50 % la viabilidad del organismo<sup>23</sup>. Sin embargo, los autores discuten que esta respuesta es similar a lo observado en *X. fastidiosa* cuando se compara la

abundancia del transcrito de *cutC* a los 5 y 7 mM de tratamiento, proponiendo una expresión del gen comandada por la concentración de Cu que está directamente relacionada con la viabilidad celular. Ahora bien, a diferencia de lo reportado, las condiciones utilizadas en la presente tesis no generaron cambios en la viabilidad celular, lo que se asemeja a los experimentos realizados en *X. fastidiosa* cuando se expuso a 3 y 4 mM de CuSO<sub>4</sub>, situación en la cual se observó un aumento en la abundancia del transcrito de *cutC*, comportamiento para el gen equiparable a lo obtenido en *E. faecalis*.

Por otro lado, experimentos realizados para el operón *cop*<sup>15</sup>, muestran que éste aumenta alrededor de 30 veces su abundancia a nivel de transcrito aproximadamente a los 15 min a la misma concentración de Cu, diferencia que se mantienen durante todos los tiempos de exposición utilizados. El aumento de solamente dos veces en la abundancia del transcrito para *cutC* recién a las 2 horas de exposición a Cu sugiere que *cutC* es un elemento de respuesta tardía al metal. Estas diferencias sugieren que el mecanismo de regulación transcripcional de *cutC* difiere de aquellos genes que responden tempranamente a Cu, como por ejemplo, proteínas cuya función está directamente relacionada con el eflujo (como ATPasas tipo P) o encargadas de contener el Cu dentro de la células (metalotioneínas)<sup>15, 43, 44</sup>, o como ha sido reportado para los genes codificados en el operón *cop* (referencia 15). Nuestros datos permiten plantear que frente a un aumento en la disponibilidad extracelular de Cu, *E. faecalis* levanta una respuesta transcripcional temprana (operón *cop*) seguida de una segunda respuesta más tardía (*cutC*), la primera vinculada directamente al manejo del contenido de Cu celular y la segunda asociada a las consecuencias derivadas del aumento en el contenido del metal, gatillada posiblemente por un cambio en el estatus redox de la célula. En este escenario la función de CutC estaría asociada a complementar los mecanismos de homeostasis de cobre y/o manejo del estrés

oxidativo generado. En este contexto, la información recopilada referente a *cutC*, apunta a que la respuesta transcripcional del gen depende directamente del tiempo y la cantidad de Cu presente, manifestándose en que, *cutC* se induce frente a pulsos largos de exposición no letales, sin embargo, cuando las concentraciones generan una alta toxicidad, reflejada en una disminución por sobre el 50% de la viabilidad, el gen se reprime; comportamiento transcripcional descrito previamente en genes capaces de responder a Cu<sup>41</sup>.

En relación a la regulación del gen, a la fecha no hay descrito para ningún modelo biológico en el cual se ha identificado *cutC*, regiones *cis* reguladoras dentro de su región promotora (*binding sites* para factores de transcripción). La búsqueda de componentes reguladores presentes en el genoma anotado de *E. faecalis*<sup>24</sup>, indica la existencia de dos tipos de factores de transcripción, los de relación directa, como CopY y CsoR, en los cuales el Cu modula la estructura de la proteína y su actividad de unión al DNA<sup>12, 45</sup>, y los de relación indirecta con el metal, en el cual el estrés oxidativo generado es el causante de los cambios conformacionales que ocurren en el elemento regulador, tal es el caso los factores de transcripción de la familia LysR, Fur, LexA y ArsR<sup>46</sup>. Trabajos en progreso se han enfocado en el análisis y búsqueda sitios de unión para estos factores de transcripción río arriba del operón *cutC*, lo que permitirá determinar y caracterizar los mecanismos de regulación específicos que comandan al gen.

### ***CutC en la homeostasis de Cu***

En la homeostasis de Cu, podemos encontrar funciones desempeñadas por proteínas encargadas del ingreso, distribución, regulación transcripcional y eflujo del Cu, las cuales juegan un papel fundamental en mantener el balance de las concentraciones óptimas del

metal que permiten un correcto funcionamiento celular<sup>7</sup>. Con el objetivo de posicionar a CutC entre alguno de estos cuatro procesos, se diseñó un protocolo que permitiese evaluar el efecto de CutC sobre la viabilidad celular y la concentración intracelular de Cu tomando en cuenta los mismos parámetros utilizados en los experimentos de expresión génica.

De las estrategias disponibles, la utilización de mutantes, permite inferir de una forma directa el efecto de la ausencia de la proteína sobre la homeostasis del metal<sup>47</sup>. En este contexto, evidencias de nuestro laboratorio, muestran que en ensayos de curvas de crecimiento, la mutante para CopA (ATPasa tipo P de eflujo de Cu), presenta una disminución de la viabilidad frente a la exposición a Cu en comparación con la cepa silvestre, fenotipo no observado para las mutantes CopY y CopZ, los cuales no presentan diferencias. Durante esta misma caracterización del operón, se realizaron ensayos de concentración intracelular de Cu, que determinaron en la mutante para *copA* un aumento de 1,6 veces el contenido del metal; al contrario, la mutante de *copY* lo disminuye en esta misma proporción, en comparación a la cepa silvestre<sup>15</sup>. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en cepas mutantes para genes del operón *cop*, se decidió monitorear, el crecimiento de  $\Delta cutC$  frente a diferentes concentraciones de exposición a Cu.

Los resultados obtenidos en ensayos de viabilidad celular, cuantificados por CMI y curvas de crecimiento, no muestran diferencias significativas entre la cepa mutante y la silvestre, observación similar a lo obtenido durante la caracterización de CutC en *C. elegans*, al realizarse el silenciamiento parcial de la traducción del gen mediante RNA interferente<sup>23</sup>. En 1989, Rouch y colaboradores reportaron una disminución en la viabilidad de la mutante para *cutC* en *E. coli*<sup>18</sup>. Sin embargo, nuevas evidencias indican que el genotipo de esta cepa mutante corresponde a un transportador de eflujo de Cu (CopA) y no a CutC<sup>48</sup>. Consecuentemente, experimentos realizados por el grupo de Camakaris (datos no

publicados, comunicación personal) en una nueva mutante para CutC, muestran que no existen diferencias en la viabilidad celular entre esta cepa mutante y la cepa silvestre frente a la exposición a Cu. Esta evidencia es consistente con los resultados presentados en esta tesis.

En cuanto a los experimentos de contenido intracelular de Cu, la comparación indica que existen diferencias significativas entre la cepa mutante y la silvestre. Aparentemente la ausencia de CutC repercute en la habilidad de excretar Cu lo cual explicaría porqué la mutante acumula alrededor de un 1,3 veces más de Cu que la cepa silvestre, resultado que posiciona por primera vez a CutC, como un elemento vinculado a los mecanismos de la homeostasis del Cu.

Estos resultados permiten suponer que, *E. faecalis* establece umbrales máximos de Cu intracelular acumulable que no ejerce efectos en la viabilidad, los cuales dependen de la presencia de componentes involucrados principalmente en la resistencia al metal. En el caso particular de  $\Delta cutC$ , posiblemente no se supera el umbral de tolerancia debido a la presencia activa de la ATPasa de eflujo CopA, que por el contrario, cuando es eliminada, además del aumento en la concentración (el doble en comparación a la mutante en estudio) hay cambios en la viabilidad celular frente a la exposición al metal. En concordancia con esta apreciación, en el año 1994, Master y colaboradores<sup>49</sup> generaron una cepa de ratones mutantes homocigotos para las metalotioneínas 1 y 2. El fenotipo resultante son ratones capaces que presentan una menor concentración intracelular de Cu sin presentar cambios en la viabilidad del organismo. Dos años más tarde, el grupo de Kelly y Palmer realizan el cruce de una cepa de ratones mutantes para el gen de la ATPasa de eflujo de Menkes (ATP7a)<sup>50</sup>, con la cepa de ratones mutantes de ambas metalotioneínas 1 y 2<sup>51</sup>. La mayoría de la progenie homocigota resultante muere antes del día once del desarrollo embrionario,

concluyendo que la ausencia de la ATPasa y metalotioneínas en conjunto, afecta directamente el umbral de tolerancia de los ratones, afectando drásticamente su viabilidad frente a la exposición al metal.

Tomando en cuenta los resultados reportados en diferentes modelos en los que se han caracterizado proteínas vinculadas a la homeostasis de Cu y de acuerdo a los fenotipos obtenidos en los ensayos de contenido, proponemos que CutC participa en los mecanismos encargados del eflujo del metal. Considerando la estructura de la proteína, podemos descartar una participación directa en el mecanismo de salida (del tipo ATPasa o RND), no obstante, existen otros pasos involucrados con el eflujo, como por ejemplo, CutC podría estar favoreciendo el desplazamiento del Cu hacia la ATPasa CopA, del tipo chaperona de Cu, como es el caso de CopZ del operón *cop*<sup>52</sup>.

Adicionalmente, e integrando la información obtenida de los experimentos de qPCR, podemos decir que niveles elevados de Cu generan un aumento de la expresión del transcrito, lo cual puede proyectarse como un requerimiento del aumento de la función de esta proteína bajo estas condiciones, lo cual posiciona a CutC como un elemento de respuesta tardía al metal, lo que temporalmente se relaciona con un aumento en la concentración de Cu en ausencia de la proteína. En relación a la especificidad de la respuesta de *cutC*, cabe la posibilidad, que los cambios de abundancia a nivel de transcrito observados, pudieron ser gatillados producto del estrés oxidativo generado por el exceso de Cu acumulado en la célula, y no la respuesta directa al metal. Para esclarecer esta pregunta, además del análisis de la región promotora del operón *cutC*, en actual desarrollo está la cuantificación de marcadores moleculares que nos permitan establecer si los parámetros utilizados (tiempo y concentración de Cu) fueron capaces de generar estrés oxidativo en la célula, así como, se pretende exponer a *E. faecalis* a otros estímulos capaces de gatillar

estrés oxidativo dentro la célula, como Fe o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que nos permitiría evaluar el grado de especificidad de la respuesta transcripcional de *cutC* frente al Cu.

En definitiva, los experimentos planteados nos permitieron proponer que CutC de *E. faecalis* responde transcripcionalmente y modifica el contenido intracelular de Cu, lo que lo posiciona dentro del modelo de estudio, además del operón cop, como un componente de la homeostasis del metal, aparentemente vinculado al eflujo del Cu.

## CONCLUSIONES

CutC de *E. faecalis* es una proteína relativamente conservada dentro del orden *Lactobacillales*, sus características estructurales permiten situarla como miembro de la familia de proteínas con barriles tipo TIM, tal como se ha descrito en homólogos de otros organismos.

La proyección tridimensional del modelo obtenido sugiere la participación de residuos conservados de cisteínas en la coordinación de Cu en una configuración de dímero. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar si la proteína es capaz de unir Cu en su estructura.

*CutC* responde transcripcionalmente a estímulos sostenidos de Cu aumentando su abundancia a nivel de transcrito, lo que posiciona por primera vez al gen, como un elemento de respuesta tardía al metal en comparación a otros componentes de respuesta temprana previamente descritos en este modelo bacteriano.

La ausencia de CutC, no genera un cambio en la viabilidad celular a lo largo de una exposición de 24 horas a diferentes concentraciones de Cu en relación a la cepa silvestre, no obstante, la cuantificación intracelular del metal presenta un aumento significativo lo que sugiere que la proteína podría estar involucrada en mecanismos de eflujo de Cu.

La integración de los resultados de qPCR y cuantificación de Cu intracelular, aportan por primera vez evidencias que CutC participa en la homeostasis del metal, posiblemente complementando la función del operón *cop* en *E. faecalis*.

Finalmente, es necesario acentuar que la función y relación específica de CutC dentro de este proceso, es una pregunta aún no resuelta donde los datos obtenidos en la tesis, mantiene la línea de investigación realizada hasta el momento para esta proteína.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M: Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 1998, 67(5 Suppl):952S-959S.
2. Linder MC, Hazegh-Azam M: Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996, 63(5):797S-811S.
3. Pitcher RS, Watmough NJ: The bacterial cytochrome cbb3 oxidases. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1655(1-3):388-399.
4. Halliwell B, Gutteridge JM: Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 1984, 2(8411):1095.
5. Yoshida Y, Furuta S, Niki E: Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1210(1):81-88.
6. Predki PF, Sarkar B: Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem* 1992, 267(9):5842-5846.
7. Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ: Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 2008, 4(3):176-185.
8. Bertini I, Rosato A: Menkes disease. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(1):89-91.
9. Bingham MJ, Ong TJ, Summer KH, Middleton RB, McArdle HJ: Physiologic function of the Wilson disease gene product, ATP7B. *Am J Clin Nutr* 1998, 67(5 Suppl):982S-987S.
10. Bartee MY, Lutsenko S: Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level. *Biomaterials* 2007, 20(3-4):627-637.
11. Solioz M, Stoyanov JV: Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev* 2003, 27(2-3):183-195.
12. Strausak D, Solioz M: CopY is a copper-inducible repressor of the *Enterococcus hirae* copper ATPases. *J Biol Chem* 1997, 272(14):8932-8936.
13. Reyes A, Leiva A, Cambiazo V, Mendez MA, Gonzalez M: Cop-like operon: structure and organization in species of the Lactobacillales order. *Biol Res* 2006, 39(1):87-93.
14. Reyes A: *Enterococcus faecalis* UN MODELO PARA EL ESTUDIO DEL MANEJO Y REGULACION DE COBRE INTRACELULAR. Santiago: Universidad de Chile; 2007.
15. Reyes-Jara A, Latorre M, Lopez G, Bourgoigne A, Murray BE, Cambiazo V, Gonzalez M: Genome-wide transcriptome analysis of the adaptive response of *Enterococcus faecalis* to copper exposure. *Biomaterials* 2010.
16. Liolios K, Chen IM, Mavromatis K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, Markowitz VM, Kyrpides NC: The Genomes On Line Database (GOLD) in 2009: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue):D346-354.
17. Andreini C, Bertini I, Rosato A: A hint to search for metalloproteins in gene banks. *Bioinformatics* 2004, 20(9):1373-1380.
18. Rouch D, J. Camakaris, and B. T. O. Lee: Copper transport in *E. coli*. *Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry* 1996, D. H. Hamer and D. R. Winge:469-477.
19. Zhu YQ, Zhu DY, Lu HX, Yang N, Li GP, Wang DC: Purification and preliminary crystallographic studies of CutC, a novel copper homeostasis protein from *Shigella flexneri*. *Protein Pept Lett* 2005, 12(8):823-826.

20. Wierenga RK: The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett* 2001, 492(3):193-198.
21. Rodrigues CM, Takita MA, Coletta-Filho HD, Olivato JC, Caserta R, Machado MA, de Souza AA: Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, 77(5):1145-1157.
22. Li J, Ji C, Chen J, Yang Z, Wang Y, Fei X, Zheng M, Gu X, Wen G, Xie Y et al: Identification and characterization of a novel Cut family cDNA that encodes human copper transporter protein CutC. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 337(1):179-183.
23. Calafato S, Swain S, Hughes S, Kille P, Sturzenbaum SR: Knock down of *Caenorhabditis elegans* cutc-1 exacerbates the sensitivity toward high levels of copper. *Toxicol Sci* 2008, 106(2):384-391.
24. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF et al: Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 2003, 299(5615):2071-2074.
25. Montgomerie S, Sundararaj S, Gallin WJ, Wishart DS: Improving the accuracy of protein secondary structure prediction using structural alignment. *BMC Bioinformatics* 2006, 7:301.
26. Guex N, Peitsch MC: SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997, 18(15):2714-2723.
27. Humphrey W, Dalke A, Schulten K: VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996, 14(1):33-38, 27-38.
28. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990, 215(3):403-410.
29. Hirosawa M, Totoki Y, Hoshida M, Ishikawa M: Comprehensive study on iterative algorithms of multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci* 1995, 11(1):13-18.
30. van Bakel H, Huynen M, Wijmenga C: Prokaryotic diversity of the *Saccharomyces cerevisiae* Atx1p-mediated copper pathway. *Bioinformatics* 2004, 20(16):2644-2655.
31. Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE: Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis* 1998, 178(5):1416-1420.
32. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29(9):e45.
33. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, Coque TM, Canton R, Baquero F, Murray BE et al: Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol* 2006, 44(6):2220-2228.
34. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR: Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 2008, 20(7):1736-1737.
35. Benning MM, Hong SB, Raushel FM, Holden HM: The binding of substrate analogs to phosphotriesterase. *J Biol Chem* 2000, 275(39):30556-30560.
36. Lai WL, Chou LY, Ting CY, Kirby R, Tsai YC, Wang AH, Liaw SH: The functional role of the binuclear metal center in D-aminoacylase: one-metal activation and second-metal attenuation. *J Biol Chem* 2004, 279(14):13962-13967.

37. Calderone V, Dolderer B, Hartmann HJ, Echner H, Luchinat C, Del Bianco C, Mangani S, Weser U: The crystal structure of yeast copper thionein: the solution of a long-lasting enigma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(1):51-56.
38. Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP et al: Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 1993, 261(5124):1047-1051.
39. Shanmuganathan A, Avery SV, Willetts SA, Houghton JE: Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. *FEBS Lett* 2004, 556(1-3):253-259.
40. Rensing C, Grass G: *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 2003, 27(2-3):197-213.
41. Gonzalez M, Reyes A, Suazo M, Jo W, Vulpe CD: Expression of copper-related genes in response to copper load. *Am J Clin Nutr* 2008, 88.
42. Aakra A, Vebo H, Snipen L, Hirt H, Aastveit A, Kapur V, Dunny G, Murray BE, Nes IF: Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* V583 to erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(6):2246-2259.
43. Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LW: Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J Biol Inorg Chem* 2007, 12(4):495-507.
44. Yamamoto K, Ishihama A: Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* 2005, 56(1):215-227.
45. Liu T, Ramesh A, Ma Z, Ward SK, Zhang L, George GN, Talaat AM, Sacchettini JC, Giedroc DP: CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat Chem Biol* 2007, 3(1):60-68.
46. Green J, Paget MS: Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* 2004, 2(12):954-966.
47. Jo WJ, Loguinov A, Chang M, Wintz H, Nislow C, Arkin AP, Giaever G, Vulpe CD: Identification of genes involved in the toxic response of *Saccharomyces cerevisiae* against iron and copper overload by parallel analysis of deletion mutants. *Toxicol Sci* 2008, 101(1):140-151.
48. Gupta SD, Lee BT, Camakaris J, Wu HC: Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995, 177(15):4207-4215.
49. Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD: Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(2):584-588.
50. Mercer JF, Grimes A, Ambrosini L, Lockhart P, Paynter JA, Dierick H, Glover TW: Mutations in the murine homologue of the Menkes gene in dappled and blotchy mice. *Nat Genet* 1994, 6(4):374-378.
51. Kelly EJ, Palmiter RD: A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat Genet* 1996, 13(2):219-222.
52. Multhaup G, Strausak D, Bissig KD, Solioz M: Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of *Enterococcus hirae* assessed by surface plasmon resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 288(1):172-177.

ANEXOS

## Anexo 1. Protocolo de construcción de la base de datos Cu-BDP

Se generó una base de datos de proteínas con patrones de unión a Cu adaptando el protocolo propuesto por *Andreini y cols.* 2004. Para ello se ingresó a la Base de Datos de Proteínas (PDB, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)), utilizando como palabra clave “*copper*” en la búsqueda general, se obtuvo una lista de proteínas no redundantes relacionadas con el metal, la cual detalla la secuencia aminoacídica en formato fasta y el código PDB para cada una de las proteínas ( $n = 297$  no redundantes). Con el fin de analizar la estructura primaria de cada proteína, se accedió a la base de datos del Instituto de Bioinformática Europea (EBI, <http://www.ebi.ac.uk>). Ingresando por separado, cada uno de los códigos PDB de la lista inicial obtenida, se logró tener acceso a la información sobre los aminoácidos de coordinación (ligandos) que estuviesen interactuando directamente con el metal, los cuales se anotaron manualmente de acuerdo al siguiente formato: AX(n)BX(m)C, donde A, B, C: residuos aminoacídicos ligandos de coordinación, X: aminoácido al azar y n, m: número de aminoácidos que están entre dos subsecuentes ligandos. De haber dos o más motivos por secuencia se anotaron todos por separado, la correcta anotación de los motivos se verificó mediante el algoritmo PHI-Blast. Con esta información organizada se generó una nueva base de datos denominada Base de Datos de Proteínas Cristalografiadas Vinculadas a Cu (Cu-PDB), la cual se clasificó en 3 grupos: i) proteínas sin motivo identificado ( $n = 181$ ), ii) con un motivo ( $n = 74$ ) y iii) con más de un motivo de unión a Cu ( $n = 42$ ). Cada proteína presente en Cu-PDB contiene su código PDB, secuencia aminoacídica, organismo del cual se obtuvo los datos cristalográficos y motivos de coordinación cuando corresponda. La base de datos se encuentra en formato Excel disponible públicamente en el LBEG.

**Anexo 2. Estadística general de la base de datos de proteínas cristalografiadas vinculadas a Cu**

<b>Cu-BDP</b>	<b>Nº de elementos</b>
Total de proteínas (PDB)	586
Total de proteínas con uno o más motivos	211
Total de proteínas sin motivo identificado	375
Total de proteínas no redundantes	297
Total de proteínas no redundantes con uno o más motivos	116
Total de proteínas no redundantes sin motivo identificado	181
Total de motivos	211
Total de motivos no redundantes	152
Total de organismos no redundantes	77
Total de organismos eucariontes	39
Total de organismos procariontes	38
Total de anotación de proteínas no redundantes	46

### Anexo 3. Aplicación y anotación de resultados Cu-BDP

Se rastreó cada proteína presente en la base de datos Cu-BDP en el genoma secuenciado de *E. faecalis* cepa V583, disponible en la base de datos del NCBI, utilizando dos estrategias, a) Blastp: Mediante el algoritmo Blastp se rastreó la secuencia aminoacídica (n = 297) y b) PHI-Blast: A través de la herramienta PHI-Blast, se rastreó la secuencia aminoacídica con su respectivo patrón de unión a cobre (n = 211). Se utilizó arbitrariamente en las estrategias a) y b) como puntos de corte valores estándar de expectativa (E-value) inferiores 1 y  $1E^{-10}$  respectivamente. De los resultados obtenidos se anotó: código identificador genómico TIGR, E-value, la secuencia aminoacídica en formato FASTA y una descripción general de la función de la proteína obtenida desde su anotación genómica. Las proteínas identificadas se clasificaron basadas en los valores E-value, calidad del motivo de unión (cuando corresponda según la estrategia de búsqueda utilizada) e información en la literatura sobre su posible participación en mecanismos de homeostasis de Cu. Los resultados se muestran en el ANEXO 4.

## Anexo 4. Lista de candidatos involucrados en la homeostasis de Cu en *E. faecalis*

### Estrategia 1: PIII-Blast

Proteína Cu-PDB (PDB)	Especie	Motivo	Identificador TIGR	E-value	Anotación
1CPZ	<i>Enterococcus hirae</i>	C-x(2)-C	EF0298	2.00E-12	CopA, ATPasa de Cu
1FVS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C-x(2)-C	EF0299	3.00E-05	CopZ, cheperona de Cu
1CPZ	<i>Enterococcus hirae</i>	C-x(2)-C	EF1400	9.00E-05	Transportador de Cadmio
1MDA	<i>Paracoccus denitrificans</i>	H-x(38)-C-x(2)-H	EF1390	9.00E-03	Formato Deshidrogenasa NAD-dependiente
1KSI	<i>Pisum sativum</i>	H-x-H-x(158)-H	EF3089	3.20E-02	Glutamato-cistein ligasa
1SNR	<i>Alcaligenes faecalis</i>	H-x(34)-H	EF0059	7.50E-02	UDP-N-acetylglucosamina pirfosforilasa
1FIG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	H-x(1)-H-x(14)-H-x(56)-H	EF0875	1.20E-01	ATPasa tipo P de cationes

### Estrategia 2: BlastP

Proteína Cu-PDB (PDB)	Especie	Identificador TIGR	E-value	Anotación
1ECJ	<i>Escherichia coli</i>	EF1781	7.00E-12	Amido-fosfo-ribosiltransferasa
2HC8	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	EF0298	4.00E-23	CopA, ATPasa de Cu
2HC8	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	EF0758	4.00E-13	ATPasa tipo P de cationes
2HC8	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	EF0875	6.00E-13	ATPasa tipo P de cationes
2HC8	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	EF1400	2.00E-11	ATPasa tipo P de cationes
2HC8	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	EF2623	3.00E-11	ATPasa tipo P de cationes
3HH8	<i>Streptococcus pyogenes</i>	EF0577	1.00E-27	Lipoproteína de adhesión
1TWD	<i>Shigella flexneri</i>	EF2667	3.00E-11	Proteína de homeostasis de Cu
2HH7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	EF2991	8.00E-11	Proteína lipotética

**BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS QUE LIGAN COBRE EN ESPECIES DEL ORDEN *LACTOBACILLALE* MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.** (Search of copper binding protein in species of *Lactobacillale* order by bioinformatics analysis). **Latorre, M., Leiva, A., Reyes, A., González, M.** Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA-Universidad de Chile

En bacterias, proteínas que unen cobre (Cu) cumplen un papel esencial. Si bien, en la actualidad, contamos con 139 genomas anotados, desconocemos el número de proteínas que presentan patrones de unión a Cu. En este trabajo, se adaptó el protocolo propuesto por (Andreini y cols., 2004<sup>1</sup>) para construir una Base de Datos de Cu-Proteínas (Cu-BDP) con sus respectivos patrones de unión a Cu a partir de la información disponible en el protein-data-bank. Nuestra Cu-BDP contiene 297 proteínas con 152 patrones no redundantes provenientes de 38 genomas bacterianos y 39 eucariontes. Mediante PHI-Blast, los 147 patrones fueron rastreados en 7 genomas de especies del orden *Lactobacillale*. 161 proteínas con dominios de unión a Cu fueron identificadas, de las cuales 43 presentaron un *E-value*<1. Las más representativas fueron transportadores y chaperonas de Cu. Al examinar la presencia de: 1) ortólogos de estas 43 proteínas, y 2) las 57 proteínas de nuestro Cu-BDP (provenientes de procariontes) en el genoma de *E. faecalis* (vía BlastP) se recuperaron 14 nuevas proteínas. Algunas de ellas no presentaron el patrón de unión a Cu del templado. Este resultado sugiere que *E. faecalis* presenta una estrategia de utilización y manejo de cobre basado en proteínas que poseen nuevos patrones de unión al metal.

<sup>1</sup>Andreini, C et al. 2004. *Bioinformatics*. 20:1373-80.

## Anexo 6. Protocolo de construcción de la cepa mutante de *E. faecalis* OG1RF $\nabla$ Kan:*cutC* mediante disrupción génica

El protocolo consiste en amplificar mediante PCR convencional un fragmento de 430 pb de la región codificante del gen *cutC* adicionando al producto los sitios de restricción BamHI y XbaI en los extremos 5' y 3' respectivamente. El amplicón es purificado desde una electroforesis en geles de agarosa para luego ligarlo al vector pGEMT-easy. El constructo pGEMT-easy-*cutC* se transforma en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , los transformantes se verifican en placas de agar LB suplementadas con Ampicilina 100  $\mu$ g/mL y X-Gal 40  $\mu$ g/mL. De los clones transformantes se purifican los constructos a través de una Miniprep 1, 2, 3 y posteriormente digeridos con las enzimas comerciales BamHI y XbaI. El tamaño correcto del fragmento digerido se verifica a través de electroforesis en geles de agarosa, hecho esto se liga en el vector pTEX4577 no comercial. Finalmente el constructo pTEX4577-*cutC* es transformado mediante electrotransformación en células silvestres de *E. faecalis* cepa OG1RF. Los transformantes de *E. faecalis* OG1RF son seleccionadas en agar N con 2,0 mg/mL de Kanamicina, luego de 24 horas de incubación. Los protocolos específicos de clonación, ligación, digestión y transformación se realizaron mediante kits comerciales estándar, basándonos en cada uno de los pasos en las recomendaciones de los fabricantes.

Anexo 7. Resumen XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología – ALAM,  
Pucón, Chile 2006

ROL DE LA PROTEÍNA CutC DE *Enterococcus faecalis* EN EL METABOLISMO DE COBRE (Role of CutC protein from *Enterococcus faecalis* in copper metabolism). Latorre, M, Reyes, A, González, M. Lab. de Bioinformática y Expresión Génica, INTA-U.deChile.[mlatorre@inta.cl](mailto:mlatorre@inta.cl)

CutC, ha sido descrita en *E. coli* como potencial participante del almacenamiento de cobre (Cu). Por otro lado, el cristal de CutC (de *S. flexneri*) posee un dominio del tipo barril TIM, propio de enzimas que usan el metal como cofactor. Alineamientos locales (BlastP) revelan la presencia de un ortólogo en *Enterococcus faecalis* (*Ef*), aun no caracterizado experimentalmente. Nuestro objetivo fue determinar el rol de CutC en la homeostasis de Cu en *Ef*. Para ello, mediante disrupción génica obtuvimos una mutante de *cutC* de *Ef* ( $\Delta cutC$ ). El efecto de la mutación fue evaluada mediante ensayos de: concentración mínima inhibitoria de Cu (CMI-Cu) en caldo y agar, curvas de crecimiento y sobrevida en presencia de CuSO<sub>4</sub>. Además, en la cepa silvestre (WT), mediante PCR semicuantitativo se determinó cambios en los niveles de transcrito de *cutC* en respuesta a Cu (4h a 0,5mM). Los resultados indican, que WT y  $\Delta cutC$  presentaron iguales valores de CMI-Cu (3,0mM:caldo y 2,0mM:agar). Así también, entre ambas cepas no se observó cambios en la forma de las curvas en presencia de Cu ni en los tiempos de generación (0,5mM:54min y 1,0mM:72min). Los niveles del transcrito no cambiaron en respuesta a Cu. En conclusión, nuestra aproximación no nos permite sugerir que CutC participe en la homeostasis de Cu en *Ef*, a diferencia de lo obtenido al aplicar estos ensayos en la caracterización de otros componentes del metabolismo de Cu. Futuros experimentos incluirán la determinación del contenido intracelular de Cu y variaciones en los niveles de expresión de *cutC* en mutantes de genes que participan en la homeostasis del metal. Fondecyt N°1030618; Fondef N°D04I-1257.