

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***IDENTIFICACIÓN DE ARN NO CODIFICANTES RELACIONADOS A  
SISTEMAS DE HOMEOSTASIS DE HIERRO EN ENTEROCOCCUS  
FAECALIS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en  
Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de  
Bioquímico por:**

***SEBASTIÁN ANTONIO GÓMEZ  
CONTRERAS***

**Director de Tesis: Dr. Mauricio Latorre Mora**

**Directora de Tesis: Dra. Valentina Parra Ortiz**

**Santiago - CHILE**

**Diciembre 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**SEBASTIÁN ANTONIO GÓMEZ CONTRERAS**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Mauricio Latorre M.**

---

**Directora de Tesis:**

**Dra. Valentina Parra O.**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Sergio Álvarez A.**

---

**Dra. Carlos Santiviago C.**

---

**Dr. Juan Carlos Salazar G.**

---

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioingeniería de la Universidad de O'Higgins,  
bajo la dirección del Dr. Mauricio Latorre Mora.

El trabajo fue financiado por:

FONDECYT REGULAR N°1190742, dirigido por el Dr. Mauricio Latorre.

Proyecto ANILLO ACT210004, AÑO 2021, dirigido por el Dr. Mauricio Latorre.

## AGRADECIMIENTOS

***[Snoop Dog ft. Marknoxx music playing]***

*Last but not least, I wanna thank me  
I wanna thank me for believing in me  
I wanna thank me for doing all this hard work  
I wanna thank me for having no days off  
I wanna thank me for, for never quitting*

*I wanna thank me for always being a giver  
And tryna give more than I recieve  
I wanna thank me for tryna do more right than wrong  
I wanna thank me for just being me at all times*

*y gracias a algunos, a otros no tanto.*

## PUBLICACIONES

Fernández, P. A., Velásquez, F., Garcias-Papayani, H., Amaya, F. A., Ortega, J., **Gómez, S.**, Sativiago, A. C., Álvarez, S. A.(2018). Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella enteritidis* by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1220.

## CONGRESOS NACIONALES

**Gómez, S.**, Torres, J., Aliaga, V., Latorre, M. Actualización del modelo de homeostasis de hierro en *Enterococcus faecalis*. Reunión Anual de la Sociedad Chile de Bioinformática. Santiago, Chile. Enero 2022.

Torres, J., **Gómez, S.**, Aliaga-Tobar, V., Latorre, M. Identificación de ARN no codificantes involucrados en la respuesta a cobre en *Enterococcus faecalis*. Reunión Anual de la Sociedad Chile de Bioinformática. Santiago, Chile. Enero 2022.

**Gómez, S.**, Torres, J., Aliaga, V., Latorre, M. Identification of non-coding RNAs related to iron homeostasis in *Enterococcus faecalis*. Congreso de la Sociedad Chilena de Bioquímica y Biología Molecular. Valparaíso, Chile. Diciembre 2021.

## CONGRESOS INTERNACIONALES

**Gómez, S.**, Torres, J., Aliaga, V., Latorre, M. Identification of non-coding RNAs in response to iron and their possible role in the regulation of iron homeostasis systems. Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM. Paraguay. Agosto 2021.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ABREVIATURAS .....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT .....	XIII
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Enterococcus faecalis</i> y su relación con el ambiente.....	1
1.2 La dualidad del hierro .....	2
1.3 <i>Enterococcus faecalis</i> y la homeostasis de hierro .....	2
1.4 Regulación transcripcional de la homeostasis de hierro - Fur .....	6
1.5 ARNs pequeños y homeostasis de hierro .....	8
1.6 ARN no codificantes y <i>Enterococcus faecalis</i> .....	10
2. HIPÓTESIS.....	11
3. OBJETIVO GENERAL .....	11
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1 Reactivos y materiales .....	13
5.1.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano.....	13
5.1.2 Sales y soluciones.....	13
5.1.2 Partidores.....	14
5.2 Metodología .....	15
5.2.1 Búsqueda de nuevos componentes de homeostasis de hierro en <i>E. faecalis</i> .....	15
5.2.2 Búsqueda mediante IntaRNA.....	15
5.2.3 Análisis de conservación dentro del orden de los <i>Lactobacillales</i> .....	16

5.2.4	Búsqueda de sitios de unión a Fur en los ARNnc.....	16
5.2.5	Extracción de ARN total .....	17
5.2.6	Síntesis de ADNc de hebra simple y Transcripción Reversa .....	18
5.2.7	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) .....	18
5.2.8	Curvas de crecimiento .....	19
5.2.9	Concentración intracelular de hierro .....	20
5.2.10	Análisis estadístico .....	20
6.	RESULTADOS .....	21
6.1	Análisis <i>in silico</i> .....	21
6.1.1	Búsqueda de componentes de homeostasis de hierro en bacterias....	21
6.1.2	Nuevos componentes de homeostasis de Fe en <i>E. faecalis</i> .....	23
6.1.3	Selección de ARN no codificantes en <i>E. faecalis</i> .....	26
6.1.4	Conservación de los ARNnc seleccionados en el orden <i>Lactobacillale</i> .....	29
6.2	Determinación de la abundancia transcripcional de los ARNnc <i>E. faecalis</i> cepa silvestre .....	32
6.2.1	Curvas de crecimiento .....	32
6.2.2	Concentración interna de metales en cepa <i>E. faecalis</i> silvestre.....	38
6.2.3	Extracción de ARN en cepa <i>E. faecalis</i> cepa silvestre.....	40
6.2.4	Síntesis de ADNc de hebra simple de los ARNnc en cepa <i>E. faecalis</i> silvestre.....	42
6.2.5	Cuantificación por qPCR de la abundancia de los transcritos de ARNnc en cultivos de <i>E. faecalis</i> cepa silvestre .....	45
6.3	Determinación de la abundancia transcripcional de los ARNnc seleccionados en la cepa $\Delta fur$ .....	47
6.3.1	Curvas de crecimiento .....	47
6.3.2	Concentración interna de metales en cepa $\Delta fur$ .....	50
6.3.3	Extracción de ARN y síntesis de ADNc en cepa <i>E. faecalis</i> $\Delta fur$ .....	52

6.3.4	Cuantificación por qPCR de la abundancia de los transcritos de ARNnc en cultivos de <i>E. faecalis</i> cepa $\Delta fur$ .....	55
7.	DISCUSIÓN.....	58
7.1	Nuevos componentes de homeostasis en <i>E. faecalis</i> .....	58
7.2	Selección por blancos y conservación de ARN no codificantes en <i>E. faecalis</i> .....	59
7.3	Estandarización de condiciones experimentales.....	61
7.4	Cambios de abundancia de los ARNnc seleccionados en cepa silvestre..	64
7.5	Cambios de abundancia de los ARNnc seleccionados en <i>E. faecalis</i> $\Delta fur$ .	67
8.	CONCLUSIONES.....	72
9.	REFERENCIAS .....	73

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en las reacciones de amplificación y cuantificación mediante qPCR .....	14
Tabla 2. Lista de proteínas de homeostasis de Fe en bacterias descritas en la literatura desde el año 2012 .....	22
Tabla 3. Resultados de la búsqueda de proteínas de homeostasis presentes en bacterias dentro del proteoma de <i>E. faecalis</i> . .....	24
Tabla 4. Resultados de los ARNnc candidatos y sus blancos en <i>E. faecalis</i> . .....	28
Tabla 5. Conservación de los blancos de los ARNnc seleccionados en el orden de los <i>Lactobacillales</i> .....	30
Tabla 6. Conservación de los ARNnc seleccionados en el orden de los <i>Lactobacillales</i> . .....	31
Tabla 7. Tiempo generacional para la cepa silvestre <i>E. faecalis</i> expuestas a diferentes concentraciones de 2,2'-DPD.....	35
Tabla 8. Tiempo generacional para las cepas silvestre <i>E. faecalis</i> expuestas a diferentes concentraciones de FeCl <sub>3</sub> . .....	37
Tabla 9. Resultados de la extracción de ARN total en <i>E. faecalis</i> silvestre.....	41
Tabla 10. Resultados de la concentración y pureza del ADNc de hebra simple de los ARNnc seleccionados .....	44
Tabla 11. Tiempo generacional para las cepas silvestre y $\Delta fur$ de <i>E. faecalis</i> crecidas en condición déficit y exceso de Fe .....	49
Tabla 12. Resultados de la extracción de ARN y síntesis de ADNc de ARNnc seleccionados en cepa <i>E. faecalis</i> $\Delta fur$ . .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de los elementos de homeostasis de Fe identificados a la fecha en <i>E. faecalis</i> .....	5
Figura 2. Representación del modelo actualizado de homeostasis de Fe en <i>E. faecalis</i> .....	25
Figura 3. Efecto de la exposición a 2,2'-DPD (condición déficit) sobre el crecimiento de <i>E. faecalis</i> cepa silvestre.....	34
Figura 4. Efecto de la exposición a FeCl <sub>3</sub> (exceso) sobre el crecimiento de la <i>E. faecalis</i> silvestre .....	36
Figura 5. Contenido intracelular de Fe frente a diferentes disponibilidades en <i>E. faecalis</i> .....	39
Figura 6. Comparación de dos diferentes metodologías para la preparación de muestras de ADNc para ensayos de qPCR.....	43
Figura 7. Abundancia relativa de ARNnc cuantificados mediante qPCR en <i>E. faecalis</i> silvestre .....	48
Figura 8. Efecto de la exposición a 2,2'-DPD (déficit) y FeCl <sub>3</sub> (exceso) sobre el crecimiento de la <i>E. faecalis</i> cepa $\Delta fur$ .....	48
Figura 9. Contenido intracelular de Fe en diferentes disponibilidades del metal en <i>E. faecalis</i> $\Delta fur$ .....	51
Figura 10. Comparación de la abundancia de los ARNnc entre la cepa mutante $\Delta fur$ y la cepa silvestre en condición basal .....	56
Figura 11. Alineamiento de las regiones promotoras de los genes que codifican los ARNnc seleccionados. ....	57

## ABREVIATURAS

<b>2'2 DPD:</b>	2,2 Dipiridilo
<b>ABC:</b>	<i>ATP-Binding Cassette</i>
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNnc:</b>	ARN no codificante
<b>Blast:</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BlastN:</b>	Blast de nucleótidos
<b>BlastP:</b>	Blast de proteínas
<b>BS:</b>	Sitio de unión
<b>Ct:</b>	Umbral de ciclos
<b>dNTP:</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>DO:</b>	Densidad óptica
<b>DTM:</b>	Dominio Transmembrana
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>Ef:</b>	Eficiencia de la reacción de qPCR
<b>Fe:</b>	Hierro
<b>FeCl<sub>3</sub>:</b>	Cloruro férrico.
<b><i>fur</i>:</b>	Gen que codifica la proteína Fur
<b>Fur:</b>	<i>Ferric uptake regulator</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>:</b>	Agua bidestilada
<b>h:</b>	Hora

<b>IntaRNA:</b>	Interacting RNA
<b>Ln:</b>	Logaritmo natural
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:</b>	Fosfato disódico
<b>NCBI:</b>	National Center of Biotechnology Information
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>qPCR:</b>	PCR en tiempo real
<b>r.p.m.:</b>	Revoluciones por minuto
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>TF:</b>	Factor de Transcripción.
<b>TXRF:</b>	<i>Total X-Ray Reflection Fluorescence</i> (Fluorescencia de rayos X por reflexión total)
<b>UTR:</b>	Region no traducida
<b>WZ:</b>	Word Size.

## RESUMEN

*Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota intestinal. Desde hace unas décadas, se ha presentado como uno de los principales causantes de enfermedades nosocomiales, infecciones urinarias, bacteriemia y endocarditis. Al ingresar al organismo, esta bacteria debe superar las condiciones ambientales propias del cuerpo humano como la “inmunidad nutricional”, la cual consiste en limitar la mayor cantidad de nutrientes disponibles en el intestino, entre ellos el hierro. Este metal es fundamental para la supervivencia de las bacterias, puesto que existe una gran cantidad de proteínas que utilizan hierro como cofactor para catalizar una serie de procesos de óxido-reducción. A pesar de su importancia, la concentración de hierro intracelular está finamente regulada, ya que el exceso de este metal puede inducir daños mediados por la generación de radicales libres mientras que el déficit provoca la muerte de la bacteria. Dado esta dualidad que presenta el hierro, *E. faecalis* cuenta con una serie de mecanismos moleculares capaces de mantener una cantidad no letal dentro de su citoplasma, proceso denominado “homeostasis de hierro”. Uno de sus componentes más importantes es la proteína Fur, regulador maestro de la cantidad de hierro que, en condiciones de exceso del metal, reprime la expresión de genes que codifican para sistemas de captación de hierro a través de la unión a las cajas Fur. Por el contrario, bajo un escenario de déficit de Fe, se libera de la región promotora permitiendo que estos genes se expresen.

En otras bacterias, además se ha descrito que Fur posee una actividad regulatoria indirecta, puesto también puede regular la expresión de ARN no codificantes (ARNnc), los cuales, a su vez, pueden regular mecanismos de homeostasis de hierro entre otros procesos. Si bien, existe un número importante de ARNnc descritos en *E. faecalis*, a la fecha no hay evidencia que estas moléculas participen en la regulación de componentes involucrados en la homeostasis de hierro en esta bacteria. Por ende, con los antecedentes expuestos se propuso la siguiente hipótesis: En la homeostasis de hierro en *Enterococcus faecalis* participan ARN no codificantes, cuya abundancia es controlada por el regulador Fur.

Para verificar si nuestra hipótesis es verdadera, propusimos el siguiente diseño experimental: 1) Actualizar el modelo de homeostasis de Fe a través de una revisión bibliografía y posterior búsqueda de estos elementos en el proteoma de *E. faecalis*. Luego, a partir de un universo de 585 ARNnc identificados en *E. faecalis* y en conjunto con la

herramienta bioinformática IntaRNA buscamos blancos de estos ARNnc entre los elementos del nuevo modelo de homeostasis de Fe. Finalmente, realizamos un análisis de conservación de los ARNnc seleccionados en el orden *Lactobacillales*. 2) Verificar si estos ARNnc seleccionados son capaces de responder transcripcionalmente a distintas disponibilidades de Fe en *E. faecalis* cepa silvestre. 3) Utilizando *E. faecalis* mutante Fur, comprobar si este factor de transcripción participa en la regulación transcripcional de estos ARNnc de forma directa o indirecta.

Como resultado, logramos actualizar el modelo de homeostasis de Fe de *E. faecalis* aumentando en un 36% la cantidad de componentes. Por otro lado, la búsqueda de ARNnc que estuvieran regulando la expresión de los genes que codifican para estos componentes del nuevo modelo de homeostasis de *E. faecalis* resultó en 4 ARNnc (3 reguladores del ARNm que codifica para *feoB* y 1 regulador del ARNm de la hemolisina). Constatamos que la conservación de estos ARNnc seleccionados se dio en 3 de los 4 ARNnc y en especies cercanas a *E. faecalis* en el orden *Lactobacillales* ratificando el sesgo filogenético en la conservación de estos elementos.

La cuantificación de los ARNnc seleccionados en las distintas disponibilidades de Fe reveló que éstos son capaces de responder transcripcionalmente al metal, lo que sugirió que debe existir un factor de transcripción que module esta actividad y que, a su vez, responda a Fe, como por ejemplo Fur. La cuantificación de los ARNnc seleccionados en *E. faecalis*  $\Delta fur$  en condiciones basales reveló un cambio de abundancia de estos elementos, lo que sugiere que Fur podría estar participar en la regulación de estos elementos. Sin embargo, la ausencia de cajas Fur en los promotores de los genes que codifican ARNnc sugiere que la regulación es de tipo indirecta y que los ARNnc están respondiendo a un efecto secundario como cambios en la concentración intracelular de Fe o a través de un segundo factor de transcripción.

Siendo el Fe un micronutriente esencial para *E. faecalis*, profundizar en el estudio de nuevos ARNnc involucrados en el control de la homeostasis del metal en este patógeno oportunista es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias de control, como la generación de nuevos antimicrobianos.

## ABSTRACT

### Identification of non-coding RNAs related to iron homeostasis systems in *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* is a gram-positive, facultative anaerobic bacterium that is part of the intestinal microbiota. In recent decades, it has emerged as one of the main causes of nosocomial diseases, urinary tract infections, bacteremia and endocarditis. Upon entering the organism, this bacterium must overcome the environmental conditions inherent to the human body, such as "nutritional immunity", which consists of limiting the greatest amount of nutrients available in the intestine, including iron. This metal is essential for the survival of bacteria, since there are a large number of proteins that use iron as a cofactor to catalyze a series of oxidation-reduction processes. Despite its importance, the intracellular iron concentration is highly regulated, since an excess of this metal can induce damage mediated by the generation of free radicals, while a deficit causes the death of the bacteria. Given this duality of iron, *E. faecalis* has a series of molecular mechanisms capable of maintaining a non-lethal amount within its cytoplasm, a process called "iron homeostasis". One of its most important components is the Fur protein, a master regulator of the amount of iron that, under conditions of iron excess, represses genes that code iron uptake systems through binding to Fur boxes. Conversely, under an iron deficit scenario, it is released from the promoter region allowing these systems to be expressed.

In other bacteria, it has also been described that Fur has an indirect regulatory activity, since it can also regulate the expression of genes that code non-coding RNA (ncRNA), which, in turn, can regulate mechanisms of iron homeostasis among other processes. Although there is a significant number of ncRNAs described in *E. faecalis*, to date, there is no evidence that these molecules participate in the regulation of components involved in iron homeostasis in this bacterium. Therefore, with the exposed antecedents, the following hypothesis was proposed: Non-coding RNAs are involved in iron homeostasis in *Enterococcus faecalis*, which abundance is controlled by the Fur regulator.

To verify whether our hypothesis is true, we proposed the following experimental design: 1) Update the Fe homeostasis model through a literature review and subsequent search for these elements in the *E. faecalis* proteome. Then, from a set of 585 ncRNAs using the IntaRNA bioinformatics tool, we searched for targets of these ncRNAs among the elements of the new homeostasis model. Finally, we performed a conservation analysis of selected ncRNAs in the order *Lactobacillales*. 2) Verify if these selected ncRNAs are

capable of responding transcriptionally to different Fe availability in *E. faecalis*. 3) Using *E. faecalis* mutant strain for the Fur regulator, verify if this transcription factor is directly or indirectly involved in the transcriptional regulation of these ncRNAs.

As results, we managed to update the Fe homeostasis model of *E. faecalis* by increasing the number of components by 36%. On the other hand, the search for ncRNAs that were regulating genes that code these components of the new *E. faecalis* homeostasis model resulted in 4 ncRNAs (3 regulators of the FeoB transporter and 1 regulator of hemolysin). We found that the conservation of these selected ncRNAs occurred in 3 of the 4 ncRNAs and in species close to *E. faecalis* in the order *Lactobacillales*, confirming the phylogenetic bias in the conservation of these elements.

The quantification of the selected ncRNAs in the different Fe availabilities revealed that they are capable of responding transcriptionally to the metal, which suggested that there must be a transcription factor that modulates this activity and that, in turn, responds to Fe, such as Fur example. The quantification of the selected ncRNAs in *E. faecalis*  $\Delta fur$  under basal conditions revealed a change in the abundance of these elements, which is indicative that Fur could be involved in the regulation of these elements. However, the absence of Fur boxes in the promoters of the genes that code ncRNAs suggests that the regulation is of an indirect type and that the ncRNAs are responding to a secondary effect such as changes in the intracellular concentration of Fe and through a second transcription factor.

Since Fe is an essential micronutrient for *E. faecalis*, deepening the study of new ncRNAs involved in the control of metal homeostasis in this opportunistic pathogen is essential for the development of new control strategies, such as the generation of new antimicrobials.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Enterococcus faecalis* y su relación con el ambiente

*Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positivo, anaerobia facultativa que usualmente forma parte de la microbiota intestinal humana. Durante los últimos 20 años ha tomado gran relevancia, ya que se ha posicionado como uno de los principales patógenos causantes de enfermedades nosocomiales, endocarditis e infecciones del tracto urinario [1]. Sin duda, la aparición de cepas resistentes a antibióticos, en particular a vancomicina, ha dificultado el tratamiento para detener el avance de la infección, transformándose así en un problema de salud pública en Estados Unidos y América Latina [2]. Además, *E. faecalis* es considerado como una bacteria persistente debido a su capacidad de permanecer periodos extensos en superficies, ser resistente a altas temperaturas, hipoclorito de sodio y algunas preparaciones de alcohol, lo que podría explicar su naturaleza de patógeno nosocomial y su ventaja selectiva por sobre otros miembros de la microbiota intestinal [3]. Otro factor en la aparición y persistencia de enfermedades provocadas por este patógeno es su habilidad para resistir ambientes altamente estresantes en el cuerpo humano, por ejemplo, la privación de hierro (Fe) en el tracto digestivo [4].

Un prerrequisito para el desarrollo y crecimiento de las bacterias es la adecuada cantidad de nutrientes disponibles. Por ello, cuando *E. faecalis* logra llegar al intestino humano y aumentar su población, debe adaptarse a una respuesta innata del cuerpo humano llamada “inmunidad nutricional”, mecanismo que tiene por objetivo evitar que la bacteria pueda utilizar distintos micronutrientes (principalmente Fe, pero también zinc y manganeso) para su propio metabolismo [5].

## 1.2 La dualidad del hierro

El Fe es uno de los metales más abundancia en la tierra. Debido a sus propiedades químicas, en particular su potencial redox, es utilizado como cofactor de proteínas involucradas en diversos procesos biológicos como fijación de nitrógeno, respuesta a estrés, metanogénesis, respiración celular, patogénesis, formación de biopelículas, colonización y ciclo de Krebs, entre otros [6]. A pesar de su esencialidad para las bacterias, es un metal difícil de obtener para las bacterias. Esto debido a que su uso en procesos celulares requieren la forma de ion ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ), y que, gracias a la atmósfera oxidante éste metal naturalmente se encuentra en estado oxidado ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Por el contrario, en ambientes o microambientes desprovistos de oxígeno a pH relativamente bajos predomina la forma de ion ferroso [7].

A pesar de sus múltiples usos dentro de procesos vitales, la concentración intracelular de Fe debe ser estrictamente controlada, puesto un exceso del metal dentro del citoplasma de la bacteria, puede inducir la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton/Haber-Weiss mediante la cual se produce peróxido de hidrógeno, ion superóxido y radicales hidroxilos, cuya reactividad provoca daño en el ADN, lípidos y proteínas [6]. Por el contrario, el déficit de Fe lleva a una disminución en la viabilidad de la bacteria [8]. Esta dualidad que presenta el metal ha conducido a las bacterias a desarrollar mecanismos encargados de controlar su correcta concentración a nivel intracelular. La homeostasis de Fe se define como las vías de captación, distribución, expulsión y detección que permiten a los organismos mantener un rango de concentración intracelular apropiado (a menudo estrecho) de este metal sin hacer daño en la bacteria [9].

## 1.3 *Enterococcus faecalis* y la homeostasis de hierro

Como respuesta a la absorción de micronutrientes, en particular Fe, (inmunidad nutricional) por parte del ser humano en el intestino, *E. faecalis* primeramente reconfigura su transcriptoma con el fin de superar este obstáculo a través de la sobre expresión de canales de captación de hierro y síntesis de sideróforos y, por otro lado, disminuyendo la expresión de proteínas hierro-dependientes (*Iron sparing response*), las cuales son reemplazadas por la producción de proteínas Fe-independientes de función análoga [7].

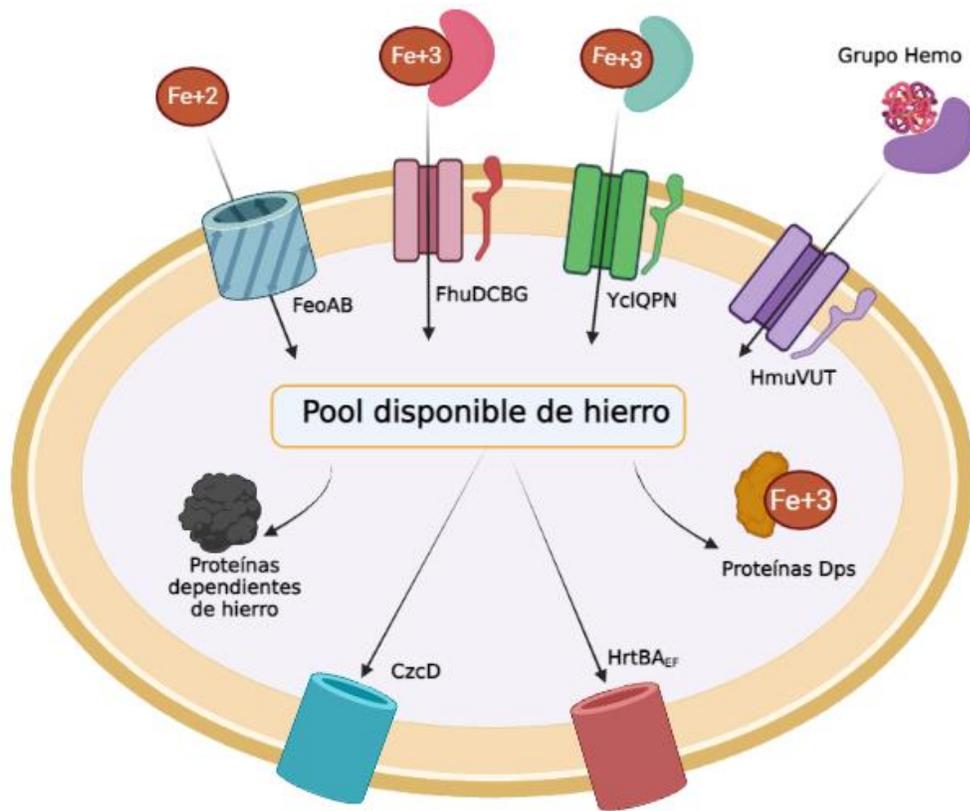
El año 2012 se realizó un estudio liderado por Latorre y cols. que tenía por objetivo identificar los mecanismos de homeostasis de Fe en *E. faecalis*. Para esto, se utilizó una

estrategia bioinformática para la identificación *in silico* de proteínas involucradas en la homeostasis de Fe en otras bacterias dentro del genoma de *E. faecalis*. Primero, se generó una base de datos de proteínas relacionadas a la homeostasis de Fe en bacterias recopilando información desde la plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Luego, mediante la herramienta BlastP se rastrearon estas proteínas en el proteoma de *E. faecalis*, logrando identificar un total de 16 candidatos involucrados en la homeostasis de Fe en esta bacteria. Posteriormente, se evaluó por posibles cambios de abundancia en los transcritos de los candidatos expuesto a un medio suplementado con FeCl<sub>3</sub> (exceso de Fe) y suplementado con el quelante de Fe 2'2'-DPD (déficit de Fe) [4]. Como resultado, se logró proponer el primer modelo de homeostasis de hierro en *E. faecalis* descrito a esa fecha, el cual consiste en cuatro procesos (**Figura 1**):

i) **Sistemas de captación:** Estos sistemas están compuestos por sistemas tipo ABC y transportadores de metales divalentes. En *E. faecalis* se encuentran codificados en los operones *yciQPN* (transportador de ferricromo), *fhuDCBG* (transportador de hidroxamato), ambos encargados del transporte de sideróforos. Adicionalmente, está codificado el operón *feoAB*, cuya función es el transporte de ion ferroso hacia el citoplasma. Finalmente, se encuentra codificado en el genoma de *E. faecalis* el operón *hmuVUT*, asociado a la captación e importe de grupo hemo a través de hemóforos [4,8]. Los transportadores ABC son una familia de proteínas de membrana que están involucradas en procesos de transporte mediante la utilización de ATP. Brevemente, su mecanismo de acción se basa en dos dominios muy conservados: un dominio de unión de nucleótido (DUN) y otro de transmembrana (DTM). La unión e hidrólisis de ATP mediada por el DUN provoca un cambio conformacional en el dominio que tiene como resultado el paso del Fe a través de la membrana plasmática. A pesar de que existen distintas clases de transportadores ABC (I, II y III) el mecanismo de acción es conservado entre ellos, diferenciándose en la afinidad de éstos por las distintas moléculas transportadas, siendo los de tipo II de alta afinidad y encargados de transportar moléculas relacionadas a Fe como sideróforos y hemóforos [10].

Sumado a los mecanismos de homeostasis mencionados, existe otra vía de obtención de Fe basada en los sideróforos, moléculas de bajo peso molecular con gran afinidad y especificidad por ion férrico. Estas moléculas son sintetizadas en el citoplasma para luego ser liberadas al espacio extracelular con el objetivo de captar Fe, las cuales finalmente son ingresadas nuevamente a través de un receptor de sideróforos acoplado a un transportador ABC [11]. En el caso de *E. faecalis*, se ha demostrado la existencia de sideróforos del grupo

de los hidroxamatos, además de poseer una fuerte actividad proteolítica con el fin de obtener hierro a partir de la lactoferrina y transferrina, “*carriers*” por excelencia de este micronutriente en el ser humano [12]. Igualmente, existe otra fuente de Fe externa llamados los hemóforos, moléculas cuya función es captar grupos hemo provenientes del ser humano y que en la bacteria son fuente del metal y, adicionalmente, funcionan como grupo prostético de algunas enzimas [13]. Se ha descrito que varias especies del género *Enterococcus* son proteolíticamente activas frente a transportadores del grupo hemo como la hemoglobina [14]. A pesar de que la mayoría de las especies pueden sintetizar su propio grupo hemo, a la fecha, no se han descrito mecanismos en *E. faecalis* involucrados en su síntesis, siendo al parecer la única vía de obtención de este grupo la captación extracelular a través de hemóforos [15].



**Figura 1.** Modelo de los elementos de homeostasis de Fe identificados a la fecha en *E. faecalis*. Esta bacteria es capaz de adquirir Fe en su forma reducida a través del transportador FeoB, como también en forma de sideróforos (transportadores FhuDCBG y YciQPN) y finalmente, puede ingresar grupo hemo para ser utilizado como fuente del micronutriente mediante el transportador HmuVUT. La sumatoria del hierro transportado genera un *pool* disponible que puede ser utilizado en proteínas cuya función depende de este metal, o también ser almacenado en forma de ion férrico por las proteínas Dps. Finalmente, para evitar un exceso a nivel celular de hierro, y por ende daño por estrés oxidativo, *E. faecalis* posee bombas de expulsión como CzcD y HrtBA<sub>EF</sub>, cuya función principal es la expulsión de Fe y de grupo hemo, respectivamente.

ii) **Distribución y almacenamiento intracelular:** En *E. faecalis* se identificó la existencia de las proteínas de almacenamiento de Fe del tipo Dps, perteneciente al grupo de las ferritinas, las cuales poseen tres actividades [4,7]: ferroxidasa, unión a Fe y unión al ADN. La primera permite la oxidación de átomos de Fe para posteriormente unirse a ellos y funcionar como una reserva del micronutriente al oligomerizar 12 monómeros de esta proteína [16]. Adicionalmente, las proteínas Dps son capaces de unirse al ADN de manera inespecífica con el fin de proteger a esta molécula del estrés oxidativo producto del Fe [17].

iii) **Expulsión:** Realizado a través de *Cation Diffusion Facilitators* (CDF). Los CDF conforman una familia de proteínas acopladas a la membrana cuya función es la expulsión de metales desde el citoplasma. Estos transportadores y su funcionalidad están conservados en bacterias [18]. En *E. faecalis* está presente CzcD, uno de los primeros CDF caracterizados en bacterias y, a pesar que su mecanismo de acción es conservado, la especificidad por metales puede ser distinta, ya que se ha reportado que en *Bacillus subtilis* este transportador es esencial en la tolerancia a cobre, mientras que en *E. faecalis* está involucrado en la respuesta de expulsión del metal frente al exceso de éste [19,4].

iv) **Regulación transcripcional:** Llevado a cabo principalmente por proteínas capaces de controlar la expresión de genes que codifican para proteínas asociadas a la mantención de los niveles normales de Fe, incluyendo los mecanismos de homeostasis, resistencia y detoxificación, destacándose el genoma de *E. faecalis* el factor transcripcional Fur [8]. En una publicación del año 2021 se logró caracterizar un nuevo elemento de homeostasis de Fe involucrado en la regulación de la concentración de grupo hemo en el citoplasma de *E. faecalis* [20]. A pesar del carácter esencial de esta molécula, en cantidades excesivas el grupo hemo puede provocar efectos adversos a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, por ende, su concentración debe ser estrictamente regulada. De esta manera, la homeostasis del grupo hemo está regulada por FhtR (*Faecalis Heme Transport Regulator*) el cual es un factor de transcripción que induce la expresión de un gen que codifica un transportador de expulsión del grupo hemo llamado llamado HrtBA<sub>EF</sub>.

#### 1.4 Regulación transcripcional de la homeostasis de hierro mediante Fur

A nivel del control de la expresión de genes relacionados a la homeostasis de Fe en bacterias, encontramos al regulador maestro Fur (*Ferric Uptake Regulator*) como el mejor descrito a la fecha [21]. Esta proteína está conservada entre las distintas especies

bacterianas, tales como *Escherichia coli*, *Vibrio sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* y *B. subtilis*, entre otras. Además de controlar mecanismos de ingreso de Fe, se ha descrito que también puede regular una serie de genes que codifican diversas funciones del metabolismo basal [22]. A nivel de su mecanismo de acción, esta proteína posee la capacidad de unirse al ADN por su extremo amino terminal para reprimir la transcripción de genes, mientras que en su extremo carboxilo terminal presenta un dominio para la unión del ion ferroso. Así, en su forma “apo” su afinidad por las cajas Fur (sitio de unión en el ADN para la proteína) es baja, incapaz de unirse al promotor. Por el contrario, en un exceso del micronutriente, átomos de Fe son coordinados por Fur cambiando su estructura permitiendo la dimerización de Fur, lo que trae consigo un incremento en la afinidad de esta proteína por las secuencias promotoras de los genes blanco, uniéndose a ellas y de esta manera reprimiendo la transcripción [23]. A pesar de que se creyó por mucho tiempo que Fur actuaba solo como represor, se ha reportado que tiene una función de activador [24]. Mediante estudios de RNA-seq y microarreglos se ha reportado que en bacterias mutante Fur se produce una cantidad de cambios transcripcionales significativos que involucran a genes que poseen cajas Fur como otros que no la tienen. Este último grupo de genes no está regulado directamente por Fur por lo que la regulación mediante este factor de transcripción es indirecta y se da en otro nivel, por ejemplo, regulación por ARN no codificantes o regulación por sobre otros factores de transcripción [8,25,26].

En *E. faecalis*, recientemente se logró establecer una red específica de genes regulados por Fur [8], conformada por elementos relacionados a la homeostasis del hierro, como los operones *fhuDCBG*, *yclQPN* y *feoAB*. La acción de Fur sobre estos genes es mediante una unión directa, puesto que los promotores de estos operones presentan una caja Fur conservada. Dentro del mismo trabajo, en *E. faecalis* se describió que la ausencia de Fur induce cambios a niveles globales en el transcriptoma de la bacteria, tanto en presencia como en ausencia de Fe. Interesantemente, la mayoría de estos cambios en el transcriptoma están dados por genes que no tienen cajas Fur en su promotor, lo que sugiere una regulación indirecta por parte de Fur.

Interesantemente, en otras bacterias Fur no solo se ha vinculado al control de la expresión de genes relacionados con Fe. Del mismo modo es capaz de afectar directamente la abundancia de ARNnc de pequeño tamaño. Tal es el caso de RyhB en *E. coli*, el cuál además regula la expresión de diversos componentes de homeostasis de hierro [27]. Este resultado supone una regulación génica compleja activada por cambios en la

biodisponibilidad del metal, donde además de los factores de transcripción, existen otros mecanismos de regulación post-transcripcional involucrados.

### 1.5 ARNs pequeños y homeostasis de hierro

Los ARN pequeños o “*small RNA*” (sRNA) son pequeños transcritos de 50 a 300 nucleótidos aproximadamente sin sitio de unión a ribosoma. Por ende, no codifican proteínas, por lo cual se les denominan ARN no codificantes (ARNnc) [28]. Su acción principal es actuar sobre los ARN mensajeros (ARNm), en general funcionando como desestabilizadores de éstos, así impidiendo su traducción o favoreciendo su degradación, o contrariamente, pueden actuar estabilizando a los mismos dependiendo de los requerimientos de la bacteria [29].

Su descubrimiento es relativamente antiguo. El primer ARNnc caracterizado data del año 1984, descrito en el modelo de *E. coli* el cuál se denominó MicF cuya función es inhibir la traducción del ARNm de la porina OmpF [30]. Una característica notoria de estos ARNnc es que pueden regular más de un ARNm, dependiendo si su acción es en *cis* o *trans*. En el caso de los *cis*, se encuentran los riboswitches [31], codificados dentro de los mismos ARNm regulados en la región 5'UTR. Generalmente, alteran la conformación del blanco formando estructuras terminadoras o antiterminadoras en el ARNm. Otra clase de ARNnc que actúa en *cis* son los *cis*-ARNnc, ubicados en regiones intergénicas de los genes que regulan. Su mecanismo de acción se basa en la complementariedad de bases, dado que son transcritos en sentido contrario del ARNm que regulan, otorgándole un alto grado de especificidad. Este dúplex de ARNm-ARNnc es degradado por endonucleasas como la ARNasa E y la ARNasa III [32].

Adicionalmente, existen los ARN pequeños que actúan en *trans* o *trans*-ARNnc, cuya particularidad es estar localizados en un área distinta al gen o ARNm que están regulando. Poseen el mismo mecanismo basado en complementariedad de los *cis*-ARNnc pero con menos eficiencia, ya que el grado de apareamiento de bases es menor y por ende, la unión que se establece entre el ARNnc y el ARNm es más inestable en comparación a los que actúan en *cis*. En este contexto, el hecho que la unión no sea perfecta dota al *trans*-ARNnc de mayor versatilidad de reconocimiento de secuencia permitiendo regular varios blancos [33]. Un elemento esencial en esta interacción es la proteína chaperona Hfq cuya función consiste en estabilizar y facilitar la interacción entre el ARNnc y su blanco [28,29].

En términos de la homeostasis de Fe, uno de los ARN pequeños más estudiado es RyhB en *E. coli*, cuya longitud alcanza los 90 nucleótidos capaz de regular más de 50 genes relacionados a la homeostasis del metal, tales como proteínas esenciales o dependientes de Fe, transportadores de captación y control de la biogénesis de “clusters” Fe-S [34], estos últimos necesarios para ciertas proteínas involucradas en reacciones de óxido-reducción. En relación con la regulación por parte de RyhB, destaca su versatilidad pudiendo ejercer el efecto sobre el blanco por distintos mecanismos. En la mayoría de los casos, la regulación de los ARNnc sobre sus blancos es negativa, impidiendo la unión del ribosoma a través de la formación de un híbrido con el mensajero. Tal es el caso del transcrito que codifica la proteína SodB (encargada de aliviar el estrés oxidativo), la cual utiliza Fe para su función [35].

Cuando se trata de operones, en general los ARNnc se unen al primer gen codificado, induciendo la degradación de todo el mensajero. En el caso del operón *iscRSUA* (*iscR* regulador del operón y *iscSUA* involucrado en la síntesis de Fe-S clusters), RyhB se une a la zona 3' del ARNm reclutando a RNAsas que escinden parte de este sitio y manteniendo la zona 5' (*iscR*) estable para su traducción. De esta manera, la traducción gen *iscR* impide el ensamble de la maquinaria formadora de los Fe-S clusters en condiciones de déficit de hierro [36].

De modo contrario, RyhB también puede estabilizar ciertos transcritos como el ARNm de *shiA* (síntesis de siderófos) el cual naturalmente forma una horquilla que impide la unión del ribosoma a su sitio de unión. Así, cuando RyhB se sintetiza es capaz de desarmar esta horquilla exponiendo el sitio de unión al ribosoma para posteriormente ser traducido el ARNm blanco [37]. En la misma línea, el ARNm de *cirA* (receptor de sideróforos) es bloqueado en su sitio de unión a ribosoma por la proteína Hfq; sin embargo, la unión de RyhB al ARNm posibilita la salida de Hfq y con esto la traducción del ARNm [38].

Con el fin de llevar un control estricto sobre la captación y expulsión de Fe, los mecanismos regulatorios de la expresión de los componentes de la homeostasis del metal están controlados entre sí [39]. Tal como se mencionó en la sección anterior, cuando existe un exceso del micronutriente, el regulador Fur se une al promotor de *ryhB* impidiendo su transcripción. De manera contraria, en condiciones de déficit de Fe, RyhB puede unirse al ARNm de Fur para impedir la traducción de esta proteína y con ello aumentar la transcripción de los genes relacionado a los mecanismos de entrada del metal. Este sistema

de regulación de homeostasis de Fe está conservado en diferentes especies bacterianas. Por ejemplo, un análogo de RyhB en *Neisseria meningitidis* llamado NrrF, capaz de regular negativamente al ARNm de SdhA y SdhB, que al igual que *ryhB*, también está regulado negativamente por Fur [40]. En otras bacterias como *B. subtilis* se encuentra el ARNnc FsrA, regulado por Fur que afecta la expresión de genes que codifican para proteínas que utilizan “clusters” Fe-S para su funcionamiento en condiciones de déficit de Fe [41].

## 1.6 ARN no codificantes y *Enterococcus faecalis*

En base a todos los antecedentes presentados, es bastante claro que los ARN están muy lejos de solo cumplir las funciones básicas que se le atribuían hasta hace solo unas décadas como transmisor de información genética, estructural y catalítica. Actualmente, se han transformado en centro de investigaciones debido a su rol como regulador de procesos como reparación del ADN, metabolismo de azúcares, homeostasis del Fe, estrés oxidativo y virulencia [42,43].

El avance en las técnicas de secuenciación y herramientas bioinformáticas han sido uno de los principales aliados a la hora de buscar posibles ARNnc y sus genes blanco en especies bacterianas [44]. En este sentido, existen diversos programas asociados a la búsqueda de interacción entre un ARNm y un ARNnc. Uno de los más utilizados en los últimos años es IntaRNA, plataforma disponible en línea la cual utiliza un algoritmo para predecir la interacción entre moléculas de ARN, a través de la identificación de mínimos de energía libre de Gibbs y con ello identificar las uniones más estables. Esta herramienta posee una serie de ventajas, como su facilidad de uso de la interfaz del usuario siendo de fácil utilización; ofrecer un mapa detallado de la interacción de manera que se puede evaluar la energía libre en cada zona del híbrido de ARNnc-ARNm; la posibilidad de mapeo de mutaciones puntuales; sumado a una alta versatilidad, ya que puede predecir interacciones en organismos procariontes a eucariontes [45,46].

En el caso de *E. faecalis*, en la literatura se puede encontrar el trabajo realizado por Shioya y cols., en el cual usando predicciones bioinformáticas obtenidas desde IntaRNA, seleccionaron 11 ARNnc basándose en el criterio de expresión génica de éstos en distintas fases de crecimiento bacteriano de *E. faecalis* para posteriormente validar su función [47].

Sumado a este trabajo, el grupo de liderado por Michaux y cols., logró identificar un total de 230 posibles ARNnc de tamaño pequeño en esta bacteria a través de la utilización

de la misma herramienta bioinformática. Dentro de los resultados, se logró describir de manera específica los sitios de inicio de transcripción de los ARNnc y terminadores de éstos, sumado a la conservación de estos elementos dentro del género y con otras especies. Adicionalmente, se caracterizó algunos ARNnc que se expresan en condiciones ambientales específicas (sales biliares, antibióticos, entre otros), prediciendo su posible participación en la patogenicidad de *E. faecalis* [48]. Estos trabajos dan cuenta de la presencia de diversos ARNnc codificados en el genoma de *E. faecalis*; sin embargo, a la fecha no existe en la literatura información disponible sobre la relación entre ARNnc y mecanismos de homeostasis de hierro en esta bacteria.

Resumiendo, *E. faecalis* es una de las principales bacterias causantes de enfermedades nosocomiales, siendo uno de los patógenos oportunistas que más problemas causan en diversos países. Si bien la respuesta transcripcional de los mecanismos de homeostasis de *E. faecalis* está coordinada principalmente por la acción de la proteína reguladora Fur a nivel transcripcional, desconocemos la existencia de otros mecanismos, tales como ARNnc los cuales podrían afectar, a nivel post transcripcional, la expresión de genes asociados a la homeostasis de Fe en *E. faecalis*. En este contexto, la presente tesis de Magíster tuvo como objetivo identificar ARNnc probablemente envueltos en mecanismos de homeostasis de Fe en *E. faecalis*. Además, identificar en rol del regulador de homeostasis de Fe, Fur, en la abundancia de estos ARNnc.

## **2. HIPÓTESIS**

La respuesta transcripcional a hierro en *Enterococcus faecalis* incluye ARN no codificantes vinculados a la homeostasis del metal, cuya abundancia además es controlada por el regulador Fur.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si Fur regula la abundancia de ARN no codificantes vinculados a mecanismos de homeostasis de hierro en *Enterococcus faecalis* activados o reprimidos bajo la exposición al metal.

#### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar, clasificar y seleccionar ARNnc en función de su conservación en el orden *Lactobacillale* y su relación con posibles blancos vinculados a homeostasis de hierro codificados en el genoma de *E. faecalis*.
2. Determinar posibles cambios en la abundancia de los ARNnc seleccionados bajo diferentes disponibilidades de hierro en *E. faecalis*.
3. Determinar si la ausencia del regulador Fur afecta la abundancia de los ARNnc seleccionados en *E. faecalis*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos y materiales

#### 5.1.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

En la presente tesis se utilizaron las cepas de *E. faecalis*: OG1RF (silvestre) y OG1RF  $\Delta fur$  adquirida desde el laboratorio de la Dra. Barbara Murray de la Universidad de Texas – EUA. 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)  $Na_2HPO_4$  (Merck), 0,5 % (p/v) extracto de levadura (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). En los cultivos sólidos en placa (agar N), se utilizó la misma composición del medio N al cual se le agregó agar bacteriológico al 1,5 % (p/v) (Oxoid). Los cultivos sólidos se incubaron a una temperatura de 37°C en una estufa Precision Incubator 300 (Memmert, Schwabach, Alemania). Los cultivos líquidos se incubaron en una estufa LSI – 3016R (LabTech, Salt Lake, EUA) con agitación de 140 rpm 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- 11 UV/VIS (Perkin Elmer, New York, EUA) a una longitud de onda de 600 nm y 230/260/280 nm respectivamente.

#### 5.1.2 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.

### 5.1.2 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 3 Plus (Primer Biosoft International), utilizando como molde el genoma secuenciado de *E. faecalis* OG1RF (GenBank: CP002621.1).

**Tabla 1.** Partidores utilizados en las reacciones de amplificación y cuantificación mediante qPCR. En la tabla se señala el nombre del partidor para cada ARNnc, la secuencia del partidor y la temperatura de alineamiento o *melting* ( $T_m$ ).

Partidor	Primer Forward	Primer Reverse	$T_m$ (°C)
ncRNA_2860	TTTCGCAAAGACAGACATCG	CGGAAGATGGGCTACGTCTA	60
ncRNA_3091	ATTGCCTGACAACACGTTCA	GGATTTTTGAGCCAATGGAA	60
ncRNA_3122	AACGGACGAGCAGCTATGAT	GTCTGGTTAATCGCCATCGT	60
ncRNA_2860_cDNA	-	ACAAAAATCGACAAGAATGGTCA	60
ncRNA_3122_cDNA	-	GCATAGGCGCAGGTTTAAGTAT	60
ncRNA_3091_cDNA	-	TACAAACAATGTTTCCAGAC	60
16S_cDNA	-	ACCTTCCGATACGGCTA	60
16S	GTGAGGTAACGGCTCACCAA	TGCTCGGTCAGACTTTCGTC	60

## 5.2 Metodología

### 5.2.1 Búsqueda de nuevos componentes de homeostasis de hierro en *E. faecalis*

Con el fin de identificar nuevos componentes de homeostasis de Fe en bacterias a partir del año 2012 [4], año en que fueron descritos los componentes de homeostasis de Fe en *E. faecalis* y de esta manera, actualizar el modelo se utilizó la plataforma pública *National Center of Biotechnology Information* (NCBI por sus siglas en inglés) usando como palabras claves de búsqueda “*Bacterial*” “*Iron*” “*Homeostasis*”. Posteriormente, se rastreó posibles homólogos de estos elementos en el genoma secuenciado de *E. faecalis* OG1RF a través de la herramienta BlastP. De los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellas proteínas con *E-value* inferiores a 1E-10, con una identidad superior al 30 % y una similitud superior al 50 % en relación con los elementos de homeostasis de Fe, las que se definieron bioinformáticamente como homólogos por identidad [49].

### 5.2.2 Búsqueda de blancos de los ARNnc mediante IntaRNA

Para un universo de 585 ARNnc secuenciados individualmente de tamaño largo y pequeño identificados en el Laboratorio de Bioingeniería de la Universidad de O'Higgins a través de secuenciación masiva en condiciones de exceso y déficit de Fe (datos no publicados) y de la literatura [48], se buscaron posibles blancos transcripcionales asociados a homeostasis de Fe presentes en el genoma secuenciado de *E. faecalis* OG1RF (NCBI ID 474186) mediante el software IntaRNA. Utilizando como secuencia de entrada la secuencia nucleotídica de los elementos de homeostasis de Fe (integrando los datos de esta tesis) y la secuencia de los ARNnc se buscaron posibles interacciones ARNm-ARNnc. A partir de estos datos, se generó un archivo .xlsx con la siguiente información: ID ARNnc, tamaño en nucleótidos, predicción del lugar del mecanismo de acción (*cis* o *trans*) y su blanco. De esta manera se obtuvieron ARNnc que según la predicción bioinformática estarían regulando ARNm relacionados a componentes de homeostasis de Fe en *E. faecalis*. Posteriormente, éstos ARNnc mencionados anteriormente fueron sometidos a un filtro según su conservación en la secuencia nucleotídica en el orden *Lactobacillale* seleccionando aquellos que hayan estado conservados en al menos una especie del orden.

### 5.2.3 Análisis de conservación dentro del orden de los *Lactobacillales*

Utilizando como secuencia de entrada los ARNnc seleccionados como candidatos, mediante el software BlastN se analizó la conservación de estas moléculas dentro de especies pertenecientes al orden *Lactobacillales* con genoma secuenciado [49]. Estas especies correspondieron a: *Streptococcus pyogenes* MGAS8232, *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus pyogenes* SF370, *Streptococcus pyogenes* SSI-1, *Streptococcus mitis* NCTC12261, *Streptococcus pneumoniae* R6, *Streptococcus pneumoniae* TIGR4, *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus agalactiae* 2603V/R, *Streptococcus agalactiae* NEM316, *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus johnsonii* NCC533, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I11403, *Enterococcus hirae* ATCC 9790 y *Enterococcus faecium* ATCC 8459. Aquellos homólogos por identidad con un *E-value* menor a 0.01 y que, además, tuvieran una cobertura por sobre el 50% se consideraron como conservados [50].

### 5.2.4 Búsqueda de sitios de unión a Fur en los ARNnc

La búsqueda de sitios de unión a Fur en los promotores de los ARNnc seleccionados (ncRNA\_2860, ncRNA\_3122, ncRNA\_3091) se llevó a cabo mediante un alineamiento múltiple de sus promotores. Para el análisis de los promotores, se consideraron 300 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción debido a que los motivos de unión a Fur en su regulón en *E. faecalis* se encuentran dentro de ese rango [8]. Este alineamiento se realizó mediante el programa bioinformático ClustalW con sus parámetros por defecto y con el editor de alineamientos BioEdit [51].

### 5.2.5 Extracción de ARN total

El ARN total se extrajo de células provenientes de cultivos de la cepa de *E. faecalis* OG1RF o  $\Delta fur$  crecidos en medio N sin suplemento (basal) y con suplemento de 0,5 mM 2,2'-DPD o 0,5 mM de  $FeCl_3$ . El protocolo consistió en crecer tres cultivos independientes (réplicas biológicas) de *E. faecalis* en 4 mL de medio N en tubos Falcon de 15 mL durante toda la noche. Luego se ajustaron alícuotas a  $DO_{600nm} = 0,1$  en 20 mL en tres tubos Falcon de 50 mL (basal, tratamientos de déficit y exceso) para crecerlas durante 3 horas a 37°C y agitación. Posterior a las 3 horas se ajustó la densidad óptica de los cultivos y se separaron en dos tubos Falcon de 50 mL para luego suplementar uno de ellos con 2,2'-DPD o  $FeCl_3$ . De esta manera cada tratamiento aplicado posee un control sin suplementación proveniente del mismo cultivo. El tratamiento ya sea con 2,2'-DPD o  $FeCl_3$  se realizó durante 3 horas. Se extrajeron alícuotas de 5 mL en tubos Falcon de 15 mL se centrifugaron a 13850 g durante 3 min. Para eliminar el exceso del metal, el sedimento bacteriano se lavó, en primera instancia, con agua estéril bidestilada ( $H_2O_{dd}$ ). Posteriormente, se centrifugó a 13850 g por 3 minutos y se realizó un lavado con NaCl (0,85%, frío). Luego, se realizó un lavado con EDTA (0,1 mM, frío). Finalmente, un último lavado con NaCl (0,85%, frío) y se realizó una centrifugación con las condiciones anteriormente mencionadas. Posterior a esta última centrifugación, se recuperó el pellet y se dejó durante 20 minutos a 37°C en presencia de lisozima (10 mg/mL) para lisar las bacterias. En síntesis, en este punto se obtuvieron tres muestras correspondientes a la condición basal (sin tratamiento), condición déficit (2,2'-DPD) y condición exceso ( $FeCl_3$ ). Luego de la incubación, se llevó a cabo la primera extracción de ARN utilizando el sistema comercial Maccura Nucleic Acid Extraction Kit (Chengdu, China) según las instrucciones del proveedor.

En una segunda extracción de ARN se utilizó QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del proveedor utilizando como material de partida el ARN recuperado de la primera extracción. A fin de descartar contaminación con ADN, las muestras de ARN se trataron con 10 U de DNAasa (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, el ARN se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para posteriormente cuantificar y verificar algún tipo de contaminación mediante el espectrofotómetro NanoDrop 8000.

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).

### 5.2.6 Síntesis de ADNc de hebra simple y Transcripción Reversa

La síntesis de ADNc de hebra simple se realizó *in vitro* mediante el uso de partidores específicos usando como material de partida el ARN de las muestras tratamiento y control obtenidas en el punto anterior. La reacción de transcripción reversa se realizó a partir de 0,5 µg de ARN total, 1 µL partidor (10 µM) y se aforó a un volumen de 12 µL de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó por 5 min a 65 °C. Pasado este tiempo, se agregaron 2 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 4 µL de buffer de reacción 5X y 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa RevertAid (200 U/µL). El volumen final de la reacción fue de 20 µL. La mezcla final se incubó durante 1 hora a 42°C y las muestras se almacenaron a -20°C. La cantidad de ADNc se cuantificó a través de espectrofotometría mediante el espectrofotómetro NanoDrop 8000.

### 5.2.7 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación de abundancia relativa de los ARNnc, cada reacción se llevó a cabo utilizando el PowerUp SYBR Green Máster Mix (Thermo Fischer) en tubos Eppendorf de PCR de 200 uL. La mezcla final contenía 1 µL de cada partidor (concentración final de 400 nM), 10 ng de ADNc, 12,5 µL de MasterMix y se agregó agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25 µL. 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 2 min, b) Amplificación, 40 ciclos de: 1) desnaturalización, 95°C por 15 segundos; 2) Hibridación/ Extensión a 60°C por un minuto. La obtención de los datos se realizó utilizando el programa Light Cycler Software v3.5 (Roche). Los resultados se expresaron como la razón de cambio entre la abundancia normalizada del transcrito para el gen cuantificado 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, en este caso el gen 16S [52] mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Razón de cambio normalizado} = \frac{E_{f \text{ gen}^{\Delta C_p}}}{E_{f \text{ gen normalizador}^{\Delta C_p}}}$$

**Ef:** Eficiencia promedio de la pareja de partidores durante todas las reacciones

**ΔCp:** 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.

### 5.2.8 Curvas de crecimiento

El objetivo de este experimento fue encontrar la máxima concentración de 2,2'-DPD y de FeCl<sub>3</sub> sin afectar el crecimiento bacteriano significativamente con respecto a la condición basal. A partir de un cultivo líquido crecido toda la noche en medio N a 37°C con agitación, se ajustó un inóculo con una DO<sub>600nm</sub> = 0,05 en tubos Falcon de 50 mL en un volumen total de 20 mL con las siguientes condiciones: basal (sin suplementación), control y suplementado (2,2'-DPD o FeCl<sub>3</sub>). Adicionalmente se agregó un control sin bacteria (control de esterilidad). La aplicación del estímulo ya sea de quelante de Fe o cloruro férrico se realizó 30 minutos luego de medir el primer punto de la curva. Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C con agitación a 140 rpm. El crecimiento bacteriano se monitoreó mediante registro de absorbancia y cada 1 hora durante las primeras 8 h. 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:

$$TG = \frac{\ln 2}{k}$$

Donde:

**TG:** Tiempo generacional.

**k:** Pendiente de la fase exponencial de un gráfico linealizado Ln (DO<sub>600nm</sub>) vs tiempo (min).

### 5.2.9 Concentración intracelular de hierro

Se determinó el contenido intracelular de Fe tanto para la cepa OG1RF como para la mutante *Δfur* utilizando las condiciones de crecimiento, concentración y tiempo de exposición al metal que se utilizaron para los experimentos de curva de crecimiento. Desde los cultivos se obtuvieron directamente alícuotas de 6 mL ajustadas aproximadamente a una  $DO_{600nm} = 1$  (por triplicado) en cada una de las muestras. Estas últimas se centrifugaron a 9.400 g a 4°C durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de H<sub>2</sub>Odd estéril mediante vórtex, para posteriormente traspasar todo el contenido a un tubo Eppendorf de 2 mL. Luego estos tubos se centrifugaron a 17300 g por 3 min a 25°C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 1 mL de NaCl 0,1 M estéril y se centrifugaron a 17.300 g a 25 °C. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de EDTA 1 mM estéril, se centrifugó a 17.300 g por 3 min a 25°C y se eliminó el sobrenadante. Nuevamente se resuspendió en 1 mL de H<sub>2</sub>Odd estéril y se centrifugó por última vez a 17.300 g por 3 min a 25°C. Por último, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se guardó a -20°C para mediciones de metales por TXRF. La medición de metales por TXRF fue un servicio realizado por personal externo.

### 5.2.10 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, reportándose el promedio de las mediciones con sus respectivas desviaciones estándar. Los datos se analizaron estadísticamente mediante una prueba de ANOVA de una vía y una post prueba de Dunnet para establecer diferencias entre tratamientos y el control, utilizando para esto el software GraphPad Prisma 8.0. Ambos análisis se aplicaron utilizando los parámetros establecidos de base considerando diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis *in silico*

#### 6.1.1 Búsqueda de componentes de homeostasis de hierro en bacterias

Los mecanismos de homeostasis de Fe presentes en *E. faecalis* ya han sido descritos en un trabajo realizado por Lopez y cols [4]. Dado que el modelo es de hace 10 años fue necesario una actualización de éste, por lo que este objetivo está orientado a identificar nuevos componentes y con ello maximizar la posibilidad que alguno de estos nuevos mecanismos pueda ser regulado por un ARNnc. Primero, considerando la última actualización del modelo, se realizó una búsqueda bibliográfica de elementos de homeostasis de Fe en bacterias desde el año 2012 a la fecha, los cuales servirán como templado para la búsqueda en el genoma de *E. faecalis* de nuevos componentes. El análisis se limitó a proteínas que afecten directa o indirectamente el contenido de Fe disponible en el citoplasma, de manera que los mecanismos asociados a estrés oxidativos o proteínas que utilicen Fe para su función fueron descartadas del análisis aquí expuesto. Con este criterio, se encontraron 14 proteínas asociadas al manejo de la homeostasis de Fe en diversas bacterias (**Tabla 2**), entre los cuales se encuentran mecanismos de ingreso de sideróforos o Fe y elementos de expulsión del metal. Interesantemente, en el año 2021 el grupo liderado por Saillant y cols., identificó un factor de transcripción asociado a la homeostasis de Fe hemínico y, también, un mecanismo de expulsión para el mismo en *E. faecalis* [20].

**Tabla 2.** Lista de proteínas relacionadas a la homeostasis de Fe en bacterias descritas en la literatura desde el año 2012.

ID NCBI	Especie	Gram	Nombre	Anotación	Ref
WP_097080581	<i>Bacillus subtilis</i>	+	PfeT	Heavy metal translocatin P-type	53
AGG62481.1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	MntA	Metal ABC transporter	54
CAD6001315.1	<i>Escherichia coli</i>	-	MntH	Metal ABC transporter	55
WP_149844030.1	<i>Escherichia coli</i>	-	FecC	Iron-dicitrate ABC transporter	56
P39071.3	<i>Bacillus subtilis</i>	+	DhbA	Siderophore syntesis	57
QJZ01964.1	<i>Escherichia coli</i>	-	FieF	CDF family cation-efflux transporter	58
ALB18642.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	CtpD	Ferrous iron efflux system	59
WP_201417416.1	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	AitP	CDF family Co(II)/Ni(II) efflux transporter	60
OAH12109.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	IdeR	Iron-dependent repressor	61
ETT74870.1	<i>Bacillus cereus</i>	+	HlyIII	Hemolysin III	62
BCM56230.1	<i>Escherichia coli</i>	-	IceT	Metal transporter	63
AAO80235.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	FhtR	Heme sensor histidine kinase	20
CPM85197.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	HtrA	Heme sensor histidine kinase	20
VWQ01325.1	<i>Escherichia coli</i>	+	FetA	ABC transporter, ATP-binding protein	64

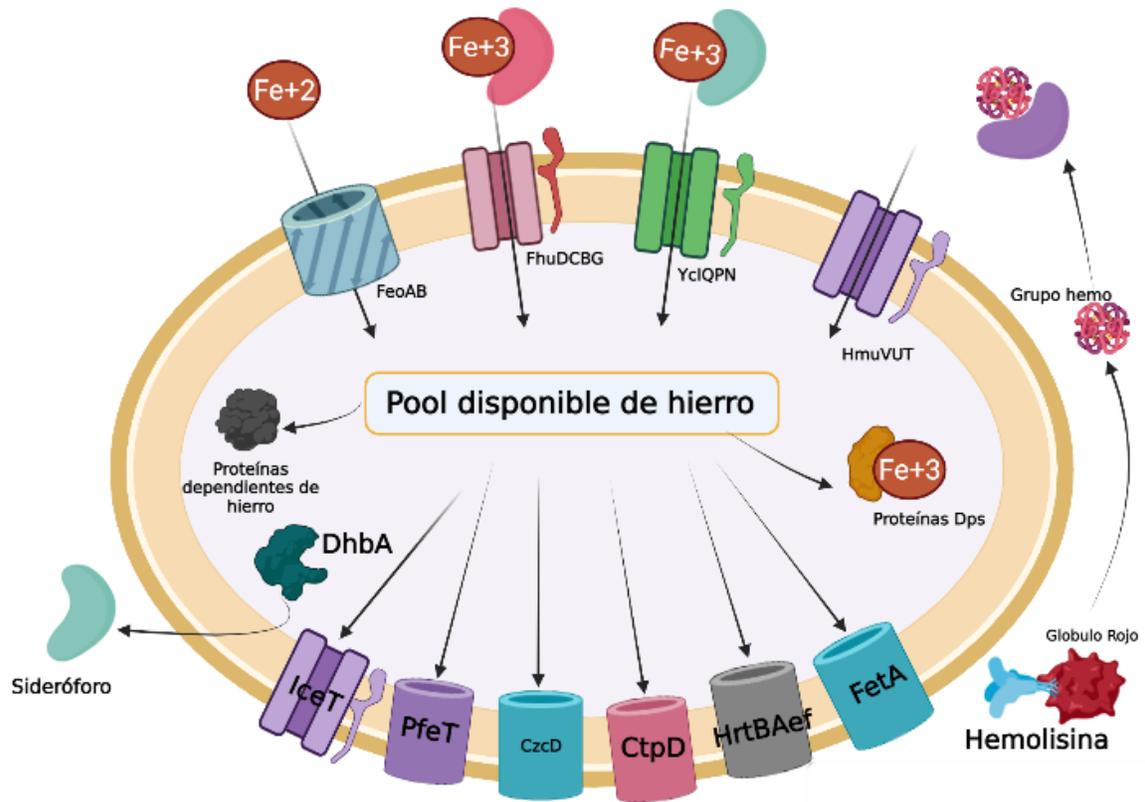
### 6.1.2 Nuevos componentes de homeostasis de Fe en *E. faecalis*

Con el propósito de determinar si los elementos asociados a homeostasis de Fe descritos en el punto anterior están presentes en el proteoma de *E. faecalis*, utilizando el algoritmo BlastP se realizó un análisis de alineamientos entre la secuencia proteica de los elementos presentados en la **Tabla 2** y el proteoma descrito de *E. faecalis*. En base a los resultados, 6 de los 14 elementos utilizados como templado presentaron un homólogo por identidad en el proteoma de *E. faecalis* (**Tabla 3**). Entre ellos, 4 proteínas se encuentran asociadas a la expulsión de Fe en *E. faecalis* (PfeT, CtpD, IceT y FetA), mientras que DhbA está relacionada a la síntesis de sideróforos. Finalmente, se identificó la proteína hemolisina (HlyIII), toxina cuya función es la degradación de glóbulos rojos para obtener grupos hemo a partir de ellos. Este análisis permitió actualizar el modelo descrito previamente, sumando 6 nuevos posibles componentes de homeostasis de Fe en *E. faecalis* (**Figura 2**). En conjunto se logró incrementar el 36% de componentes con respecto al modelo antiguo en su cantidad de elementos asociados a la regulación de este Fe en *E. faecalis*.

**Tabla 3.** Resultados de la búsqueda de proteínas de homeostasis presentes en bacterias (Tabla 1) dentro del proteoma de *E. faecalis*<sup>1</sup>.

ID templado	WP_09708058	P39071.3	ALB18642.2	ALB18642.2	BCM56230.1	VW101325.1
<b>Especie</b>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<b>Anotación</b>	PfeT	DhbA	CtpD	HlyIII	IceT	FetA
<b>Nombre del gen</b>	<i>pfeT</i>	<i>dhbA</i>	<i>ctpD</i>	<i>hlyIII</i>	<i>iceT</i>	<i>fetA</i>
<b>% Identidad</b>	22,57	31,54	23,19	44,95	26,19	33,68
<b>% Similitud</b>	41	49	41	68	46	55
<b>% Cobertura</b>	76	98	72	96	91	83
<b>E-value</b>	2,00E-24	2,99E-29	9,00E-24	7,00E-61	2,00E-32	2,00E-28
<b>ID en E.F</b>	EOT50435.1	AAO81544	EOT50435.1	AAO81463.1	EOT49914.1	AAO82595
<b>Anotación en E.F</b>	<i>EF3014</i>	<i>EF1773</i>	<i>EF1519</i>	<i>EF1685</i>	<i>EF1814</i>	<i>EF2907</i>
<b>Gen en E.F</b>	NoData	NoData	No Data	<i>hlyIII</i>	NoData	NoData

<sup>1</sup> A la lista de nuevos candidatos se sumaron los previamente reportados. 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 con los elementos de homeostasis de Fe las que se definieron bioinformáticamente como homólogos por identidad [64].



**Figura 2.** Representación del modelo actualizado de homeostasis de Fe en *E. faecalis*. El modelo está compuesto de las proteínas de homeostasis descritas en la literatura (letras pequeñas) y las proteínas relacionadas a homeostasis de Fe identificadas en este trabajo (en letras grandes).

### 6.1.3 Selección de ARN no codificantes en *E. faecalis*

Para identificar los ARNnc candidatos que podrían regular sistemas de homeostasis de Fe en *E. faecalis*, se dispuso de un total de 585 ARNnc presentes en esta bacteria. De éstos, 150 provienen desde la literatura, específicamente del trabajo realizado por Michaux y cols., que reúne todos los ARNnc descritos a la fecha en *E. faecalis* [48] y, por otro lado, 435 provienen desde el Laboratorio de Bioingeniería de la Universidad de O'Higgins, a través de la secuenciación masiva del transcriptoma de *E. faecalis* (resultados no publicados). En cuanto al tamaño de estas moléculas [65], el conjunto disponible abarca ARNnc de tamaño largo (>200 nt) y pequeño (<200 nt) pudiendo cubrir un amplio universo de ARNnc.

El mecanismo de acción de los ARNnc se basa en la complementariedad de bases, de modo que estas moléculas pueden interactuar con ARNm específicos con el fin de promover o impedir la traducción de estos últimos de manera específica. A pesar de que estudios han demostrado la existencia de ambas formas de regulación, gran parte de la literatura disponible indica que el aumento de un ARNnc en particular disminuye los niveles de su transcrito blanco [33]. Por otro lado, esta regulación mencionada anteriormente puede darse en *cis* o *trans*. En el primer caso, implica la transcripción del ARNnc en la hebra antisense al gen que está regulando, por ende, la complementariedad ARNnc-ARNm es perfecta. Por el contrario, en la regulación en *trans* el ARNnc regulador se encuentra codificado en un locus genómico distinto al ARNm blanco pudiendo interactuar con más de un ARNm.

Teniendo esto en consideración, para buscar los blancos de los ARNnc en el transcriptoma de *E. faecalis* se utilizó la herramienta IntaRNA. Este algoritmo, permite determinar una posible interacción entre ARNnc y ARNm a través de la asignación de un valor de energía libre de Gibbs (estabilidad) asociada a la hibridación entre ambas moléculas [45]. La búsqueda en la plataforma se realizó con sus parámetros por defecto. En la **Tabla 4** se muestran los resultados de los ARNnc y sus blancos relacionados a homeostasis de Fe identificados en *E. faecalis*. El criterio de selección de estos ARNnc se basó principalmente en la funcionalidad de los blancos y su papel en la homeostasis de Fe. En este contexto, se obtuvieron 4 ARNnc candidatos para la regulación de la homeostasis de Fe en *E. faecalis*, entre los cuales 3 se encuentran regulando posiblemente en *trans* la expresión del gen *feoB* (EF\_0476). Esta proteína de membrana es un transportador de Fe<sup>+2</sup> dependiente de GTP conservada en bacterias [66]. Además, se ha reportado el gen

*EF\_0476* posee una caja Fur en su zona promotora, de manera que su expresión está regulada también por el regulador maestro de homeostasis de Fe, Fur [8]. Por otro lado, también está presente el ARNnc ncRNA\_3122 cuya función, posiblemente, es regular *en cis* a *EF\_1685* (Hemolisina III).

**Tabla 4.** Resultados de los ARNnc candidatos y sus blancos en *E. faecalis*<sup>2</sup>.

<b>ID ncRNA</b>	<b>Tamaño (nt)</b>	<b>Blanco</b>	<b>Predicción del tipo de regulación</b>	<b>Función del blanco</b>	<b>Nombre Blanco</b>
ncRNA_2860	778	EF_0476	<i>trans</i>	Transporte ion ferroso	<i>feoB</i>
ncRNA_3091	668	EF_0476	<i>trans</i>	Transporte ion ferroso	<i>feoB</i>
ncRNA_6168	154	EF_0476	<i>trans</i>	Transporte ion ferroso	<i>feoB</i>
ncRNA_3122	612	EF_1685	<i>cis</i>	Hemolisina	<i>hlyIII</i>

---

<sup>2</sup> . La búsqueda se realizó mediante el software IntaRNA utilizando los parámetros por defecto. La selección de los ARNnc fue supeditada a la función del blanco a los que regulan estas moléculas.

#### 6.1.4 Conservación de los ARNnc seleccionados en el orden *Lactobacillales*

Considerando que los mecanismos regulatorios que participan en el control de la expresión de genes que codifican proteínas de homeostasis de metales (incluyendo Fe) son conservados en todo el orden *Lactobacillales* [49], el siguiente análisis buscó identificar el grado de conservación de los 4 ARNnc en los genomas de 15 especies del orden. Para ello, se realizó un BlastN utilizando los parámetros por defecto, cambiando únicamente el filtro Word Size (WS) desde 28 a un tamaño final de 6 nucleótidos. Este criterio fue ajustado en base a trabajos publicados que utilizaron la misma estrategia para el estudio de homología de ARNnc en diferentes especies [50]. La razón para disminuir el tamaño WS radica principalmente en el hecho que el ARN tiene un mayor grado de variabilidad que las proteínas dado que código genético es degenerado, por lo cual relajar este parámetro permite aumentar la probabilidad de obtener homología en el alineamiento entre ARNnc de las diferentes especies.

Entendiendo que la regulación se establece a través de la unión entre el ARNnc y el ARNm, se estudió la conservación de la secuencia nucleotídica de los genes *feoB* y *hlyIII* en las especies del orden donde está conservado el ARNnc (**Tabla 5**). Los resultados indican que ambos genes se encuentran conservados en dos especies del orden, *E. hirae* y *E. faecium*, siendo ambas cercanas filogenéticamente a *E. faecalis* [49]. Esta lógica se mantiene en el análisis de conservación en el orden *Lactobacillales* en cuanto a los ARNnc seleccionados (**Tabla 6**). Como resultado, 3 de los 4 ARNnc se conservan en al menos una especie del orden, teniendo mayor presencia en *E. hirae* y en segundo lugar a *E. faecium*. Los análisis de conservación de los blancos y sus ARNnc reguladores indican que estos probables mecanismos de regulación de sistemas de homeostasis de Fe a nivel post transcripcional están conservados en especies filogenéticamente cercanas.

Reportes anteriores indican que factores transcripcionales que controlan la homeostasis de Fe en *E. faecalis* están conservados en el orden *Lactobacillales* [8] y, tomando en cuenta que la conservación puede entenderse como un parámetro relacionado a la importancia de los elementos en procesos biológicos complejos, a la luz de los resultados obtenidos en este punto, los ARNnc ncRNA\_3122, ncRNA\_2860 y ncRNA\_3091 fueron seleccionados para ser estudiados.

**Tabla 5.** Conservación de los blancos de los ARNnc seleccionados en el orden de los *Lactobacillales*<sup>3</sup>.

ID del gen	Parámetro	<i>E. hirae</i> ATCC 9790	<i>E. faecium</i> ATCC 8459
	% de Cobertura	73	69
<b><i>EF_0474 (feoB)</i></b>	% de Identidad	73	74
	<i>E-value</i>	3,3E-114	7,1E-121
	% de Cobertura	32	74
<b><i>EF_1685 (hlyIII)</i></b>	% de Identidad	79	74
	<i>E-value</i>	9,0E-16	4,0E-44

<sup>3</sup> La búsqueda fue realizada en BLASTN con el parámetro de Word Size ajustado a 6 y considerando como conservado aquellos elementos que tienen una cobertura mayor al 50% y E-value menor a 0,01.

**Tabla 6.** Conservación de los ARNnc seleccionados en el orden de los *Lactobacillales*.<sup>4</sup>

ARNnc	Parámetro	<i>E. hirae</i> ATCC 9790	<i>E. faecium</i> ATCC 8450	<i>L. plantarum</i> WCFS1
	% de Cobertura	88	81	NC
<b>ncRNA_2860</b>	% de Identidad	75	72	NC
	<i>E-value</i>	2,0E-78	1,7E-38	NC
	% de Cobertura	NC	75	NC
<b>ncRNA_3122</b>	% de Identidad	NC	74	NC
	<i>E-value</i>	NC	4,0E-44	NC
	% de Cobertura	83	NC	72
<b>ncRNA_3091</b>	% de Identidad	77	NC	77
	<i>E-value</i>	1,1E-79	NC	3,00E-70
	% de Cobertura	NC	NC	NC
<b>ncRNA_6168</b>	% de Identidad	NC	NC	NC
	<i>E-value</i>	NC	NC	NC

<sup>4</sup> La búsqueda fue realizada con el parámetro de Word Size ajustado y considerando como conservado aquellos elementos que tienen una cobertura mayor al 50% y E-value menor a 0,01. (NC: No conservado).

## 6.2 Determinación de la abundancia transcripcional de los ARNnc *E. faecalis* silvestre

### 6.2.1 Curvas de crecimiento

Este objetivo se orienta a establecer la máxima concentración de quelante y exceso de Fe posible sin que se vea afectado el crecimiento de *E. faecalis* con el fin de estudiar la variación en la abundancia de los ARNnc en condiciones de homeostasis de Fe y no de toxicidad. Primero, se monitoreó bajo una situación de déficit del metal el crecimiento bacteriano de la cepa silvestre en el tiempo a diferentes concentraciones de 2,2'-DPD en el medio de cultivo. Se utilizaron cinco concentraciones de 2,2'-DPD (0,25, 0,5, 1, 2 y 4 mM). Como se muestra en la **Figura 3**, la curva de crecimiento para la cepa silvestre 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 2 y 4 horas), lo que se refleja en un aumento significativo y progresivo del tiempo generacional, calculado en estas condiciones en comparación a la curva basal (sin suplementación) (**Tabla 7**).

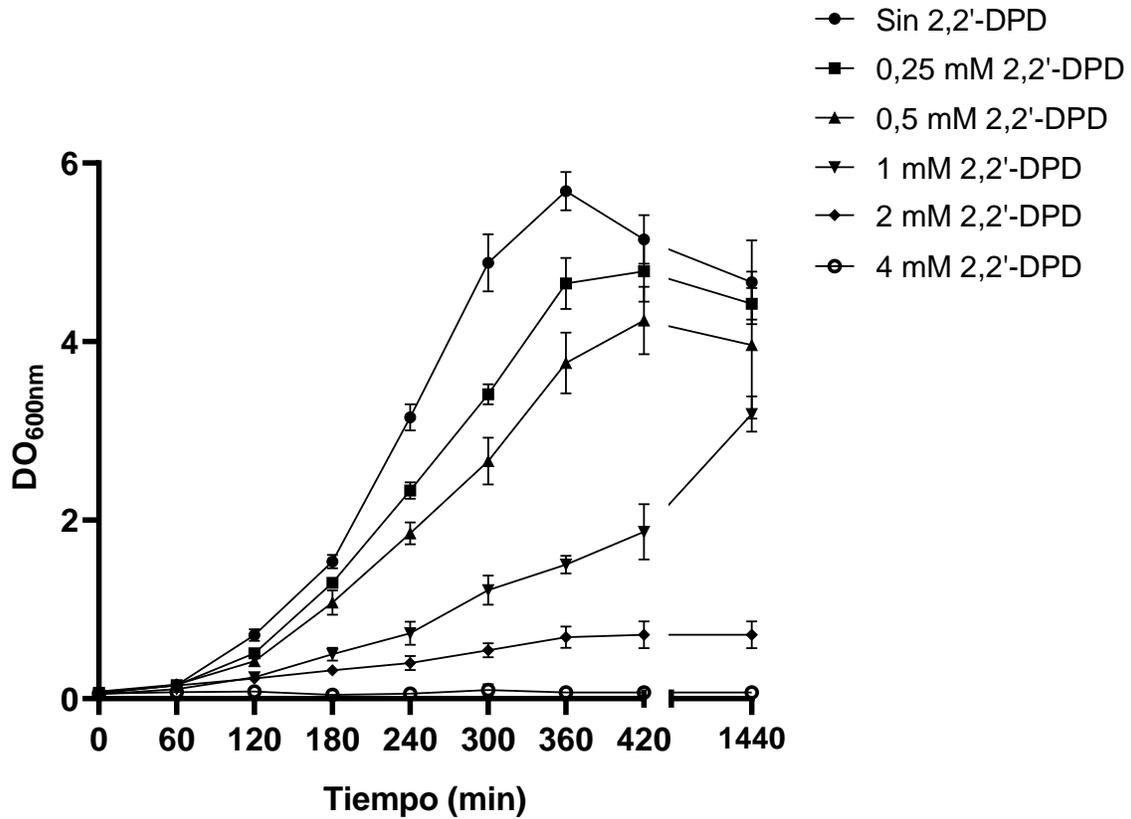
Para el déficit del metal, la **Figura 3** muestra que concentraciones superiores a 0,5 mM del quelante afectan de forma significativa el crecimiento de la bacteria. Para confirmar esta observación, se calcularon los tiempos generacionales entre las 2 y 4 h de crecimiento para todas las condiciones de estudio (**Tabla 7**). Los tiempos generacionales obtenidos indican que concentraciones por sobre 0,5 mM de 2,2'-DPD reducen de forma significativa el crecimiento bacteriano, lo que nos permitió establecer a la concentración de 0,5 mM de DPD como la cantidad de quelante a utilizar en los ensayos posteriores.

En relación con el exceso de Fe, la **Figura 4** presenta los resultados de curvas de crecimiento de la bacteria expuesta a concentraciones crecientes de FeCl<sub>3</sub>. En este caso, los resultados no mostraron una disminución del crecimiento hasta la condición de 4 mM de FeCl<sub>3</sub>. Bajo el mismo criterio anterior, se calcularon los tiempos generacionales para cada curva (**Tabla 8**). En este caso, los tiempos de duplicación son similares entre sí y ninguna de las concentraciones evaluadas produjo un cambio significativo en este parámetro.

Se ha reportado que la cantidad de Fe para el crecimiento bacteriano óptimo es de 0,3 a 1,8  $\mu$ M [67]. La adición de una concentración de 4 mM para crecimiento bacteriano es

más de mil veces lo necesario para la bacteria, siendo capaz la bacteria de seguir creciendo normalmente en un ensayo de curva de crecimiento. Sin embargo, existen inconvenientes operacionales asociados a la utilización de concentraciones superiores a 0,5 mM de  $\text{FeCl}_3$ , como la aparición de un precipitado en el medio de cultivo que pudiese interferir en los ensayos posteriores. Por tal razón, se seleccionó esta concentración de 0,5 mM de  $\text{FeCl}_3$  para los ensayos posteriores, la cual no genera cambios en el crecimiento bacteriano en relación con el medio control.

En resumen, los resultados de las curvas de crecimiento de *E. faecalis* indican que, a pesar de la adición sustantiva de un exceso de Fe o un quelante de éste, esta bacteria es capaz de manejar ambos escenarios manteniendo la homeostasis del metal y sin ver afectado el crecimiento bacteriano, al menos en las condiciones estudiadas.

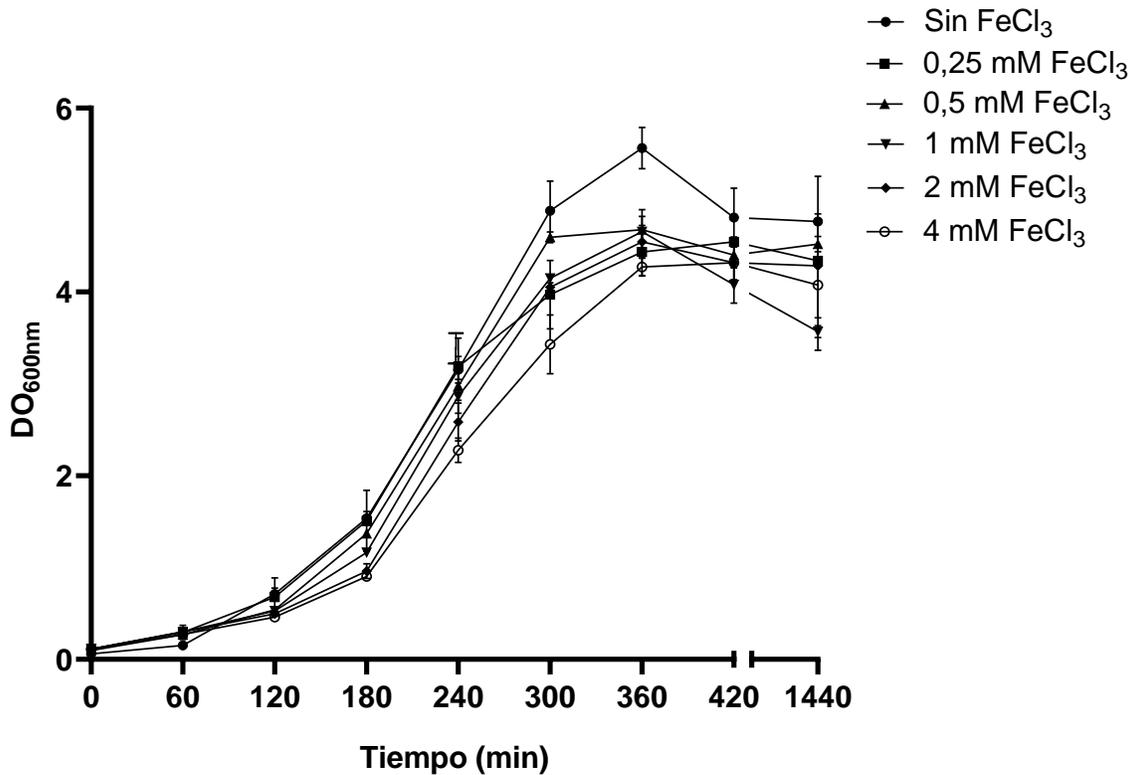


**Figura 3.** Efecto de la exposición a 2,2'-DPD (condición déficit) sobre el crecimiento de *E. faecalis* cepa silvestre. El gráfico representa las curvas de crecimiento de *E. faecalis* expuesta a diferentes concentraciones de 2,2'-DPD (tratamientos con 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM de 2,2'-DPD). Cada punto representa el valor promedio obtenido por la medición de la longitud de onda a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) de tres réplicas biológicas, las barras de error corresponden a la desviación estándar.

**Tabla 7.** Tiempo generacional para la cepa silvestre *E. faecalis* expuestas a diferentes concentraciones de 2,2'-DPD<sup>5</sup>.

2,2'-DPD (mM)	Tiempo generacional (min)	
	OG1RF	Significancia
Sin suplementación	42,4 ± 0,8	-
0,25	54,7 ± 1,6	ss
0,5	56,0 ± 2,1	ss
1	86,8 ± 1,5	*
2	157,1 ± 45,3	**
4	539 ± 80,9	***

<sup>5</sup> Los datos para los cálculos de los tiempos generacionales corresponden a los tiempos entre 2 y 4 h de cada curva de crecimiento. El grado de significancia se determinó con la prueba de significancia ANOVA y post prueba de Dunnet, por ende, los tiempos generacionales son significativos con respecto solo al control. Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas con su respectiva desviación estándar. ss: sin significancia. Asteriscos: grado de significancia (\* = p<0.05, \*\* = p < 0.01 y \*\*\* = p < 0.001).



**Figura 4.** Efecto de la exposición a FeCl<sub>3</sub> (exceso) sobre el crecimiento de la *E. faecalis* silvestre. El gráfico representa la curva de crecimiento de la cepa OG1RF expuesta a diferentes concentraciones de Fe (tratamientos con 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM de FeCl<sub>3</sub>). La condición basal corresponde a *E. faecalis* crecida en cultivo sin tratamiento. Cada punto representa el valor promedio obtenido por absorbancia (DO<sub>600nm</sub>) de tres réplicas biológicas, las barras de error corresponden a la desviación estándar.

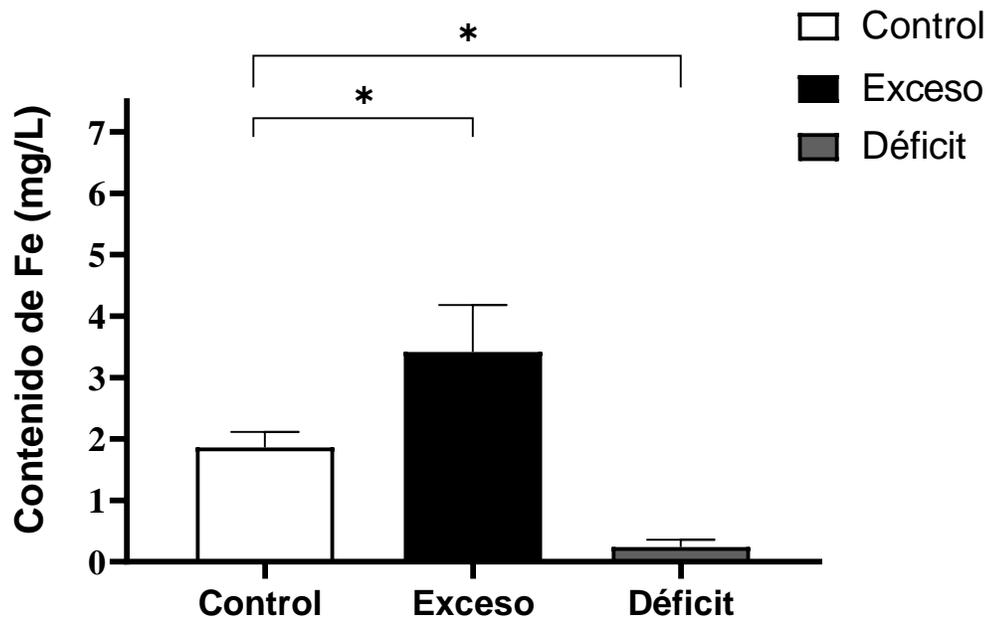
**Tabla 8.** Tiempo generacional para las cepas silvestre *E. faecalis* expuestas a diferentes concentraciones de FeCl<sub>3</sub><sup>6</sup>.

FeCl <sub>3</sub> (mM)	Tiempo generacional (min)	
	OG1RF	Significancia
Sin FeCl <sub>3</sub>	56,1 ± 4,8	-
0,25	53,4 ± 7,2	ss
0,5	48,8 ± 1,1	ss
1	49,2 ± 2,2	*
2	50,5 ± 1,8	**
4	52,0 ± 2,0	***

<sup>6</sup> Los datos para los cálculos de los tiempos generacionales corresponden a los tiempos 2 y 4 h de cada curva de crecimiento de la **Figura 4**. El grado de significancia se determinó con la prueba de significancia ANOVA y post prueba de Dunnet, por ende, los tiempos generacionales son significativos con respecto solo al control. Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas con su respectiva desviación estándar. ss: sin significancia.

### 6.2.2 Concentración interna de hierro en cepa *E. faecalis* silvestre

Con el fin de verificar si la exposición a las condiciones de exceso y déficit con los parámetros definidos en el punto anterior se traducen en un cambio en el contenido de Fe intracelular, se cuantificó el Fe intracelular en *E. faecalis* en las condiciones anteriormente mencionadas. La **Figura 5** muestra la concentración interna del hierro cuantificada mediante la técnica de espectrofotometría de difracción total por rayos X (TXRF). Como se puede observar, en la condición exceso (0,5 mM de FeCl<sub>3</sub>) *E. faecalis* contiene al menos 3 veces más Fe intracelular que su contraparte control (sin suplementación). Por otro lado, el déficit de Fe (0,5 mM de 2,2'-DPD) contiene menos de la mitad de Fe que la condición basal. Estos datos se corresponden a datos anteriormente publicados [8], que sumados a los ensayos de la curva de crecimiento indican que *E. faecalis* es capaz de manejar escenarios de exceso y déficit de Fe sin ver afectado su crecimiento bacteriano. La influencia de los niveles de Fe sobre la abundancia de los ARNnc seleccionados se abordará en los siguientes puntos.



**Figura 5.** Contenido intracelular de Fe frente a diferentes disponibilidades en *E. faecalis*. La medición fue realizada mediante TXRF para cepas crecidas en condición de exceso (0,5 mM de  $\text{FeCl}_3$ ), déficit (0,5 mM de 2,2'-DPD) y condición basal (sin suplementación) a las 3 h de crecimiento. La normalización se realizó equiparando la misma cantidad de bacterias ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ ). En el gráfico se presentan los valores promedios de 3 réplicas biológicas. El grado de significancia se determinó con la prueba de significancia ANOVA y post prueba de Dunnet, analizando la significancia del contenido intracelular de Fe con respecto al basal. Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas con su respectiva desviación estándar. \*: grado de significancia ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.3 Extracción de ARN en *E. faecalis* cepa silvestre

El primer paso para llevar a cabo este objetivo fue la extracción de ARN en *E. faecalis* expuesta a las diferentes condiciones definidas en la **sección 6.2.1** (0,5 mM de 2,2'-DPD y 0,5 mM de FeCl<sub>3</sub>). La extracción se realizó 3 h posterior al tratamiento y en dos pasos; primero un lavado de las células y luego la extracción de ARN con el kit comercial Maccura; y posteriormente, tratamiento con DNAsas acoplado a extracción en columna. La **Tabla 9** muestra la concentración y la pureza del ARN posterior a la extracción. En ella se muestra que luego de la extracción, fue posible obtener una cantidad considerable de ARN, siendo lo suficiente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para realizar todos los ensayos posteriores. En cuanto a su pureza, el valor de la proporción A260/A280 (contaminación con compuestos aromáticos y proteínas) está por sobre 1,7 en todas las muestras, de manera que el ARN posee una pureza adecuada para los posteriores ensayos. Del mismo modo, la proporción A260/A230 indica la contaminación con fenoles y compuestos orgánicos, donde en todas las muestras existe un valor por sobre 1,5 en este apartado, lo que es indicativo de una pureza aceptable mientras que valores superiores a 2 indican una pureza óptima [68]. En síntesis, luego de la extracción y posterior tratamiento con DNAsas se obtiene una alta cantidad de ARN puro que puede ser utilizado para la retro transcripción.

**Tabla 9.** Resultados de la extracción de ARN total en *E. faecalis* silvestre.<sup>7</sup>

<b>Condición</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
2,2'-DPD	677,0 ± 10,7	2,21	2,48
FeCl <sub>3</sub>	1232,1 ± 22,6	1,73	1,62
Sin tratamiento	439,5 ± 19,2	2,21	2,42

---

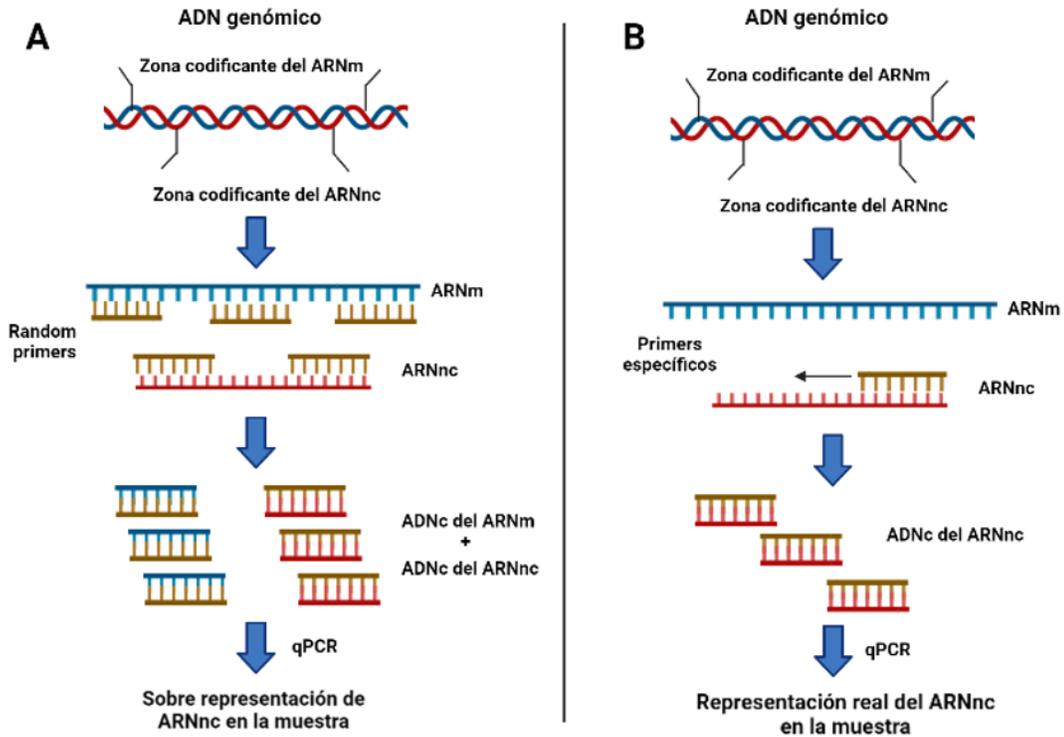
<sup>7</sup> Los resultados se expresan como el promedio de tres réplicas técnicas con su desviación estándar

#### 6.2.4 Síntesis de ADNc de hebra simple de los ARNnc en *E. faecalis* silvestre

La medición de la abundancia de los ARNnc tiene un alto grado de complejidad dado el contexto genómico en el que se encuentran [69]. En la **Figura 6A**, se muestra el protocolo clásico medición de transcritos mediante RT-qPCR, el cual involucra una fase de extracción de ARN total, el uso de partidores al azar (*random primers*) para generar ADNc (ADN complementario a partir del ARN total) y posteriormente, la cuantificación mediante qPCR. El uso de partidores al azar para la generación de ADNc presenta un problema técnico, dado que todas las moléculas de ARNnc en estudio presentan complementariedad en *cis* con un transcrito codificante. El proceso de transcripción reversa convencional generaría un ADNc de hebra doble mayormente representado a nivel de abundancia por el ARNm [70].

A fin de solucionar este problema se revisó extensamente la literatura y se encontraron artículos relacionados al mismo inconveniente con posibles soluciones [52]. Al respecto, finalmente se optó por la estrategia de utilizar por cada ARNnc, un partidador específico para cada retrotranscripción (**Figura 6B**). El uso de estos partidores específicos otorga especificidad a la reacción, resultando en la obtención de ADNc de hebra simple representativa exclusivamente de la abundancia del ARNnc.

En cuanto a resultados (**Tabla 10**), se puede observar que en todos los casos existe una alta concentración del ADNc (por sobre los 1000 ng/ $\mu$ L) indicando que la estrategia tomada para la retro transcripción de los ARNnc fue exitosa tomando en cuenta la novedad de este enfoque. En cuanto a su pureza, el valor de la proporción A260/A280 se encuentran por sobre 1,7 en la mayoría de los casos, de manera que el ARN posee una pureza casi óptima. Del mismo modo, en la mayoría de las muestras existe un valor por sobre 2 en cuanto a la proporción 260/230, indicativo de una pureza óptima. Estos valores nos indican una alta eficiencia y fiabilidad del enfoque utilizado.



**Figura 6.** Comparación de dos diferentes metodologías para la preparación de muestras de ADNc para ensayos de qPCR. En **A** se muestra el protocolo clásico para la síntesis de ADNc de hebra doble mediante la utilización de partidores al azar (*random primers*). En **B** se presenta el diseño propuesto en esta tesis para la síntesis de ADNc de hebra simple a través de partidores específicos para la retrotranscripción exclusiva del ARNnc.

**Tabla 10.** Resultados de la concentración y pureza del ADNc de hebra simple de los ARNnc seleccionados en *E. faecalis* silvestre<sup>8</sup>.

ID ARNnc	Concentración (ng/μL)	A260/280	A260/230
<b>FeCl<sub>3</sub></b>			
ncRNA_2860	1317,3 ± 14,1	1,72	2,08
ncRNA_3122	1384,2 ± 14,9	1,71	2,06
ncRNA_3091	1226,8 ± 19,0	1,72	2,09
16S	1415,8 ± 17,9	1,73	2,09
<b>2,2'- DPD</b>			
ncRNA_2860	1313,0 ± 16,9	1,72	2,09
ncRNA_3122	1350,5 ± 9,8	1,72	2,10
ncRNA_3091	1363,7 ± 21,5	1,71	2,08
16S	1360,1 ± 14,8	1,74	2,07
<b>Basal</b>			
ncRNA_2860	1358,6 ± 11,5	1,73	2,08
ncRNA_3122	1828,0 ± 16,9	1,66	1,89
ncRNA_3091	1114,6 ± 20,1	1,72	2,06
16S	1033,3 ± 14,7	1,64	1,93

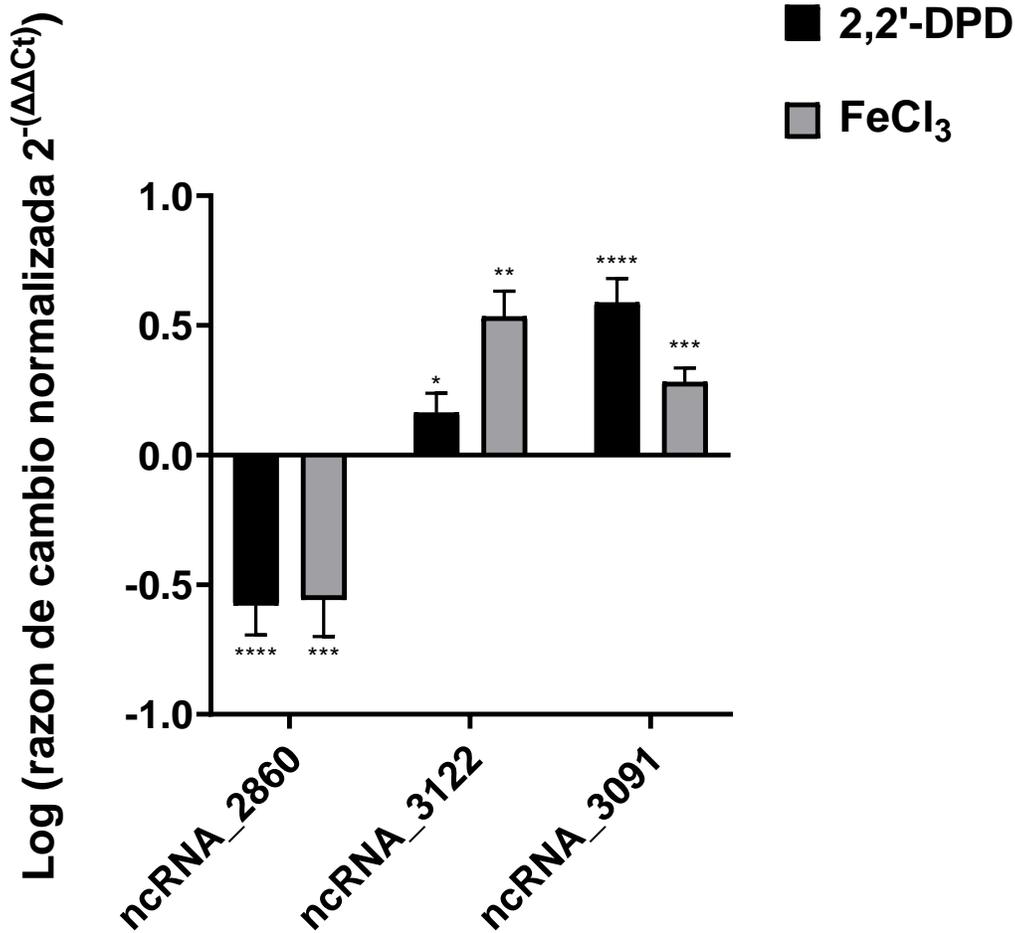
<sup>8</sup> Los valores corresponden al promedio de tres réplicas técnicas con su correspondiente desviación estándar.

### 6.2.5 Cuantificación por qPCR de la abundancia de los transcritos de ARNnc en cultivos de *E. faecalis* silvestre

Con el objetivo de verificar si los ARNnc seleccionados (ncRNA\_3122, ncRNA\_2860 y ncRNA\_3091) son capaces de cambiar su abundancia en respuesta a las distintas disponibilidades de Fe, se llevó a cabo una cuantificación específica de cada candidato mediante qPCR. Este ensayo se realizó con las muestras de ADNc obtenidas a partir de bacterias crecidas bajo condición de condición exceso (0,5 mM de FeCl<sub>3</sub>), déficit (0,5 mM de 2,2'-DPD) y condición basal (sin tratamiento de Fe). La **Figura 7** presenta los resultados de qPCR obtenidos en un total de tres mediciones para cada una de las condiciones en estudio. A fin de normalizar los resultados obtenidos se utilizó un gen que no varía su expresión independiente del tratamiento (*housekeeping*), en este caso se utilizó el 16S ARN [52].

Como se observa en la **Figura 7**, ncRNA\_2860 que posiblemente regula al gen *feoB*, disminuye en ambas condiciones con respecto a *E. faecalis* sin tratamiento (basal). Por el contrario, ncRNA\_3091, que posiblemente regula al mismo gen, aumenta su abundancia tanto en condición de déficit como exceso de Fe. Del mismo modo, el ARNnc ncRNA\_3122, que probablemente regula al ARNm del gen *hlyIII* aumenta en ambos escenarios. Estos resultados muestran que todos los ARNnc seleccionados cambian su abundancia con respecto a la condición basal en el déficit y exceso de Fe.

A nivel general, los cambios en la abundancia de elementos asociados a homeostasis de Fe son necesariamente mediados por un activador o un represor transcripcional sensible al estímulo, en este caso, el Fe. En este sentido, uno de los reguladores mejor caracterizado y conservado en las bacterias es el regulador Fur cuya función principalmente es reprimir la expresión de mecanismos que posibilitan la entrada de Fe a la bacteria bajo un escenario de exceso intracelular del metal. Este factor de transcripción está presente en *E. faecalis*, y es conservado en el orden *Lactobacillales* [8]. El objetivo final de este trabajo fue estudiar si la presencia de Fur impacta sobre la abundancia de los ARNnc en estudio en condición basal.



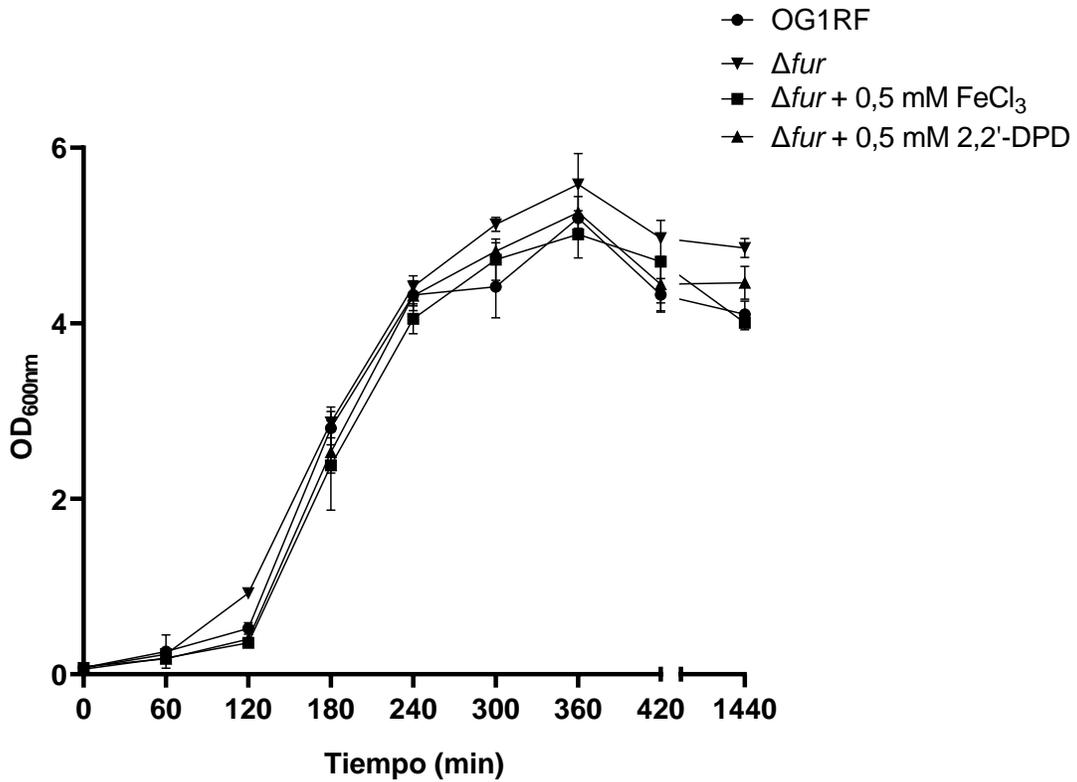
**Figura 7.** Abundancia relativa de ARNnc cuantificados mediante qPCR en *E. faecalis* silvestre. El gráfico muestra el logaritmo de la razón de abundancia relativa al normalizador 16S entre las muestras tratamiento; exceso dado por 0,5 mM de FeCl<sub>3</sub>; déficit dado por 0,5 mM de 2,2'-DPD; finalmente, la condición basal o sin suplementación. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y se expresan como logaritmo de la abundancia transcripcional normalizada por la condición basal. El asterisco da cuenta de diferencias significativas de abundancia entre la muestra control y tratamiento a través de la prueba paramétrica *t de Student* (Grado de significancia. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  y \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

### 6.3 Determinación de la abundancia transcripcional de los ARNnc seleccionados en la cepa $\Delta fur$

#### 6.3.1 Curvas de crecimiento

Dado que esta cepa ya fue caracterizada y utilizada en trabajos científicos anteriores [8], el objetivo de este punto fue verificar el crecimiento de *E. faecalis* OG1RF  $\Delta fur$  frente a cambios en la disponibilidad de Fe. Para ello, se monitoreó el crecimiento bacteriano de la cepa  $\Delta fur$  en el tiempo en las condiciones previamente definidas (0,5 mM FeCl<sub>3</sub>, 0,5 mM de 2,2'-DPD y sin suplementación). Como comparación, se utilizó la cepa silvestre de *E. faecalis* creciendo en condiciones basales. Como se muestra en la **Figura 8**, la curva de crecimiento para la cepa  $\Delta fur$  presenta una forma sigmoidea típica, en la cual es posible distinguir claramente todas las etapas del crecimiento bacteriano sin ninguna diferencia significativa entre la cepa silvestre y la cepa mutante, ni producto de los cambios en las condiciones de tratamiento con Fe. Siguiendo la metodología del objetivo 2, se analizó el crecimiento bacteriano en términos de los tiempos generacionales (**Tabla 11**). Los resultados reflejan que la cepa  $\Delta fur$  en todas las condiciones de exposición utilizadas, no presenta diferencias significativas tanto en las curvas de crecimiento, como en los tiempos generacionales en todos los casos en estudio, corroborando los datos anteriormente publicados.

El hecho que *E. faecalis*  $\Delta fur$  tenga un crecimiento bacteriano similar a la condición silvestre implica que la delección no influye en el crecimiento de *E. faecalis* bajo las condiciones experimentales utilizadas. Por otro lado, la cepa  $\Delta fur$  en condición de déficit, no tiene diferencia con su contraparte silvestre. Sin embargo, considerando que la ausencia del represor genera un fenotipo en el cual los mecanismos de captación de Fe están sobreexpresados, es posible suponer que el contenido intracelular del metal podría estar aumentado en la mutante. En este sentido, se hace importante cuantificar el contenido intracelular de Fe en las condiciones ensayadas.



**Figura 8.** Efecto de la exposición a 2,2'-DPD (déficit) y  $\text{FeCl}_3$  (exceso) sobre el crecimiento de la *E. faecalis* cepa  $\Delta fur$ . El gráfico representa la curva de crecimiento de la cepa  $\Delta fur$  y la cepa silvestre (OG1RF) en su estado basal, la primera expuesta además a 0,5 mM 2,2'-DPD y  $\text{FeCl}_3$ . Cada punto representa el valor promedio obtenido por absorbancia ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de tres réplicas biológicas, las barras de error corresponden a la desviación estándar.

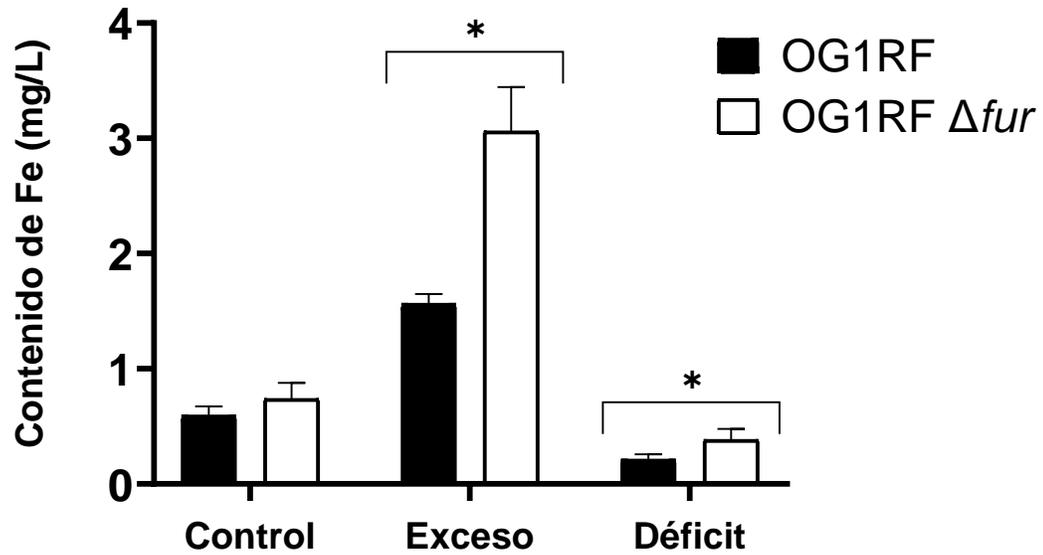
**Tabla 11.** Tiempo generacional para las cepas silvestre y  $\Delta fur$  de *E. faecalis* crecidas en condición déficit y exceso de Fe<sup>9</sup>.

Cepa	Tiempo generacional (min)	
	OG1RF	Significancia
OG1RF (Basal)	39,4 ± 2,8	-
$\Delta fur$ + 0,5 mM Fe	34,3 ± 3,2	ss
$\Delta fur$ + 0,5 mM 2,2'-DPD	36,0 ± 1,1	ss
$\Delta fur$ (Basal)	43,2 ± 0,7	ss

<sup>9</sup> Los datos para los cálculos de los tiempos generacionales corresponden a los tiempos 2 y 4 h de cada curva de crecimiento de la **Figura 8**. El grado de significancia se determinó con la prueba de significancia ANOVA y post prueba de Dunnet, por ende, los tiempos generacionales son significativos con respecto solo a la cepa OG1RF silvestre. Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas con su respectiva desviación estándar. ss: sin significancia.

### 6.3.2 Concentración interna de metales en cepa $\Delta fur$

Con el fin de verificar si la exposición de las condiciones de exceso o déficit de Fe son capaces de afectar el contenido de metal intracelular de la cepa  $\Delta fur$  y de esta manera, tener un conocimiento acabado sobre el fenotipo en esta cepa, el cual es fundamental para la interpretación de los próximos experimentos de qPCR, se cuantificó la cantidad de Fe siguiendo la metodología del objetivo anterior. Como se observa en la **Figura 9**, en la cepa mutante, tanto en la condición exceso y déficit existe una mayor acumulación de Fe intracelular con respecto al contenido de Fe de *E. faecalis* cepa silvestre en las mismas condiciones. Esto último posiblemente debido al aumento la transcripción de elementos asociados al ingreso de Fe, dada la ausencia de su represor. Este efecto se ve especialmente acentuado en la condición exceso, donde la cepa  $\Delta fur$  es capaz de acumular casi el doble de Fe que la cepa silvestre. Teniendo en cuenta este fenotipo, el siguiente paso fue verificar si el alza en los niveles de Fe en *E. faecalis*, sumado a la ausencia del regulador maestro de la homeostasis de Fe, son capaces de cambiar los niveles en la abundancia de los ARNnc seleccionados en este estudio.



**Figura 9.** Contenido intracelular de Fe en diferentes disponibilidades del metal en *E. faecalis*  $\Delta fur$ . La medición fue realizada mediante TXRF en condición de exceso (0,5 mM de  $FeCl_3$ ), déficit (0,5 mM de 2,2'-DPD) y condición control (sin suplementación) a las 3 h de crecimiento. La normalización se realizó midiendo la absorbancia a 600 nm equiparando la misma cantidad de bacterias ( $DO_{600nm} = 1$ ). El grado de significancia se determinó con la prueba de significancia ANOVA y post prueba de Dunnet. Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas con su respectiva desviación estándar. Asteriscos: \* grado de significancia ( $p < 0,05$ ). ns= no significativo.

### 6.3.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc en cepa *E. faecalis* $\Delta fur$

En un trabajo anteriormente publicado en *E. faecalis*  $\Delta fur$  [8], se constató la regulación de este factor de transcripción sobre los mecanismos de homeostasis de Fe (operones *feo*, *ycl* y *fhu*). Para esto, se comparó la abundancia entre la cepa silvestre y  $\Delta fur$  para los ARNm que codifican los mecanismos de ingreso del metal. Se observó que, creciendo en una condición basal (sin exceso o déficit de Fe), la ausencia del regulador impacta significativamente sobre la expresión de genes relacionados a estos mecanismos, llegando a aumentar hasta 5 veces la abundancia de sus ARNm en la cepa mutante. Adicionalmente, se verificó que dentro de los promotores de estos genes existe un motivo de ADN conservado de unión a Fur, lo cual sugiere fuertemente una regulación directa de este regulador transcripcional sobre los genes de homeostasis de Fe en *E. faecalis*. Adicionalmente, en el mismo trabajo, a través de un análisis transcriptómico (ARNseq) realizado bajo las mismas condiciones de crecimiento, se identificó un total de 30 otros genes que también cambiaron su abundancia transcripcional en la cepa  $\Delta fur$ ; no obstante, ninguno de ellos presentó el motivo clásico de unión a Fur en su región promotora. Si bien estos genes son afectados por la ausencia del regulador, probablemente responden a los cambios en el contenido intracelular del metal y no a la acción directa de Fur, por lo cual se clasificaron solo como genes de respuesta indirecta.

Teniendo estos antecedentes en consideración, se verificó si existen cambios en la abundancia de los ARNnc seleccionados producto de la ausencia del regulador Fur. Primero, se realizó una extracción de ARN en la condición basal (sin suplementación) en la cepa *E. faecalis*  $\Delta fur$ . Al igual que en la extracción del objetivo anterior, se realizó en dos pasos; lavado del medio y extracción automática (Kit Maccura); luego, extracción en columna acoplada a tratamiento con DNAsas. En cuanto a resultados, la **Tabla 12** ilustra la pureza y concentración del ARN extraído en las tres condiciones. Similar a la extracción de ARN en *E. faecalis* silvestre, se obtuvo una alta cantidad y pureza del ARN extraído.

Posteriormente se sintetizó a partir de estas muestras ADNc mediante transcripción reversa utilizando la misma estrategia aplicada en la *E. faecalis* silvestre. En la **Tabla 12** se presenta los resultados de pureza y concentración de ADNc de los ARNnc seleccionados. Se puede observar que en todos los casos existe una alta concentración del ADNc alcanzando en promedio casi 1  $\mu\text{g/mL}$  lo cual nos indica la eficiencia de esta estrategia. En cuanto a su pureza, el valor de la proporción A260/A280 se encuentran por sobre 1,7 de

manera que el ARN posee una pureza casi óptima. En cuanto a la proporción A260/A230, ésta se mantiene por sobre 2 en el ADNc en condición basal, lo cual es indicativo de una pureza aceptable. Estos valores nos indican una alta eficiencia y fiabilidad de la estrategia utilizada, tanto para los ARNnc en estudio y el normalizador.

**Tabla 12.** Resultados de la extracción de ARN y síntesis de ADNc de los ARNnc seleccionados en cepa *E. faecalis*  $\Delta fur^{10}$ .

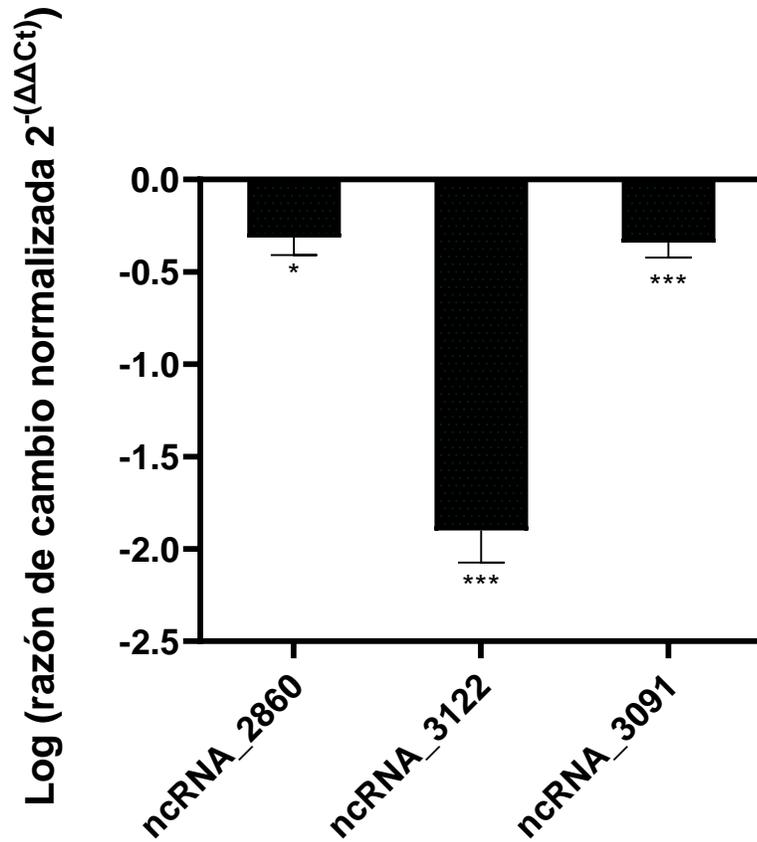
Condición/Parámetro	Concentración (ng/ $\mu$ l)	A260/A280	A260/A230
<b>Extracción de ARN</b>			
Sin tratamiento	847,5 $\pm$ 11.3	2,31	2,22
<b>Síntesis de ADNc</b>			
ncRNA_2860	1237,1 $\pm$ 15.6	1,71	2,04
ncRNA_3122	1252,2 $\pm$ 9.8	1,66	2,03
ncRNA_3091	1298,9 $\pm$ 12.9	1,71	2,06
16S	950,1 $\pm$ 11.7	1,72	2,07

<sup>10</sup> La extracción y posterior síntesis de ADNc se realizó en condiciones basales (sin estimulación). Los resultados se expresan como el promedio de tres réplicas técnicas con su desviación estándar.

#### 6.3.4 Cuantificación por qPCR de la abundancia de los transcritos de ARNnc en cultivos de *E. faecalis* $\Delta fur$

En el objetivo anterior se abordó la posibilidad que cambios en la disponibilidad de Fe son capaces de afectar la abundancia de los ARNnc seleccionados. Como resultado, efectivamente existe un cambio en la abundancia de estas moléculas producto de escenarios de déficit y exceso de Fe, tal como se observa con los transcritos que codifican componentes de homeostasis, abriendo la posibilidad que el regulador maestro de la homeostasis de Fe, el factor de transcripción Fur, pueda inducir cambios de abundancia de forma directa o indirecta sobre los ARNnc en estudio. Para ello, en la cepa de *E. faecalis*  $\Delta fur$  se cuantificó la abundancia de los transcritos para los ARNnc seleccionados en muestras de ADNc obtenidas independientemente a partir de bacterias crecidas en la condición basal (sin suplementación). La **Figura 10** presenta los resultados de qPCR obtenidos en un total de tres mediciones entre la cepa silvestre y mutante  $\Delta fur$  en condición basal. Como se ilustra en el gráfico, al analizar los tres ARNnc seleccionados, todos cambian su abundancia frente a la cepa silvestre. Tanto en el ncRNA\_2860 como el ncRNA\_3122 disminuyen su abundancia de manera similar, siendo el ncRNA\_3091 el cual muestra la mayor disminución en ausencia del regulador Fur.

En resumen, los ARNnc seleccionados cambiaron su abundancia en *E. faecalis*  $\Delta fur$  con respecto a la *E. faecalis* silvestre en condición basal. Dado que la cepa mutante acumula más Fe, con esta información no es posible distinguir a este nivel si el cambio se atribuye a la pérdida de la regulación o a un efecto secundario inducido por la acumulación de Fe. Para abordar esta pregunta, se realizó un alineamiento de las secuencias promotoras del operón *feo* en conjunto con los promotores de los 3 ARNnc en estudio. Como se observa en la **Figura 11**, ninguno de los promotores de los ARNnc presenta el motivo característico de unión a Fur, lo cual supone que la acción de este regulador podría ser indirecta sobre el cambio de abundancia de los ARNnc.



**Figura 10.** Comparación de la abundancia de los ARNnc entre la cepa mutante  $\Delta fur$  y la cepa silvestre en condición basal. El gráfico muestra el logaritmo de la razón de abundancia relativa al normalizador 16S entre las muestras sin tratamiento. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y se expresan como logaritmo de la abundancia transcripcional normalizada. El asterisco da cuenta de diferencias significativas de abundancia entre la muestra control y tratamiento a través de la prueba paramétrica *t de student* (Significancia: \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

```

          10          20          30          40          50
P_EF_0476   .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
----- AACATTTAGT GA-AAAAACA CTAAATGTTG TGTTGACATT
P_ncRNA_2860 TCGCAACAAA ATTGTCTCAT TGTAGTGGTA AAGAAAGATG GCTGAATCTT
P_ncRNA_3122 -----ATC AACCATAATT GATAAAGGCA TCATATGGAT ATTTAATTCA
P_ncRNA_3091 -ATAATTACT CGTTTTACGC CCAAAAAGTG AAAATCTAGC TGTTAAGTAA

          60          70          80          90          100
P_EF_0476   .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
TGAGTTAGGC ACAAGAAGAA AAAATAAGCG GA-TTTGTTA TTGAATGAGT
P_ncRNA_2860 TGAATGGTAG TTGTCAAAAA AAGGGCGACA A--CTTATAA TGAATCATAAC
P_ncRNA_3122 TCTCTAAGAC TTTTTTCCAT CGTACATGAA GAATCCGTTA CGATTTTAAC
P_ncRNA_3091 TTATTGGGGC TTGTTTCCCT AGGGCCGAAA AAACTTTTTC CT-TTTAAA

          110         120         130         140         150
P_EF_0476   .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GGGATTTTAC AGTAGCTAGT AACATA-AAA AACAAGTGCT GACTTTTTTTT
P_ncRNA_2860 AG---TTTAA ATAAAAGGAG TACGTAGATG AATCGATGGT TAAAAATTTT
P_ncRNA_3122 G---TTTGTC ATAAATTTAT CACTCT-TTC TTTAAAAGGA ACCTGTTTTTC
P_ncRNA_3091 GT--CCAGAA AAAGACCTAC ACTAGAGATA GACAAACGTT GGAGGGATTT

          160         170         180         190         200
P_EF_0476   .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CAAAAATAGT AACCTGAAAA AAGTGCTCTCT ATA-TAGAAG GAAAATAGAA
P_ncRNA_2860 G-ATTGCGCT TAT-TGTAGT AATTGCAATT GGT--TTAAT TGCGGCAGGC
P_ncRNA_3122 ATGGTAGAAT ACCATTA AAC GGTTAATTAT CTAGTTATAG TATAACAGAC
P_ncRNA_3091 A-AATGGATT TACACTTAAC GAATAAATTA GCA-----TT AATTACTGGT

          210         220         230         240         250
P_EF_0476   .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GAAAACAGGA GATACATCCA G--AAAT-TC ATTGACTT-- -TCCGTGTAA
P_ncRNA_2860 TTATATTTTT ATAATTATGC AGTAGTT-CC AGGAAAGAAA GACTTTATAA
P_ncRNA_3122 ACTGCCGAAT TTTTCATCAA ATTA AAAA-TA AAGGAAGTGA ATTTATTGGA
P_ncRNA_3091 TCAACCAAAG GAATTGGCAA AGCAATTGCG ATTGAAATG- --GCTCGTGA

          260         270         280         290         300
P_EF_0476   .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GCAAGCGTAT TCTTTTAATT GAGAAC-GAT TCTCATTTTC GTT TGAAACT
P_ncRNA_2860 ATGAGAATAC CCCAGGGTCA AAAGTGGTCC AGACACCTGA AGGCGCGTGG
P_ncRNA_3122 AAAAACGCAT TTCTCAAAAA AATACCTAAT CGTGAACGAA GTCTTGAATG
P_ncRNA_3091 AGGGACCGAT GTCATTATCA ATGGGCGCAA TGAAGCCGAA GTA ACTAAAG

          310         320
P_EF_0476   .....|.....| .....|.....| .
TTTTCACATG GAGGAAAGTA A
P_ncRNA_2860 T--TTAAAGA TG----- -
P_ncRNA_3122 CAGTTACACA TG----- -
P_ncRNA_3091 TTGTTAAAGA AAT----- -

```

**Figura 11.** Alineamiento de las regiones promotoras de los genes que codifican los ARNnc seleccionados. La figura muestra el alineamiento de los 3 promotores (300 pb) de los ARNnc seleccionados y del promotor del operón *feo*. En rojo se muestra, a modo de referencia la secuencia de consenso de unión a Fur al ADN la cual solo se encuentra en el operón *feo* (posición 294-306).

## 7 DISCUSIÓN

Dada la esencialidad del Fe para el correcto funcionamiento de diversos procesos metabólicos y, por el contrario, su efecto tóxico producto de un aumento en su concentración, los sistemas vivos han desarrollado diversos mecanismos encargados del control intracelular de la cantidad de este metal, proceso conocido como homeostasis de Fe.

Con el propósito de entender el funcionamiento de estos mecanismos de homeostasis, es necesario identificar y caracterizar los componentes involucrados en este proceso. En este contexto, la presente tesis tuvo por objetivo caracterizar posibles ARNnc que podrían participar en la homeostasis de Fe en *E. faecalis*, planteándose una hipótesis de trabajo que exploró la conexión entre el contenido de Fe intracelular, la expresión de estos ARNnc y la regulación que Fur ejerce sobre estas moléculas. Tomando lo anterior 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.

### 7.1 Nuevos componentes de homeostasis de Fe en *E. faecalis*

Con el objetivo de ampliar el conjunto conocido de mecanismos de homeostasis de Fe en *E. faecalis* y maximizar la probabilidad de encontrar ARNnc que pudieran regularlos, se replicó una estrategia *in silico* en la cual, mediante el uso del algoritmo bioinformático BlastP, se rastreó la presencia de elementos de homeostasis de Fe caracterizados en las bacterias desde el año 2012 en el proteoma de *E. faecalis*. El uso de esta estrategia para la búsqueda de elementos proteicos en *E. faecalis* ya ha sido utilizada con éxito anteriormente en esta bacteria [4]. Luego de la búsqueda, 6 fueron los candidatos identificados en el proteoma de *E. faecalis*, generando un aumento del 36% en el conjunto disponible de posibles mecanismos de homeostasis de Fe en esta bacteria con respecto al modelo anterior (**Figura 1** y **Figura 2**). Estos elementos corresponden a proteínas asociadas a sideróforos como DhbA (síntesis de sideróforos) o IceT (ATPasa de expulsión de sideróforos). Además, se identificaron elementos como FetA, PfeT y CtpD cuya función se asocia a la detoxificación del citoplasma por Fe mediante la expulsión de éste. Cabe destacar que, en el modelo antiguo de homeostasis de Fe, solo existía una proteína de expulsión de Fe, mientras que con este trabajo se agregan 3 posibles componentes para

esta función. Finalmente, se identificó la Hemolisina III, proteína hemolítica con la capacidad de lisar glóbulos rojos para obtener grupos hemo.

En conjunto estos elementos ayudan a expandir el repertorio de mecanismos de homeostasis de Fe identificados en *E. faecalis*. Es importante notar que, los templados utilizados en la búsqueda que obtuvieron un homólogo por identidad en el proteoma de *E. faecalis* provienen tanto de especies Gram positivo como *B. subtilis* o Gram negativo como *E. coli*, indicando la transversalidad en la conservación de los mecanismos de homeostasis de Fe en las especies bacterianas.

## 7.2 Selección por blancos y conservación de ARNnc en *E. faecalis*

El conjunto de ARNnc identificados en *E. faecalis* proviene de dos fuentes; a partir de un análisis de secuenciación masiva del transcriptoma de la bacteria disponible en el laboratorio y el resto a partir de elementos reportados en la literatura. Este último, proviene esencialmente del trabajo realizado por Michaux y cols., en el cual se utilizaron los ARNnc identificados hasta la fecha en distintas condiciones (estrés osmótico, exposición a antibióticos y pH ácido) [48]. En conjunto, los datos suman un total 585 ARNnc, los cuales cubren elementos de tamaño largo y de tamaño corto.

El primer filtro de selección dentro del conjunto de 585 candidatos fue la identificación de ARNnc posiblemente relacionados con mecanismos de homeostasis de Fe. Para ello se utilizó el *software* IntaRNA, herramienta bioinformática ampliamente empleada para la búsqueda de blancos de ARNnc. Este enfoque es similar al utilizado en el trabajo publicado Michaux y cols., donde también se utilizó IntaRNA para la predicción de blancos transcripcionales [48].

Luego de utilizar el programa, se obtuvo un total de 4 ARNnc; 3 posibles reguladores del ARNm de *feoB* en *trans* (ncRNA\_2860, ncRNA\_3091 y ncRNA\_6060) y 1 como posible regulador del ARNm de *hlyIII* en *cis* (ncRNA\_3122). Con relación a la literatura, la proteína FeoB es un transportador de ion ferroso ampliamente conservado en bacterias cuya regulación en su expresión génica en *E. faecalis* depende de la proteína Fur [8]. Diversos son los trabajos que describen ARNnc reguladores de genes que codifican sistemas de homeostasis de Fe, donde el más caracterizado es el ARN pequeño RyhB (90 nt) y su blanco, el ARNm de *fur* [71]; sin embargo, no hay evidencia de la regulación de este ARNnc ni de otros sobre el ARNm de *feoB*. Del mismo modo, no se identificó un homólogo por

identidad de RyhB en *E. faecalis* u otro ARNnc que tenga como blanco el ARNm del gen *fur*. Para el caso de la Hemolisina III, proteína  $\beta$ -hemolítica capaz de lisar glóbulos rojos para la obtención de grupo hemo, no existen reportados ARNnc capaces de regular su ARNm, a diferencia del gen que codifica la hemolisina- $\delta$  de *Staphylococcus aureus*, donde se ha descrito que el ARNnc Sprx1 interactúa con el ARNm de *hld* permitiendo un aumento de su expresión [74].

Considerando que los mecanismos regulatorios que participan en el control de la expresión de transcritos que codifican proteínas de homeostasis de metales (incluyendo Fe) son conservados en todo el orden *Lactobacillales* y, además, el grado de conservación puede entenderse como un parámetro relacionado a la importancia de este elemento en el proceso, el siguiente análisis fue identificar el grado de conservación de los 4 ARNnc y sus blancos en el genoma de 15 especies del orden. El análisis de conservación nucleotídica de los blancos *feoB* y *hlyIII*, reveló que ambos genes se conservan en *E. faecium* y *E. hirae*. Estos datos sugieren que la conservación de estos elementos a nivel de ADN está supeditada a la cercanía en el árbol filogenético, puesto que ambas especies son las más cercanas a *E. faecalis* en el orden. Esta observación se repite cuando se analiza la conservación a nivel nucleotídico de los ARNnc, donde 3 de los 4 ARNnc seleccionados están conservados en al menos una especie del orden, teniendo mayor presencia en *E. hirae* y *E. faecium*.

En este punto del análisis, es importante declarar el procedimiento para definir los parámetros de utilización del BlastN en la búsqueda de conservación de ARNnc. Al utilizar BlastN con sus parámetros por defecto para la búsqueda de los ARNnc seleccionados en otras especies del orden, no se encontró ninguna coincidencia, lo cual es llamativo considerando el hecho que los mecanismos de homeostasis son conservados en el orden *Lactobacillales*. La mirada canónica de la conservación se basa en la similitud en secuencia nucleotídica o aminoacídica. Al respecto, considerando que el código genético es degenerado existe una mayor divergencia a nivel de ADN en relación con la secuencia primaria de las proteínas, por lo cual, fue necesario un nuevo enfoque para estudiar la conservación de ARNnc de *E. faecalis* dentro del orden *Lactobacillales*.

El fundamento para el funcionamiento de herramientas como BlastN radica en separar la secuencia nucleotídica en segmentos de determinado número de nucleótidos. Este número es conocido como Tamaño de Palabra o *Word Size* (WZ). Por defecto, su valor es de 28, donde una disminución en el WZ implica mayor probabilidad de encontrar

homología en la búsqueda. Esta fue la estrategia utilizada por Yang y cols., para el análisis de ARNnc [50]. Bajo el mismo criterio, se logró obtener homología de los ARNnc en estudio con otras especies del orden.

Esta estrategia hace reflexionar sobre la apertura de un nuevo de campo para el estudio de los ARNnc y su conservación, dado que se necesitan herramientas bioinformáticas que puedan incluir otros parámetros para la búsqueda, como, por ejemplo: i) comparar la estructura secundaria e incluso terciaria que adoptan los ARNnc, ii) determinar si sus blancos de regulación son conservados entre las especies y iii) determinar si comparten el mismo contexto genómico donde están codificados. Todos estos elementos pueden darse de manera independiente para cada ARNnc identificado en las especies, donde el desafío es desarrollar herramientas bioinformáticas que guíen la investigación de ARNnc hacia el estudio de su conservación entendiendo la importancia de este elemento [75].

En resumen, la búsqueda *in silico* permitió la actualización del modelo de homeostasis de Fe de *E. faecalis*, aumentando los componentes en aproximadamente un 36% con respecto al modelo antiguo. Además, esto permitió aumentar la probabilidad de encontrar ARNnc que pudieran regular la expresión de estos elementos de homeostasis. Siguiendo esta línea se buscaron ARNnc que regularan estos mecanismos de homeostasis de Fe mediante el *software* bioinformático IntaRNA. Como resultado, se obtuvo un total de 4 ARNnc que pudiesen estar regulando los elementos mencionados. Entendiendo que los mecanismos de homeostasis de Fe son conservados en el orden *Lactobacillales*, se utilizó BlastN para la búsqueda de los ARNnc en este orden, resultando en la conservación de 3 ARNnc en especies filogenéticamente cercanos a *E. faecalis*, lo cual condujo a su selección final para los estudios posteriores de expresión génica.

### **7.3 Estandarización de condiciones experimentales**

Diversas evidencias experimentales en bacterias dan cuenta que los ARNnc pueden regular mecanismos de homeostasis de Fe [24]. Sin embargo, esta modulación no se ha descrito en *E. faecalis*. Por otro lado, en cuanto a su mecanismo de acción, éstos pueden interactuar por complementariedad de base con los ARNm blancos formando un híbrido ARNm-ARNnc impidiendo su traducción a través del bloqueo de secuencias de unión a ribosoma (SUR) y/o disminuyendo la estabilidad de los transcritos. Es por esta razón, en general, existe una relación inversa entre cantidad de ARNm blanco y ARNnc regulador. A

pesar de ello, también se ha reportado la existencia de ARNnc capaces de aumentar la expresión de sus transcritos a través de la exposición de las zonas SUR, que, sin el ARNnc, estarían bloqueadas por la formación de una estructura secundaria del ARNm. Interesantemente, los ARNnc pueden regular positiva o negativamente a más de un blanco, de manera que un mismo ARNnc podría bloquear la expresión de un blanco y promover la expresión de otro. Un ejemplo de esto es el ARNnc RhyB involucrado en la homeostasis de Fe en bacterias como *E. coli* o *B. subtilis* [71].

En atención a lo anterior, este objetivo tuvo como finalidad verificar si los ARNnc seleccionados son capaces de responder a distintas concentraciones de Fe y, además, establecer una correlación en abundancia entre los tres ARNnc seleccionados con la abundancia de sus ARNm blanco, para así, relacionarlo con los mecanismos de acción de los ARNnc descritos anteriormente.

En primer lugar, a fin de establecer las condiciones en las cuales se medirían los transcritos tanto de ARNnc como de sus blancos, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano de *E. faecalis* OG1RF silvestre en las distintas disponibilidades de Fe. La concentración tanto de quelante o exceso de Fe se seleccionó considerando una concentración fija máxima que no afectase el crecimiento bacteriano, ya que la mortalidad producto de concentraciones tóxicas podría además inducir respuestas transcripcionales que distorsionan el efecto directo del metal; en otras palabras, siempre se estudió bajo un escenario de homeostasis. Para el caso del déficit de Fe, generado por la adición 2,2'-DPD, quelante extracelular, la concentración máxima a la cual no se observó un retardo en crecimiento bacteriano con respecto a su contraparte sin quelante correspondió a 0,5 mM. Al repetir la estrategia ahora frente a un exceso de Fe, ninguna concentración utilizada logró afectar el crecimiento bacteriano. Sin embargo, la adición de concentraciones superiores a 0,5 mM de FeCl<sub>3</sub> favorecen la formación de un precipitado con el cual era difícil trabajar y que podría alterar de forma desconocida el análisis de los resultados, de manera que esta concentración fue la seleccionada para evaluar la abundancia de los ARNnc. Estos resultados también fueron apoyados por el análisis de tiempos generacionales de la bacteria, lo cuales además coinciden con resultados de trabajos publicados en *E. faecalis* expuesta a diferentes escenarios de Fe.

El siguiente paso fue corroborar si los estímulos definidos anteriormente (0,5 mM de FeCl<sub>3</sub> o 2,2'-DPD) afectan el contenido intracelular de Fe. Para esto, *E. faecalis* se sometió a ambos tratamientos y se midió el Fe intracelular mediante la técnica de TXRF. Tal como

se ha reportado en una publicación anterior [8], los resultados arrojan que en condición de déficit existe una baja cantidad citoplasmática de Fe con respecto al control. Se ha observado que la exposición de *E. faecalis* a condiciones de déficit de Fe provoca el aumento en la abundancia de transcritos asociados a la entrada de Fe como los operones *feoAB*, *fhuDCBG* e *yciQPN*. En cuanto a ARNnc se refiere, se ha constatado en diversas bacterias el rol de estas moléculas en la mantención de la homeostasis de Fe en bacterias. La respuesta asociada a los ARNnc en condiciones de déficit de Fe se llama *iron-sparing response* y consiste en la regulación negativa de elementos no esenciales que utilizan Fe para reemplazarlos por elementos independientes de Fe que cumplen la misma función [71]. Un ejemplo de esto último se da en *E. coli*, en la cual se ha observado que en condiciones de déficit del metal el ARNnc RhyB regula de forma negativa al transcrito del gen *sodB* (superóxido dismutasa asociada al manejo del estrés oxidativo) dependiente de Fe mientras que el transcrito del gen *sodA*, cuya proteína es dependiente de manganeso, aumenta su abundancia gracias a RyhB [76].

Nuestros resultados indican que en la condición exceso de Fe *E. faecalis* acumula más del doble del metal que en la condición control. El hecho que *E. faecalis* acumule una alta cantidad de Fe en su citoplasma y sin ver afectado su crecimiento bacteriano nos indica que esta bacteria posee mecanismos para reducir el estrés oxidativo, el principal efecto adverso de la acumulación de Fe. En *E. faecalis* se ha observado que la exposición a altas concentraciones de Fe provoca el aumento de transcritos asociados a proteínas Dps. Como se mencionó anteriormente estas proteínas son capaces de almacenar Fe, inmovilizándolo y funcionar como reservorio de este metal [16,17]. Además de este tipo de proteínas, existe un aumento en la expresión de CzcD, transportador que se ha asociado a la expulsión de Fe desde el citoplasma en *Bacillus subtilis* [19]. En cuanto a la respuesta asociada a estrés oxidativo, el aumento en el Fe citoplasma de *E. faecalis* provoca la expresión de ferredoxina, proteína envuelta en el transporte de electrones envuelta a la aerotolerancia en *Campylobacter jejuni*. Dado que la ferredoxina tiene el mismo perfil de expresión en la exposición a Fe como a Cu, siendo ambos metales partícipes del estrés oxidativo, no se puede descartar que esta proteína tenga una función disminuyendo el estrés oxidativo [77].

En resumen, los resultados de la curva de crecimiento en conjunto con el contenido interno de Fe de *E. faecalis* indican que, bajo la exposición de quelante o exceso de Fe, esta bacteria es capaz de mantener la homeostasis del metal sin ver afectado su crecimiento.

#### 7.4 Cambios de abundancia de los ARNnc seleccionados en cepa silvestre

Con el objetivo de cuantificar los transcritos de los ARNnc seleccionados en las diferentes disponibilidades de Fe se utilizó la técnica qPCR. La medición de los ARNnc tiene un alto grado de complejidad dado el contexto genómico en el que se encuentran codificados los ARNnc. En esta parte, el primer desafío fue establecer un protocolo específico para la detección de los ARNnc. Las razones, el uso de partidores al azar (*random primers*) para la generación de ADNc presenta un problema: dado que todas las moléculas de ARNnc en estudio presentan complementariedad en *cis* con un transcrito codificante. De este modo, el proceso de transcripción reversa convencional generaría ADNc de hebra doble mayormente representado a nivel de abundancia por el ARNm. Como alternativa, diversos trabajos que estudian cambios de abundancia de ARNnc utilizan Northern Blot para la detección de estos transcritos no codificantes; sin embargo, esta técnica requiere grandes cantidades de ARN para su detección y sondas de detección específicas [70]. Ahora bien, luego de una búsqueda exhaustiva se encontró una publicación que da cuenta del uso y validación de medición de ARNnc mediante qPCR, herramienta más sensible y donde se pueden analizar distintos transcritos en la misma muestra [52]. La estrategia utilizada en esta publicación consiste en la generación de ADNc de hebra simple específica a partir de un proceso de retrotranscripción de las muestras de ARN provenientes de los tratamientos en estudio, donde la selección de partidores es crucial para una correcta retrotranscripción específica. Teniendo esto en consideración, se logró diseñar con éxito los partidores específicos para los 3 ARNnc en estudio.

Con respecto a los resultados sobre los cambios de abundancia de los ARNnc en las distintas condiciones, el análisis se realizó a dos niveles. En primer lugar, observando si existe una correlación entre los cambios de abundancia de los ARNnc y sus blancos, lo cual permite establecer posibles mecanismos de regulación (positiva o negativa). En segundo lugar, si los cambios de abundancia de los ARNnc en las distintas condiciones podrían estar influenciados por el factor de transcripción Fur.

La primera dimensión de análisis de estos resultados corresponde a la correlación entre los niveles de los ARNnc seleccionados y sus blancos hipotéticos. La información correspondiente a los niveles transcripcionales de los blancos en *E. faecalis* se encuentran en la literatura [8]. Según los datos publicados, la abundancia de los blancos *feoB* y *hlyIII*

en condición de déficit de Fe aumenta de forma significativa con respecto a la condición control, respuesta transcripcional que además se replica en otros modelos como *Vibrio cholerae* o *Edwardsiella tarda* [78,79]. Por el contrario, el exceso de Fe no causó un cambio significativo en la abundancia transcripcional del ARNm *hlyIII* con respecto a la situación control.

En relación con la abundancia del ARNm de *feoB*, en un trabajo realizado por Latorre y cols., se demostró que, bajo un escenario de déficit, existe un aumento significativo de este transcrito en *E. faecalis* [8]. Por el contrario, en la condición exceso, la abundancia de *feoB* disminuye. Esto es consistente con el hecho que en *E. faecalis* el operón *feoAB* posee un sitio de unión a Fur en su región promotora, de manera que el exceso de Fe provoca el paso de Fur en su forma apo a holo, aumentando su afinidad por dicho sitio de unión impidiendo la transcripción del gen *feoB* [8].

En relación con los tres ARNnc en estudio, todos cambiaron su abundancia en las condiciones de exposición a Fe, por lo cual se puede decir que responden a los cambios intracelulares del metal. En particular, el ARNnc ncRNA\_3122 aumenta sus niveles en ambas condiciones con respecto al basal. En la predicción bioinformática realizada en el primer objetivo de esta tesis se predijo que ncRNA\_3122 es capaz de interactuar con el ARNm del gen *hlyIII*, de manera que, correlacionando la abundancia del ARNm y del ARNnc, hipotetizamos que este ARNnc podría regular positivamente al ARNm promoviendo su expresión en condiciones de déficit de Fe. En la literatura se establece que el incremento del ARNm mediado por ARNnc puede darse por dos vías: primero, la regulación positiva del ARNm de *hlyIII* puede ser resultado de un promotor más activo; segundo, la acumulación del ARNm de *hlyIII* puede deberse a una mayor estabilidad de éste [37]. A pesar de ello, no se han observado ARNnc codificados en *cis* que aumenten la abundancia de sus blancos, por lo cual el mecanismo de acción específico del ARNnc ncRNA\_3122 sobre el ARNm *hlyIII* es una interrogante que podría abordarse en futuros estudios.

Con respecto a ncRNA\_2860, éste disminuye su abundancia en ambas condiciones experimentales de Fe casi en la misma proporción. Como se mencionó, el blanco según la predicción bioinformática de ncRNA\_2860 es el ARNm del transportador de ion ferroso FeoB cuya abundancia transcripcional disminuye en exceso y aumenta cuando hay déficit de Fe. El operón *feoAB* en *E. faecalis* posee en su zona regulatoria un sitio de unión a Fur, existiendo represión en la transcripción de este elemento [8]. Por esto, que en condición de exceso de Fe lo más probable es que Fur se encargue de la regulación, situando al

ncRNA\_2860 en un contexto de regulación secundaria. En el caso de este ARNnc en el déficit de Fe, disminuye su abundancia mientras su blanco aumenta. A pesar de que el aumento en la abundancia del ARNm del gen *feoB* se puede explicar a través de la desrepresión de Fur, el hecho que su ARNnc regulador, ncRNA\_2860, disminuya su abundancia y el de su blanco aumente es un tipo de regulación clásica de los ARNnc. En el contexto de los mecanismos de homeostasis de Fe en bacterias, el ARN pequeño sensible a Fe RyhB es capaz de regular negativamente una serie de ARNm involucrados en la adquisición de Fe, tales como el transcrito de la proteína Bfr encargada del almacenamiento de Fe [35]. Además, la ausencia de este ARNnc induce un aumento en la abundancia de su blanco, el operón *sdhABCD*. Del mismo modo, en *E. coli* RyhB es capaz de disminuir la abundancia del ARNm del gen *fepb* (gen que codifica para un transportador del sideróforo enterobactina) a través de la unión a una secuencia Shine-Dalgarno contenida en este ARNm [80].

Finalmente, según la predicción ncRNA\_3091 al igual que el ncRNA\_2860 regulan al ARNm del gen *feoB*, habiendo un aumento en los niveles de este ARNnc en ambas condiciones con una predominancia en la condición de déficit. En esta condición, tanto el ncRNA\_3091 como su blanco aumentan su abundancia, indicando que el ARNnc podría estar promover la traducción de su ARNm regulado similar a los mecanismos presentados anteriormente en el ncRNA\_3122; sin embargo, la regulación en este caso es de tipo *trans*.

En resumen, nuestros resultados indicaron que los tres ARNnc seleccionados cambiaron sus niveles en las diferentes condiciones de Fe en *E. faecalis* silvestre con respecto a la condición basal. Dado que las condiciones de exceso y déficit de Fe se traducen en un cambio en el contenido intracelular de Fe, es posible suponer que este cambio podría inducir la respuesta de los ARNnc seleccionados. El hecho que los ARNnc seleccionados cambien su abundancia en los distintos tratamientos sugiere que existe una molécula que es responsable de modular este proceso. En general, los responsables de los niveles transcripcionales son factores de transcripción cuya función es mantener en equilibrio la homeostasis de distintos elementos en la bacteria y de esta manera, responder ante los cambios en el ambiente. En nuestro caso, y con la información expuesta en las secciones anteriores, quisimos estudiar si el responsable de los cambios en la abundancia de los ARNnc en respuesta a la disponibilidad de Fe es el factor de transcripción Fur.

## 7.5 Cambios de abundancia de los ARNnc seleccionados en *E. faecalis*

### *Δfur*

En la literatura existe evidencia sobre ARNnc reguladores de elementos relacionados a la homeostasis de Fe y que son capaces de responder a los cambios en el contenido intracelular de Fe. Uno de ellos es el ARN pequeño NrrF presente en *Neisseria meningitidis*, cuya función forma parte de la *iron-sparing response*, proceso de adaptación a la privación de Fe cuyo objetivo es disminuir la expresión de proteínas dependientes de Fe. Es por esta razón que este ARNnc cambia su abundancia positivamente en condiciones de déficit de Fe [81]. Los cambios en los niveles de NrrF en *N. meningitidis* se explican debido a que *nrrF* está bajo el control transcripcional de Fur, de manera que en condiciones de exceso disminuye su abundancia [82]. Siguiendo la misma línea, el ARNnc RhyB en *Escherichia coli*, el primero en ser identificado en esta bacteria y homólogo funcional de NrrF, también responde a cambios internos en el contenido de Fe, específicamente al déficit. Interesantemente, este gen también responde al control transcripcional de Fur. Al igual que estos dos últimos ejemplos, existe aún más evidencia relacionada a cambios de expresión de los genes que codifican los ARNnc y su relación con el factor de transcripción Fur: ARNnc ArrF en *A. vinelandii*, FsrA en *B. subtilis* o IsaR1 en *Synechocystis* todos bajo el control Fur [71]. En general, la interacción entre estos ARNnc y sus blancos necesita de la acción de una chaperona de ARN conocida como Hfq, sin embargo, se ha reportado que en *E. faecalis* no existen homólogos por identidad de Hfq [72]. A pesar de ello, se ha propuesto una proteína con funciones similares en *E. faecalis* llamada CspR capaz que unir ARNm y que actúa a nivel post transcripcional [73]

Tomando todos estos antecedentes en consideración, la segunda dimensión para el estudio de expresión abordado en esta tesis fue la relación entre los cambios entre los niveles de los ARNnc y su relación con el factor de transcripción Fur. Para abordar esto, la cepa utilizada en este objetivo corresponde a la cepa no patogénica *E. faecalis* OG1RF *Δfur*. En relación con los ensayos microbiológicos para esta cepa en las diferentes condiciones de Fe en estudio, su crecimiento no difiere significativamente con respecto a la cepa silvestre, tanto en condiciones de exceso o déficit del metal. Comportamientos similares se han descrito en *E. faecalis* cuando se deleta otro factor de transcripción asociado a la homeostasis de cobre [77]. A pesar de que el crecimiento de *Δfur* no difiere con respecto a la cepa silvestre, al comparar la concentración interna de Fe en las distintas disponibilidades de éste, la cepa mutante acumula más Fe en déficit, basal y exceso. Este

efecto es consistente con datos publicados [8], puesto que como vimos, la función de Fur es reprimir los genes que codifican sistemas de ingreso de Fe de manera que, en ausencia del represor, la expresión de estos elementos es constitutiva aumentando en al menos 5 veces en comparación a la cepa silvestre.

En relación a la estructura de Fur, esta proteína posee dos dominios, uno de dimerización y otro de unión a ADN. Por su parte, cada monómero posee tres sitios de unión a Fe, de modo que la unión de Fe a estos sitios provoca la dimerización de la proteína y así aumenta la afinidad por los sitios de unión a Fur presentes en los promotores de los genes blanco [8]. Estos sitios están bastante conservados en *E. faecalis* y corresponden a un palíndromo de 15 nucleótidos (TGAnAAnnnTTnTCA) y se suele encontrar dentro de los primeros 300 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción [8]. En un trabajo anterior, se comparó el efecto provocado por la ausencia de este regulador sobre la expresión génica de sus posibles blancos (*fhuDCBG*, *feoAB* y *yclQPN*) en estado basal en relación con la cepa silvestre bajo la misma condición de crecimiento. Se observó que los blancos tuvieron una razón de cambio de mínimo 5 veces llegando hasta 16 veces con respecto a la cepa silvestre, lo cual evidencia el fuerte control transcripcional que ejerce Fur sobre sus blancos (regulación directa) [8]. Adicionalmente, se realizó un ensayo de RNA-seq que pretendía identificar nuevos blancos de Fur en *E. faecalis* cuantificando la abundancia transcripcional en una cepa  $\Delta fur$ . En este experimento, se determinó que no sólo los genes asociados a homeostasis de Fe cambiaron su abundancia en respuesta a la ausencia del regulador, sino que otros 65 transcritos cambiaron significativamente su abundancia (40 regulados positivamente y 25 regulados negativamente) producto de la ausencia del regulador Fur. Interesantemente, la búsqueda de sitios de unión a Fur en estos genes no arrojó resultados, sugiriendo que este conjunto de 65 genes responde a efectos indirectos inducidos por la ausencia de Fur, por ejemplo, el incremento en la concentración interna de Fe y no una regulación directa de este factor (acción indirecta). Este resultado además indica que este factor de transcripción posee un alta especificidad por genes involucrados en la homeostasis de Fe (operones *feo*, *fhu*, y *ycl*) en *E. faecalis*. Un caso similar ocurre en otros metales en esta bacteria, donde el regulador CopY controla la expresión de genes involucrados en la homeostasis de cobre [77].

En vista de la evidencia en la literatura sobre ARNnc involucrados en la homeostasis de Fe y de su regulación por Fur en *E. faecalis* y, además, entendiendo que esta regulación puede darse por una acción directa o indirecta, determinar si la ausencia del regulador Fur

podría inducir cambios de abundancia en los ARNnc en estudio. Para esto, replicamos las mismas condiciones utilizadas en el artículo que verificó los blancos de Fur, cuantificando la abundancia de los 3 ARNnc seleccionados en la cepa *E. faecalis*  $\Delta fur$  creciendo en condiciones basales, para luego compara este resultado con la cepa silvestre. Nuestros resultados indicaron que todos los ARNnc seleccionados disminuyen su abundancia en la cepa  $\Delta fur$  con respecto a la cepa silvestre. Con esta evidencia, podemos sugerir que el regulador transcripcional Fur afecta la regulación transcripcional de los ARNnc seleccionados, por lo que concluimos que nuestra hipótesis es verdadera. Ahora bien, con esta información no es posible adjudicarle una acción directa o indirecta sobre la regulación de los ARNnc.

Para abordar este punto, buscamos posibles motivos de unión a Fur en los promotores de estos ARNnc. La búsqueda concluyó que las cajas Fur no existen sitios de unión canónicos para Fur en los promotores de estos elementos. Este resultado sugiere que Fur no estaría directamente regulando la expresión de genes que codifican los ARNnc seleccionados, dato que se correlaciona además en base a la dirección del cambio transcripcional en la cepa  $\Delta fur$ . Si comparamos los cambios de abundancia entre elementos directamente regulados por Fur en *E. faecalis* (operones *feo*, *fhu* e *ycl*) versus elementos indirectamente regulados por Fur, en la cepa mutante los primeros presentan un aumento de al menos 8 veces en su abundancia, mientras que elementos indirectamente regulados cambian su abundancia en menor magnitud tanto a la alza como a la baja, misma situación observada por los ARNnc [8]. Esto nos lleva a pensar que la respuesta transcripcional de los ARNnc seleccionados responde a efectos secundarios como la acumulación de Fe intracelular en *E. faecalis* o a otra forma de acción de regulación por parte de Fur.

Como se mencionó, todos los ARNnc seleccionados disminuyeron su abundancia, lo que sugiere que Fur actúa como un activador indirecto que favorece la expresión de genes que codifican los ARNnc. Ejemplos de activación por parte de Fur son raros y limitados, sin embargo, están reportados en la literatura [84]. Al respecto se han propuesto 3 posibilidades en las que Fur puede operar como un activador. En primer lugar, Fur puede actuar como activador indirecto a través de la regulación de ARNnc [24]. En *E. coli*  $\Delta fur$  se constató que el ARNnc RyhB es capaz de regular el ARNm de elementos de respuesta a estrés oxidativo como *sodB* [85]. En segundo lugar, la unión de Fur a sitios de unión regulatorios podría potenciar de forma directa el reclutamiento de la ARN polimerasa. En tercer lugar, Fur podría actuar como un anti-represor impidiendo la unión o bloqueando

represores de un gen en particular. Como se puede observar, en los tres casos se requiere la unión de Fur a secuencias específicas (siendo una regulación directa) y que no se encontraron en los ARNnc.

Otra opción plausible para Fur como un activador indirecto podría ser la represión de genes asociados a factores de transcripción que actúen como represores de nuestros ARNnc (sistema de regulación en cadena). De esta manera al remover al represor Fur, el segundo represor podría ejercer su acción así disminuyendo la abundancia del ARNnc. En la literatura existen reportes recientes que dan cuenta de la regulación de Fur sobre otros factores de transcripción. En un trabajo realizado el año 2021 por Shao y cols., se reporta la regulación de Fur sobre la expresión del gen que codifica el activador ESRB, responsable de la transcripción del sistema de secreción de tipo III y VI (T3/T6SS) importante durante el proceso de infección de *Edwardsiella piscicida* [25]. Desde este punto de vista, sería interesante ver el efecto de los factores de transcripción que varían su abundancia en las distintas condiciones de Fe y buscar motivos de unión para éstos en los genes que codifican los ARNnc ensayados en esta tesis.

Esta alternativa abre la opción a la existencia de otros factores de transcripción asociados a los cambios en los ARNnc que responden a Fe. En la misma publicación mencionada, en *E. faecalis*  $\Delta fur$  cambian su abundancia otros factores de transcripción de la familia LexA (reparación ADN) o LysR (metabolismo basal), los cuales eventualmente podrían regular la expresión de genes asociados a ARNnc de respuesta a Fe. Esta posibilidad podría ser abordada en estudios posteriores a través de la construcción de redes de regulación y búsqueda de motivos de unión de los factores de transcripción en promotores de genes que codifican ARNnc de respuesta a Fe en *E. faecalis*.

En síntesis, integrando todos nuestros datos pudimos constatar la influencia del factor de transcripción Fur sobre la expresión de genes que codifican ARNnc. Para ello, en a partir de un conjunto de 585 ARNnc descritos en la literatura o identificados en el Laboratorio de Bioingeniería, buscamos posibles interacciones entre los ARNnc y los elementos relacionados a homeostasis de Fe descritos anteriormente y otros actualizados en este trabajo. De esta manera obtuvimos 4 ARNnc y luego de filtrar por su nivel de conservación en el orden *Lactobacillales* seleccionamos 3 (ncRNA\_2860, ncRNA\_3122 y ncRNA\_3091). Luego, el objetivo fue determinar la abundancia de estos ARNnc con el fin de verificar si existe algún cambio producto de las distintas disponibilidades de Fe. Dado que efectivamente existen cambios de abundancia de los ARNnc seleccionados,

propusimos estudiar a Fur como el responsable de estos cambios de abundancia, entendiendo que los mecanismos de homeostasis de Fe descritos en la literatura son controlados por Fur en *E. faecalis* y una gran variedad de otras bacterias. Los resultados finalmente sugirieron que la regulación por parte de Fur podría ser indirecta sobre los genes que codifican ARNnc y que probablemente corresponde a un efecto secundario de la ausencia del regulador, como por ejemplo, a cambios en la disponibilidad de Fe.

## 8 CONCLUSIONES

El objetivo inicial de esta tesis fue ampliar los mecanismos de homeostasis de Fe en *E. faecalis* a través de la búsqueda de elementos de homeostasis de bacterias en el proteoma de *E. faecalis*. En este contexto logramos de forma exitosa actualizar el modelo existente, agregando 6 proteínas nuevas al modelo de homeostasis de Fe en *E. faecalis*.

Atendiendo al tipo de blanco regulado y a la conservación de elementos de homeostasis de Fe en el orden *Lactobacillales*, se logró identificar 3 ARNnc que pudiesen estar regulando sistemas de homeostasis de Fe en *E. faecalis*. Este estudio es el primero en identificarlos.

La cuantificación de la abundancia transcripcional de los ARNnc seleccionados en condiciones de exceso y déficit con respecto al estado basal, reveló que éstos responden a los cambios en las condiciones de Fe, abriendo la posibilidad que exista un factor de transcripción u otro elemento a cargo de estos cambios transcripcionales.

Los estudios de expresión en la mutante  $\Delta fur$  revelan que el factor de transcripción Fur influye en la transcripción de los ARNnc seleccionados, sin embargo, no de manera directa dada la ausencia de motivos de unión para este factor. Este hecho abre la puerta para el estudio de ARNnc sobre la homeostasis de Fe y su efecto en patogénesis.

Finalmente, siendo un elemento esencial para las bacterias, la regulación transcripcional de la homeostasis de Fe es un proceso complejo el cual incluye diferentes mecanismos de control. Entendiendo la relevancia del estudio de *E. faecalis* y su relación con el Fe, es importante continuar con la caracterización de los 3 ARNnc estudiados en esta tesis, lo que abre un nuevo campo de investigación para el control de este patógeno.

## 9 REFERENCIAS

- [1] Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278.
- [2] Sander, H. S. (2002). Enterococos resistentes a vancomicina: ¿Infección emergente inminente?. *Revista Chilena de Infectología*, 19, S50-S55.
- [3] Bradley, C. R., & Fraise, A. P. (1996). Heat and chemical resistance of *enterococci*. *Journal of Hospital Infection*, 34(3), 191-196.
- [4] López, G., Latorre, M., Reyes-Jara, A., Cambiazo, V., & González, M. (2012). Transcriptomic response of *Enterococcus faecalis* to iron excess. *Biometals*, 25(4), 737-747.
- [5] Marchetti, M., De Bei, O., Bettati, S., Campanini, B., Kovachka, S., Gianquinto, F., Spyraakis & Ronda, L. (2020). Iron metabolism at the interface between host and pathogen: From nutritional immunity to antibacterial development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2145.
- [6] Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C., & Vinckx, T. (2011). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, 3(6), 540-549
- [7] Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-23.
- [8] Latorre, M., Quenti, D., Travisany, D., Singh, K. V., Murray, B. E., Maass, A., & Cambiazo, V. (2018). The role of Fur in the transcriptional and iron homeostatic response of *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1580.
- [9] Outten, F. W., & Twining, B. S. (2007). Metal homeostasis. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 1-10.
- [10] Braun, V. & Hantke, K. (2011). Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion Chemical Biology*, 15, 328–334.
- [11] Lisiecki, P., Wysocki, P., & Mikucki, J. (2000). Occurrence of siderophores in *enterococci*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 289(8), 807-815.
- [12] Lisiecki, P. (2017). Transferrin and lactoferrin-human iron sources for *enterococci*. *Polish Journal of Microbiology*, 66(4), 419-25.

- [13] Gruss, A., Borezée-Durant, E., Lechardeur, D. (2012). Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 61, 69-124.
- [14] Sobiś-Glinkowska, M., Mikucki, J., Lisiecki P. (2001) Influence of iron-restricted conditions on growth and hydroxamate siderophore release in *enterococci*. *Acta Microbiology Polish*, 50(2),179-82.
- [15] Frankenberg, L., Brugna, M., & Hederstedt, L. (2002). *Enterococcus faecalis* heme dependent catalase. *Journal of Bacteriology*, 184(22), 6351-6356.
- [16] Arosio, P., Elia, L., & Poli, M. (2017). Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*, 69(6), 414-422.
- [17] Ishikawa, T., Mizunoe, Y., Kawabata, S. I., Takade, A., Harada, M., Wai, S. N., & Yoshida, S. I. (2003). The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. *Journal of bacteriology*, 185(3), 1010-1017.
- [18] Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology. Rev.* 27 (2–3), 313–339
- [19] Moore, C.M., Gaballa, A., Hui, M., Ye, R.W. and Helmann, J.D. (2005) Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. *Molecular Microbiology*. 57 (1), 27–40.
- [20] Saillant, V., Lipuma, D., Ostyn, E., Joubert, L., Boussac, A., Guerin, H. & Lechardeur, D. (2021). A novel *Enterococcus faecalis* heme transport regulator (Fhtr) senses host heme to control its intracellular homeostasis. *MBio*, 12(1), e03392-20.
- [21] Hassan, H. M., & Troxell, B. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 59.
- [22] Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 881-941.
- [23] Lee, J. W., & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals*, 20(3-4), 485.
- [24] Masse, E., Salvail, H., Desnoyers, G., & Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, 10(2), 140-145.

- [25] Shao, S., Li, C., Zhao, L., Zhang, Y., Yin, K., & Wang, Q. (2021). Interplay between ferric uptake regulator Fur and horizontally acquired virulence regulator EsrB coordinates virulence gene expression in *Edwardsiella piscicida*. *Microbiological Research*, 253, 126892.
- [26] Oglesby-Sherrouse, A. G., & Murphy, E. R. (2013). Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. *Metallomics*, 5(4), 276-286.
- [27] Porcheron, G., & Dozois, C. M. (2015). Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 179(1-2), 2-14
- [28] Ahmed, W., Hafeez, M. A., & Mahmood, S. (2018). Identification and functional characterization of bacterial small non-coding RNAs and their target: A review. *Gene Reports*, 10, 167-176.
- [29] Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular Cell*, 43(6), 880-891.
- [30] Mizuno, T., Chou, M.Y., and Inouye, M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *PNAS*, 81, 1966–1970.
- [31] Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136(4), 615-628.
- [32] Viegas, S. C., Pfeiffer, V., Sittka, A., Silva, I. J., Vogel, J., & Arraiano, C. M. (2007). Characterization of the role of ribonucleases in *Salmonella* small RNA decay. *Nucleic Acids Research*, 35(22), 7651-7664.
- [33] Gottesman, S., & Storz, G. (2011). Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a003798.
- [34] Jacques, J. F., Jang, S., Prévost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., & Massé, E. (2006). RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1181-1190.
- [35] Massé, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4620-4625.

- [36] Desnoyers G., Morissette A., Prévost K., Massé E. (2009). Small RNA induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *EMBO*, 28,1551–1561
- [37] Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J. F., Phaneuf, É., & Massé, E. (2007). The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Molecular Microbiology*, 64(5), 1260-1273.
- [38] Salvail, H., Lanthier-Bourbonnais, P., Sobota, J. M., Caza, M., Benjamin, J. A. M., Mendieta, M. E. S., & Massé, E. (2010). A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15223-15228.
- [39] Večerek, B., Moll, I., & Bläsi, U. (2007). Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO*, 26(4), 965-975.
- [40] Mellin, J. R., Goswami, S., Grogan, S., Tjaden, B., & Genco, C. A. (2007). A novel fur and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3686-3694.
- [41] Smaldone, G. T., Antelmann, H., Gaballa, A., & Helmann, J. D. (2012). The FsrA sRNA and FbpB protein mediate the iron-dependent induction of the *Bacillus subtilis* *lutABC* iron sulfur-containing oxidases. *Journal of Bacteriology*, 194(10), 2586-2593.
- [42] Vanderpool, C. K. (2007). Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucosa-phosphate stress. *Current Opinion in Microbiology*, 10(2), 146-151.
- [43] Romby, P., Vandenesch, F., & Wagner, E. (2006). The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 229-236.
- [44] Livny, J., Waldor, MK. (2007) Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Current Opinion Microbiology*, 10: 96–101.
- [45] Mann, M., Wright, P. R., & Backofen, R. (2017). IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA–RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W435-W439.
- [46] Wang, L., Zhong, Q., Feng, Y., Tang, X., Wang, Q., Zou, Y., & Duan, J. (2020). Long noncoding RNA TUG1 is downregulated in sepsis and may sponge miR-27a to

downregulate tumor necrosis factor- $\alpha$ . Journal of International Medical Research, 48(4), 0300060520910638.

[47] Shioya, K., Michaux, C., Kuenne, C., Hain, T., Verneuil, N., Budin-Vernuil, A., Hartsch, T., Hartke, A., Giard, J.C. (2011). Genome-Wide Identification of Small RNAs in the Opportunistic Pathogen *Enterococcus faecalis* V583. PLoS ONE 6(9): e23948

[48] Michaux, C., Hansen, E.E., Jenniches, L., Gerovac, M., Barquist, L., & Vogel J. (2020). Single-Nucleotide RNA Maps for the Two Major Nosocomial Pathogens *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 10:600325.

[49] Reyes, A., Leiva, A., Cambiazo, V., Méndez, M. A., & Gonzalez, M. (2006). Cop-like operon: structure and organization in species of the *Lactobacillale* order. Biological Research, 39(1), 87-93.

[50] Yang, Y., Zhou, R., Zhu, S., Li, X., Li, H., Yu, H., & Li, K. (2017). Systematic Identification and Molecular Characteristics of Long Noncoding RNAs in Pig Tissues. BioMed research International, 2017, 6152582

[51] Hall, T. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. GEF Bull Biosciences, 2(1), 60-61.

[52] Wu, S., Liu, Y., Lei, L., & Zhang, H. (2021). Endogenous antisense *walR* RNA modulates biofilm organization and pathogenicity of *Enterococcus faecalis*. Experimental and Therapeutic Medicine, 21(1), 1-1.

[53] Pinochet-Barros, A., & Helmann, J. D. (2020). *Bacillus subtilis* Fur Is a Transcriptional Activator for the PerR-Repressed *pfeT* Gene, Encoding an Iron Efflux Pump. Journal of Bacteriology, 202(8).

[54] Vigonsky, E., Fish, I., Livnat-Levanon, N., Ovcharenko, E., Ben-Tal, N., & Lewinson, O. (2015). Metal binding spectrum and model structure of the *Bacillus anthracis* virulence determinant MntA. Metallomics, 7(10), 1407-1419.

[55] Martin, J. E., Waters, L. S., Storz, G., & Imlay, J. A. (2015). The *Escherichia coli* small protein MntS and exporter MntP optimize the intracellular concentration of manganese. PLoS Genet, 11(3), e1004977.

- [56] Pi, H., & Helmann, J. D. (2017). Sequential induction of Fur-regulated genes in response to iron limitation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(48), 12785-12790.
- [57] Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J. P., & Beauregard, P. B. (2019). Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3), e02439-18.
- [58] Pi, H., & Helmann, J. D. (2017). Ferrous iron efflux systems in bacteria. *Metallomics*, 9(7), 840-851.
- [59] Patel, S. J., Lewis, B. E., Long, J. E., Nambi, S., Sassetti, C. M., Stemmler, T. L., & Arguello, M. J. (2016). Fine-tuning of Substrate Affinity Leads to Alternative Roles of *Mycobacterium tuberculosis* Fe<sup>2+</sup>-ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 11529–11539.
- [60] Salusso, A., & Raimunda, D. (2017). Defining the Roles of the Cation Diffusion Facilitators in Fe<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> Homeostasis and Establishment of Their Participation in Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 84.
- [61] Sritharan, M. (2016). Iron Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic Insights into Siderophore-Mediated Iron Uptake. *Journal of Bacteriology*, 198, 2399–2409.
- [62] Sineva, E., Shadrin, A., Rodikova, E. A., Andreeva-Kovalevskaya, Z. I., Protsenko, A. S., Mayorov, S. G., Galaktionova, D. Y., Magelky, E., & Solonin, A. S. (2012). Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3327-3335.
- [63] Frawley, E. R., & Fang, F. C. (2014). The ins and outs of bacterial iron metabolism. *Molecular Microbiology*, 93(4), 609-616.
- [64] Nicolaou, S. A., Fast, A. G., Nakamaru-Ogiso, E., & Papoutsakis, E. T. (2013). Overexpression of *fetA* (*ybbL*) and *fetB* (*ybbM*), encoding an iron exporter, enhances resistance to oxidative stress in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7210-7219.
- [65] Isakova, A., Fehlmann, T., Keller, A., & Quake, S. R. (2020). A mouse tissue atlas of small noncoding RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(41), 25634-25645.

- [66] Smith, A. T., & Sestok, A. E. (2018). Expression and purification of functionally active ferrous iron transporter FeoB from *Klebsiella pneumoniae*. *Protein Expression and Purification*, 142, 1-7.
- [67] Shuler, M. L., and F. Kargi. (2002). *Bioprocess engineering: basic concepts*, 2nd ed. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, NJ.
- [68] 260/280 and 260/230 Ratios. (2009). NanoDrop. Technical Support Bulletin. [http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB\\_2015/lectures/NanoDrop.pdf](http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2015/lectures/NanoDrop.pdf)
- [69] Saberi, F., Kamali, M., Najafi, A., Yazdanparast, A., & Moghaddam, M. M. (2016). Natural antisense RNAs as mRNA regulatory elements in bacteria: a review on function and applications. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21(1), 1-17.
- [70] Ho, E. C., Donaldson, M. E., & Saville, B. J. (2010). Detection of antisense RNA transcripts by strand-specific RT-PCR. *Methods in Molecular Biology*, 630, 125–138.
- [71] Chareyre, S., & Mandin, P. (2018). Bacterial iron homeostasis regulation by sRNAs. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 6-2.
- [72] Sun, X., Zhulin, I., & Wartell, R. (2002). Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Research*. 30:3662–3671.
- [73] Michaux, C., Martini, C., Shioya, K., Ahmed Lecheheb, S., Budin-Verneuil, A., Cosette & Giard, J. C. (2012). CspR, a cold shock RNA-binding protein involved in the long-term survival and the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6900-6908.
- [74] Kathirvel, M., Buchad, H., & Nair, M. (2016). Enhancement of the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* strain Newman by a small noncoding RNA SprX1. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(6), 563-574.
- [75] Diederichs, S. (2014). The four dimensions of noncoding RNA conservation. *Trends in Genetics*, 30(4), 121-123.
- [76] Niederhoffer, E. C., Naranjo, C. M., Bradley, K. L., & Fee, J. A. (1990). Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *Journal of bacteriology*, 172(4), 1930-1938.

- [77] Reyes-Jara, A., Latorre, M., López, G., Bourgogne, A., Murray, B. E., Cambiazo, V., & González, M. (2010). Genome-wide transcriptome analysis of the adaptive response of *Enterococcus faecalis* to copper exposure. *Biometals*, 23(6), 1105-1112.
- [78] Stoebner, J. A., & Payne, S. M. (1988). Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity*, 56(11), 2891-2895.
- [79] Janda, J. M., & Abbott, S. L. (1993). Expression of an iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*. *FEMS Microbiology Letters*, 111(2-3), 275-280.
- [80] Wang, J., Rennie, W., Liu, C., Carmack, C. S., Prévost, K., Caron, M. P., & Wade, J. T. (2015). Identification of bacterial sRNA regulatory targets using ribosome profiling. *Nucleic Acids Research*, 43(21), 10308-10320
- [81] Metruccio, M. M., Fantappie, L., Serruto, D., Muzzi, A., Roncarati, D., Donati, C., & Delany, I. (2009). The Hfq-dependent small noncoding RNA NrrF directly mediates Fur-dependent positive regulation of succinate dehydrogenase in *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology*, 191(4), 1330-1342
- [82] Ducey, T. F., Jackson, L., Orvis, J., & Dyer, D. W. (2009). Transcript analysis of *nrrF*, a Fur repressed sRNA of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbial Pathogenesis*, 46(3), 166-170.
- [83] Pecqueur, L., d'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., & Bersch, B. (2006). Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21286-21295
- [84] Delany, I., Rappuoli, R., & Scarlato, V. (2004). Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology*, 52(4), 1081-1090.
- [85] Massé, E., Vanderpool, C. K., & Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 6962-6971.