



# Rol de los ARN no codificantes pequeños reguladores y sus genes blanco en *Salmonella entérica*

Marcos Andrés Castro Cabrera  
Lucía Andrea Monteiro Boffill  
Lucía Rodríguez Almada  
María Lucía Rodríguez Serrano  
Antonella Sacchet Faviere

Orientador: Prof. Adj. Andrés Iriarte

Departamento de Desarrollo Biotecnológico  
Instituto de Higiene  
Facultad de Medicina, UdelaR

Setiembre, 2016

## Índice de contenidos

Pag.2- Resumen.

Pag.3- Introducción.

Pag.4- Rol de Hfq.

Pag.6- Detección de sRNA, aproximaciones experimentales.

Pag.10- sRNA y la patogenicidad.

Pag.14- Comparación entre especies.

Pag.18- sRNA en Salmonella y las variantes de los serotipos.

Pag.24- Discusión de resultados comparativos.

Pag.26- Conclusión.

Pag.26- Referencias bibliográficas.

### Resumen

*Salmonella enterica* subespecie *enterica* se divide en más de 1.500 serotipos. Este es un importante patógeno zoonótico de vertebrados de sangre caliente que presenta un amplio rango de hospederos y una distribución mundial. El potencial epidémico entre los serotipos, e incluso las enfermedades que producen, son distintos, esto es muchas veces válido incluso cuando se comparan distintos linajes dentro de un mismo serotipo. Estas diferencias fenotípicas son muy notorias al comparar, por ejemplo, los serotipos *Typhimurium*, *Dublin* y *Enteritidis*. Es altamente probable que estas diferencias tengan su base en diferencias funcionales, las que a su vez reflejan características genéticas específicas. El término ARNs pequeños (sRNA) no codificantes describe una familia heterogénea de moléculas de ARN, de las cuales la gran mayoría no codifica para proteínas. Estas moléculas son relativamente estables y cumplen funciones catalíticas, estructurales y regulatorias. Los sRNA, son un tipo particular de ARN no codificantes y regulan la expresión de genes interaccionando con la región 5' del ARNm. Si bien el conocimiento de los sRNA ya tiene algunos años, en el último tiempo ha cobrado mayor importancia. En una gran variedad de bacterias se han identificado diversos tipos de genes regulados por sRNA y se han descrito roles asociados a la supervivencia, la virulencia y la patogenicidad diferencial. En este trabajo se propone revisar los mecanismos y la función de estos sRNA, principalmente focalizando en el rol específico que cumplen regulando la expresión de varios fenotipos, específicamente aquellos que explican las diferencias en patogenicidad entre los diferentes serotipos de *S. entérica*. Finalmente se propone hacer un análisis comparativo primario de los sRNA presentes en los distintos serotipos de la especie.

## **Introducción**

Las bacterias constituyen un amplio y diverso grupo de organismos, algunos de los cuales son agentes infecciosos, que causan muertes en humanos, animales y plantas. Son organismos muy adaptables, que habitan en una amplia gama de nichos ecológicos y en condiciones ambientales diversas. Además de las especies saprofitas y comensales, este dominio alberga una amplia variedad de patógenos que colonizan eucariotas y afrontan con éxito los mecanismos de defensa inmune de sus huéspedes.

*Salmonella enterica* subespecie *enterica*, es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formada por bacilos gram negativos, anaerobios facultativos que no fermentan la lactosa, algunas subespecies son móviles con flagelos peritricos. No desarrollan cápsula ni esporas. Se divide en más de 1.500 serotipos en base a los diferentes epítopes de dos antígenos de superficie, el lipopolisacárido O y H flagelo de los cuales hay comúnmente dos fases. Este es un importante patógeno zoonótico de vertebrados de sangre caliente que presenta una amplia gama de especies de hospederos y una distribución mundial. Algunos serotipos de *Salmonella* pueden infectar a una variedad de animales mientras que otros se restringen a un único hospedero.

El potencial epidémico entre los serotipos, e incluso las enfermedades que producen, son muy distintas, esto es muchas veces válido incluso cuando se comparan distintos linajes dentro de un mismo serotipo. Estas diferencias fenotípicas son muy notorias al comparar, por ejemplo, los serotipos *Typhimurium*, *Dublin* y *Enteritidis*. Es altamente probable que estas diferencias tengan su base en diferencias funcionales, las que a su vez reflejan características genéticas específicas. Un estilo de vida patógeno requiere un estrecho control de la expresión de genes de virulencia y de las respuestas al estrés (1). Tradicionalmente, esta regulación de genes, ha sido adjudicada a la actividad de factores de transcripción que activan o desactivan grupos de genes en respuesta a señales ambientales. Se consideraba que el ARN tenía un papel menor en la actividad viral y/o bacteriana, y se creía que su única función era transportar la información genética del DNA a la proteína. Los sRNA eran tomados en cuenta como productos de degradación. Con el desarrollo de la tecnología de secuenciación del genoma, se han caracterizado los sRNA, y no todos pueden ser considerados un error de transcripción. Ahora estos sRNA se han convertido en un punto importante en la ciencia de la vida y es cada vez más evidente que estas moléculas pequeñas tienen una función clave en la regulación genética (2). En general los sRNA tienen menos de 200 nucleótidos (nt) de longitud. En *Salmonella* se conocen más de 200 tipos de sRNA.

En eucariotas existen tres clases bien estudiadas de sRNA, los *small interfering RNA* (siRNA), *micro RNA* (miRNA) y *piwi-interacting RNA* (piRNA) (3-5), existen elementos de ellos que son

homólogos en bacterias. Los sRNA son ahora conocidos como reguladores claves de procesos tan diversos como el desarrollo, la apoptosis, la autorrenovación por parte de las células madres, la diferenciación celular, y el mantenimiento de la integridad celular mediante el silenciamiento de las vías de represión traduccional o la degradación del mRNA (6-11).

El reconocimiento tardío del rol de los sRNA como reguladores podría atribuirse a el hecho de que los loci que codifican tales reguladores, raramente fueron seleccionados en estudios genéticos de screening para los factores de virulencia, probablemente debido al tamaño pequeño del gen, falta de anotaciones en las secuencias del genoma y fenotipos habitualmente sutiles en comparación con la virulencia asociada a proteínas (12,13). Gracias a la gran biodisponibilidad de genomas completos, y mediante métodos bioinformáticas fue posible predecir un gran número de sRNA. Las nuevas técnicas de secuenciación han permitido estudiar la expresión global del genoma con muy alta precisión a partir de lo cual se han descubierto un inesperado número de loci que codifican para sRNA (14,15). En posteriores análisis funcionales de estos sRNA, identificaron a muchos de ellos como integrantes de las respuestas al estrés bacteriano, con roles bien establecidos en la supervivencia bacteriana dentro del hospedero.

Segundo, se descubrieron las chaperonas de unión, tales como Hfq y CsrA, implicadas también en la virulencia bacteriana (16,17). Es importante destacar que la actividad de cualquiera de estas dos proteínas está íntimamente relacionada con los sRNA. En tercer lugar, el reciente descubrimiento de los riboswitches (18), y una mejor comprensión de los termosensores en regiones 5' de ARN bacteriano no traducidas (UTRs) ha aumentado el interés por el control postranscripcional de la expresión génica (19).

### **Rol de la proteína Hfq**

Hfq es una de las chaperonas más abundante en las bacterias (20-22), primero se identificó en *Escherichia coli* como un factor del hospedador requerido para la replicación del RNA (23), ahora se sabe que tiene un importante rol en la fisiología de las bacterias (24). Se han detectado homologos de Hfq en los genomas de la mayoría de las bacterias Gram positivas y negativas (25,26). Hfq interactúa con el sRNAs regulador y con el mRNAs blanco del regulador, y gran parte de su función post transcripcional es originada por la facilitación, generalmente corta e imperfecta de la interacción antisentido del sRNA y de sus blancos (27-32). Sin embargo, Hfq también puede actuar sola, como un represor translacional de mRNA (33,34), y también puede modular la inhibición del mRNA mediante la estimulación de la poliadenilación (35,36).

La pleiotropia de una deleción de Hfq fue el primer manifiesto del rol de Hfq en múltiples respuestas al estrés en *E. coli* (37,38).

Hfq impacta en la fisiología bacteriana de una manera muy amplia, incluyendo el control independiente del factor  $\sigma$ S sobre factores de virulencia en bacterias patógenas (39-45). Específicamente, la supresión de Hfq atenúa la capacidad del modelo patógeno de *Salmonella enterica*, serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*), para infectar ratones, para invadir las células epiteliales, para secretar factores de virulencia y sobrevivir dentro de los macrófagos cultivados (46).

La pérdida de función de la Hfq da como resultado un fenotipo de *Salmonella* no móvil, y causa la desregulación de más de 70 proteínas, incluyendo la acumulación de las proteínas de la membrana externa (OMPs); esta última se acompaña de una activación crónica del factor  $\sigma$ S, mediada por la respuesta al estrés de la membrana (46,47). Hfq también ha sido implicada en el control de los cambios en la expresión génica de *Salmonella*, que fueron inducidas por las condiciones de baja gravedad (48).

Para entender como las proteínas Hfq controlan la expresión de genes en *Salmonella* a nivel post-transcripcional se requiere de la identificación de esos sRNA y sus mRNA blanco. Durante algunos años se fueron probando diferentes técnicas para dicho objetivo, muchas de las cuales fueron inapropiadas e inútiles. Actualmente se cuenta con una técnica que utiliza secuenciación de alto rendimiento (HTPS) del ARN asociado a un epitopo marcado de la proteína Hfq (49,50). Para detectar genes que son, directa o indirectamente regulados por Hfq se determinó el perfil transcriptómico del mRNA de *Salmonella* del tipo salvaje y de la cepa mutante en Hfq, se utilizaron dos diferentes condiciones para la comparación, una fue el crecimiento aerobio en caldo para la fase estacionaria temprana (ESP) (46), y la otra condición fue el crecimiento durante en un medio salino con limitación de oxígeno (51). Comparando el perfil transcriptómico de una cepa que tiene Hfq mutada, se demuestra que esta proteína tiene efecto pleiotrópico, regulando factores de transcripción de varios grupos de genes que son expresados como una unidad, y queda probado como Hfq es requerido para la virulencia de *Salmonella* (49,50).

Se pudo concluir, además, que la proteína Hfq regula el 28% de los genes de *S. Typhimurium* adquiridos por transferencia horizontal (52), que es significativamente mayor que el 18% que regula cuando se realiza el cálculo con todo el genoma de *Salmonella*. Esto puede indicar que Hfq puede tener también un rol en la adquisición de ADN de fuentes ajenas, regulando la expresión de los genes recién adquiridos a nivel de ARN.

Mediante una clasificación funcional de los genes desregulados que se realizó con la técnica ESP, se demostró que Hfq afecta a 26 de 107 grupos funcionales de genes para *Salmonella* (53), y en siete de esos grupos más del 50% de los genes se encuentran desregulados. En cuatro de las cinco principales islas de patogenicidad de *Salmonella* (es decir, SPI-1, -2, -4, -5), y en su

movimiento por flagelos, y en la vía de quimiotaxis, se demostró que más del 60% de los genes fueron regulados hacia abajo, reduciendo su expresión, lo que explica el tipo de invasión observada y la motilidad de fenotipos de  $\Delta$ Hfq (46).

El objetivo del estudio de estos mecanismos nombrados, radica en que el correcto entendimiento del control de la expresión de genes, mejora las estrategias de prevención y tratamiento de las patologías causadas por estos microorganismos (1).

### **Detección de sRNA, aproximaciones experimentales**

En los últimos años se han probado nuevas estrategias experimentales para identificar un gran número de candidatos de sRNA en diversos organismos modelo, como ejemplo *E. coli* (54-56). Estos resultados demostraron que el número de sRNA en genomas de organismos modelo es mucho más alto del que se había previsto. A continuación, vamos a revisar distintas estrategias experimentales que se han empleado y que se emplean actualmente para identificar nuevos sRNA en genomas bacterianos (57).

### **Identificación de sRNA por secuenciación química o enzimática**

En las primeras investigaciones de sRNA, hace unos 35-40 años atrás, especies de sRNA (hasta el momento considerados RNAs ribosomal, tRNAs o RNAs virales) fueron seleccionadas y separadas por tamaño en geles desnaturizantes, seguidos de la visualización y la supresión de bandas específicas.

Para su identificación, el sRNA de interés debe estar presente en grandes cantidades, por ejemplo, visibles como una banda distinta en gel de policramida teñido con bromuro de etidio, expuesto a luz ultravioleta (UV). Posteriormente, y antes de su identificación por análisis de secuencia, los sRNA son marcados en el extremo 5' o 3' terminal (58). Luego, purificados en gel de policramida desnaturizante. Los sRNA también pueden ser marcados en vivo antes de la extracción de un organismo (59-62).

Después de la extracción de una célula u organismo, separación por tamaño y elución del gel, los sRNA eran identificados por análisis de secuencia. Esto se lograba usualmente ya sea por ARN 2D fingerprinting o secuenciación química o enzimática.

Para el análisis de la secuencia enzimática, el sRNA marcado (5' o 3' terminal) se somete a una digestión parcial con una base específica de ribonucleasa a temperaturas elevadas (50-55 °C) y en presencia de Urea 7M para evitar la interferencia de la estructura secundaria/terciaria del ARN con pasos de hidrólisis enzimática. Para una división base específica, una diversidad de ARNs pueden ser usados para adherirse preferencialmente en 3' en cualquiera de las bases G, C,

U o A. Para resolver, se obtiene fragmentos de ARN por tamaño, la electroforesis en gel 1D lleva a cabo en geles de policramida desnaturalizantes (63-64).

Para el análisis de secuencia química de sRNA, cuatro reacciones químicas diferentes, base específica, genera un medio directo de secuenciación de RNA que son marcados con  $^{32}\text{P}$  (65). Después de una modificación parcial específica de cada tipo de base de RNA, una escisión de cadena amina-catalizado genera fragmentos marcados cuya longitud determina las posiciones de cada nucleótido en la secuencia. El sulfato Dimethyl modifica Guanosina, dietilpirocarbonato ataca principalmente Adenosina, hidracina ataca Uridina y Citidina, pero la sal suprime la reacción con Uridina. En todos los casos anilina provoca una escisión de la cadena posterior (65).

### Análisis de microarrays

Este método fue durante mucho tiempo el preferido para evaluar los niveles de transcripción de muchos genes en paralelo y a menudo a nivel de todo el genoma.

Son placas de vidrio (o silicona, plástico) sobre cuya superficie sondas de ADN han sido fijados (con una densidad análoga a un microchip). Para analizar el nivel de transcripción celular global se preparan muestras de ARN total de un organismo. Las muestras usadas para la hibridación del microarrays puede ser el ARN extraído o la conversión de ADNc; en cualquier caso, estas pruebas generalmente son marcadas con tintes de fluorescencia, tales como Cy3 o Cy5 (66).

La muestra preparada se mezcla con el tampón de hibridación y se aplica a la placa de cristal para que se hibriden. La mancha de fluorescencia de la muestra es leída por un escáner y los resultados se muestran como unos patrones de manchas coloreados, rojos o verdes, con la intensidad de color que refleja la cantidad de transcripciones que estuvo presente en la célula. A mayor hibridación, mayor señal.

El Microarray se utilizó sobre todo para perfiles de expresión de ARNm pero también podrían ser un medio para estudiar la expresión de sRNA o incluso para el descubrimiento del sRNA nuevos. El diseño de las sondas es la clave para que esto sea posible, principalmente la inclusino de regiones intergenicas (IGR).

En las bacterias, la mayoría de los sRNA funcionales son codificados en regiones intergenicas (IGR). El primer microarray que incluye IGRs además de codificar regiones, fue introducido en el modelo de *E. coli* (66).

Mientras este estudio inicial, sobre todo enfocado en cuestiones técnicas de ARNm, Wassarman et al. (2001) posteriormente utilizó ese tipo de microarray para analizar específicamente la salida transcripcional de IGR. Ellos encontraron que la hibridación del array con el RNA extraído de tres diferentes condiciones de crecimiento produjeron señales de al menos un tercio

de los sRNA que fueron detectados por sondaje paralelo en northern blots. Mediante la inclusión de un conjunto mucho más amplio de condiciones de crecimiento, se encontraron transcripciones adicionales de IGR que pueden ser ARN funcionales no codificantes para proteínas (o ncRNAs).

En un tercer estudio con este tipo de microarray, sRNA celulares que se asocian con la proteína Hfq de *E. coli* fueron analizados (66).

#### Detección de microarrays: sRNA

Los Microarrays fueron durante mucho tiempo el método de elección para el control de perfiles de expresión de mRNA a nivel de genoma. También representó un medio para estudiar la expresión de sRNA o incluso para encontrar nuevos sRNA. La principal salvedad en este caso, sin embargo, parece ser el diseño de microarrays: la mayoría de los arrays disponibles en el mercado se limitan a ORFs y en el mejor incluyen genes de tRNA y rRNA. En otras palabras, transcripciones de IGRs, donde reside la mayoría de los genes de sRNA, no son detectadas. Se están mejorando este aspecto de los microarrays.

Selinger y colaboradores (2000) introdujeron un array de oligonucleótidos de alta densidad para *E. coli* que no sólo lleva cadenas específicas para todos los mRNA, tRNA y regiones de rRNA, sino que también cubre IGR de > 40 bp. En este caso las IGR tenían una sonda para cada seis bases en ambas cadenas. Aunque este estudio se centró principalmente en la sensibilidad y la reproducibilidad de los mRNA, proporciona datos preliminares sobre algunos RNAs antisentidos e intergénicos detectados simultáneamente (66).

Posteriormente, Wassarman et al (2001) complementa su predicción de sRNA por métodos computacionales usando el mismo tipo de array y analizando específicamente la salida transcripcional intergénica (56).

En otro estudio que utilizó los mismos arrays de alta densidad de *E. coli*, fueron ocasionalmente detectadas en la cadena inversa de una región experimentalmente validada de sRNA (Tjaden et al., 2002) (56).

La densidad extraordinariamente alta de la sonda puede facilitar la detección de fragmentos 3' o 5' UTR ARN que se acumulan tras el procesamiento de transcripciones del mRNA (Tjaden et al., 2002) (66).

El mismo estudio, sin embargo, destacó la necesidad de validar los resultados de microarrays iniciales por técnicas experimentales independientes como la hibridación northern o protección. Nueve nuevos sRNA intergénicos fueron pronosticados basados en la intensidad de su transcripción y expresión dependiente del crecimiento. También parece haber cierta homología de la secuencia de estos loci de *E. coli* con las regiones correspondientes en *Salmonella*

typhimurium. Sin embargo, para crear cepas de sRNA en *Salmonella*, revisitó a estos nueve candidatos y se ha podido identificar la similitud de secuencia estadísticamente significativo para seis de ellos (C0614, C0465, C0299, C0293, C0719, C0067), mientras que otros dos parecen representar elementos altamente repetitivos (C0664, C0362).

#### Análisis de datos de secuenciación masiva

El continuo desarrollo de las plataformas de secuenciación de alto rendimiento ha dado lugar a un incremento vertiginoso en la cantidad de datos genómicos generados. A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, estas plataformas son capaces de leer paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación en un tiempo récord y con un costo cada vez más reducido.

#### RNA – Seq, secuenciación del transcriptoma completo

Se conoce como “RNA-Seq” a la secuenciación masiva de cDNA mediante plataformas de secuenciación de alto rendimiento cuyo objetivo final es la obtención de la información global sobre el contenido de ARN de una muestra, incluyendo ARNm, ARNr, ARNts y otros sRNA no codificantes para proteínas, compuesta por una única célula (*single cell*) o conjunto de células. Gracias a la eficacia, reproducibilidad y rendimiento de las plataformas de secuenciación de última generación, la técnica de RNA-Seq proporciona a los investigadores una forma eficiente de medir niveles de expresión génica, identificar eventos de splicing alternativo, identificar eventos de fusión génica e identificar SNVs de manera simultánea a la vez que se reduce el precio por muestra.

Como se menciono anteriormente los ARNs no codificantes de pequeño tamaño incluyen un gran número de moléculas con funciones y estructuras muy diversas, en procariotas y eucariotas. Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva hacen posible el estudio del estos elementos, el microtranscriptoma, permitiendo la identificación, cuantificación y caracterización de cientos de estas pequeñas cuya función puede ser clave para el funcionamiento de la maquinaria celular en general.

Métodos de secuenciación masiva mayormente utilizados hasta el momento:

##### 1. Pirosecuenciación

El primer método de secuenciado masivo o “*next generation sequencing*” (NGS), fue publicado en 2005. El método consiste en 4 pasos: Fragmentación del ADN (o ARN), Ligación de

oligonucleótidos (adaptadores) en cada uno de los extremos, Amplificación clonal (mediante PCR en emulsión), Secuenciado por síntesis usando un protocolo de pirosecuenciación optimizado en un soporte sólido y en escala de picolitros.

Luego de fragmentar el ADN, se ligan oligonucleótidos adaptadores a cada extremo del ADN. Una vez ligados los adaptadores, se ligan a las beads (esferas que contienen el complementario a uno de los adaptadores en su superficie), por un método de dilución límite, de modo de obtener un único fragmento unido a una esfera o perla (*bead*). Se busca, entonces, obtener en cada *bead* un único fragmento de ADN, el mismo es amplificado mediante PCR en emulsión.

## 2. Illumina

La segunda tecnología de secuenciación masiva, salió al mercado en 2006, fue la de Solexa (luego adquirida por Illumina). En esta tecnología, se utilizan nucleótidos terminadores marcados con moléculas fluorescentes al igual que en la secuenciación de tipo Sanger. Además de la paralelización masiva (es decir la capacidad de realizar millones de secuencias en cada corrida), la diferencia con el método convencional es la posibilidad de eliminar la fluorescencia una vez obtenida la imagen, y desbloquear carbono 3' de modo que pueda aceptar una nueva base para continuar la reacción de secuenciación, haciendo que la incorporación de un nucleótido terminador sea reversible. Al igual que el método de secuenciación de pirosecuenciación de Roche, los primeros pasos consisten en la fragmentación del ADN y ligación de adaptadores. Luego hay un paso de amplificación (en este caso, la amplificación es en una superficie sólida: "flow cell", donde también se dará luego la reacción de secuenciación).

### **Rol de los non-coding en la patogenicidad**

Una vez ingerida, *Salmonella* debe hacer frente primero a un aumento en la temperatura seguido por el ambiente ácido del estómago. En el intestino, este microorganismo se somete a un aumento de la osmolaridad, una disminución en la tensión de oxígeno, a la bilis y a la competencia con la microbiota intestinal (66). La *Salmonella* se puede introducir posteriormente y proliferar dentro de células no fagocíticas y células fagocíticas, donde el patógeno resiste a los mecanismos de defensa intracelulares tales como los pépticos antimicrobianos, la acidificación de la vacuola que contiene *Salmonella* y a la producción de especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno (67). La membrana externa es una característica de las bacterias Gram negativas. Junto con la capa de peptidoglicano y la membrana interna forman la envoltura celular bacteriana. Debido a sus propiedades físicas, la membrana externa funciona como una barrera selectiva que impide que la entrada de muchas moléculas tóxicas a la célula, y juega un rol de supervivencia bacteriana vital en diversos ambientes (68). Gracias a esta membrana las bacterias pueden

sobrevivir dentro de los macrófagos e invadir células eucariotas. La exposición en la superficie celular ha dado lugar a la explotación de proteínas de membrana externa por agentes patógenos tales como bacteriófagos y bacteriocinas. De hecho, varias proteínas de la membrana externa se describieron primero como receptores de bacteriófagos antes de que se descubrió su función fisiológica. Las proteínas integrales de membrana externa no consisten en una alfa -hélice transmembrana, en su lugar se pliegan adoptando una estructura beta. En los últimos años se han determinado las estructuras atómicas de varias proteínas de membrana externa, pertenecientes a seis familias. Ellas incluyen el dominio de membrana OmpA, la proteína OmpX, fosfolipasa A, porinas generales (OmpF, PhoE), porinas -sustrato específico y los transportadores de sideróforos de hierro dependientes de TonB: FhuA y FEPA (69). Como las membranas son bastante impermeables a los solutos hidrofílicos, los canales formados por las porinas como OmpF facilitan la absorción de nutrientes y la excreción de productos de desecho tóxicos. Otros OMP que no funcionan como canales son capaces de actuar tanto como enzimas y adhesinas. En las bacterias patógenas y simbióticas, la membrana externa representa la superficie bacteriana que interactúa con el huésped eucariota, mientras que también acomoda muchas proteínas que tienen función directa en la virulencia bacteriana. Dada la importancia de la membrana externa, no es de sorprenderse que la expresión de los OMPs es ampliamente coordinado a nivel de la transcripción (68). Una de las funciones descritas para los sRNA es controlar la expresión de proteínas de membrana externa (OMP). Como se dijo anteriormente, estos sRNAs ejercen sus funciones bajo una variedad de condiciones de crecimiento y de estrés, incluyendo la respuesta al estrés sobre mediada por sigma (68). Las enterobacterias utilizan varios sRNA para afinar la composición de la membrana celular a nivel post transcripcional.

Las porinas OmpC y OmpF se encuentran entre las proteínas más abundantes que son translocadas a la membrana extracelular. De los dos, OmpC forma el poro más pequeño, y juega un papel predominante en condiciones donde nutrientes así como toxinas son abundantes, mientras que el poro más amplio, formado por OmpF, se piensa que es importante en condiciones de nutrientes limitantes y de bajos niveles de toxinas. La expresión de uno u otro depende en gran medida de las modificaciones post-traduccionales (70). La represión post-transcripcional de OmpF (por el RNA de MicF) ha sido recientemente asociado con OmpC través del descubrimiento de MIC.

Diversos estudios han llegado a la conclusión que la sobreexpresión de MicC reduce drásticamente los niveles de OmpC, mientras que una supresión cepa MicC produce el aumento de los niveles OmpC (70). Finalmente, se demostró que MicC inhibe la unión de la subunidad 30S del ribosoma para el ARNm de OmpC (70), lo que sugiere que MicC actúa impidiendo la iniciación de la traducción. El gen MicC está bien conservado entre las enterobacterias, y su

expresión está muy regulada. Curiosamente, los perfiles de expresión de MicC and MicF observados ante una variedad de condiciones de crecimiento mostraron una acumulación mutuamente excluyente de estos dos RNAs. Por lo tanto, el descubrimiento de Mic C añade otra capa a la expresión de la regulación de las porinas formadas por OmpC y OmpF. Con el reciente descubrimiento de nuevos sRNA que están involucrados en la regulación de OMP, está surgiendo una red en la que se ha visto que algunos sRNA actúan específicamente en un único RNAm OMP (micA y MicF), mientras que otros tienen múltiples objetivos (Mic C, OmrA, OmrB y RseX). Muchos OMPs juegan un papel vital para la supervivencia fuera de un huésped animal, pero también al funcionar como un epítipo expuesto en la superficie, pueden ser rápidamente reconocidos por el sistema inmune del huésped a la infección. Incluso dentro de un huésped, la expresión de una OMP dado puede ser un arma de doble filo para el patógeno.

La isla de patogenicidad de *Salmonella* (SPI - 1) codifica aproximadamente 35 proteínas implicadas en el montaje de un sistema de secreción de tipo III (T3SS), que dota a la *Salmonella* con la capacidad de invadir células eucariotas. En una nueva búsqueda global de sRNA de *Salmonella* se ha descubierto un gen del SPI-1, InvR (invasion gene-associated RNA), que se expresa en forma muy importante. Este gen es activado por el factor de transcripción de SPI-1, HilD, en condiciones que favorecen la invasión de la célula del huésped. Además de este factor, debe estar presente, estrictamente, la chaperona Hfq, quien le dará la estabilidad necesaria. Asombrosamente, la supresión / sobreexpresión de InvR no reveló ningún fenotipo en la regulación de SPI-1. Por el contrario, el InvR reprime la síntesis de la porina OmpD altamente conservada en *Salmonella*. InvR no parece estar involucrado en el sistema de secreción mediado por SPI-T3SS. En su lugar, InvR es un sRNA dependiente de Hfq - que actúa fuera de SPI-1 para regular la síntesis post transcripcional la proteína de membrana externa (OmpD).

Otro ejemplo del rol de los sARN en la patogenicidad de la *Salmonella*, es PinT. PinT es un sRNA de 80 nucleótidos de longitud ubicado en un locus específico de *Salmonella*, adquirido horizontalmente, que también codifica rtsA, un co-activador de pro-proteína de los genes de invasión. PinT fue seleccionado como un potencial factor de virulencia de *Salmonella* en los estudios exploratorios de todo el genoma mediante mutagénesis al azar (TraDIS) en cerdos y ganado bovino (71), dos modelos de salmonelosis. La combinación de varios enfoques permitió el descubrimiento de una función molecular de PinT como un factor controlador del momento de la expresión de genes de virulencia. En primer lugar, se ha utilizado la secuenciación de RNA seriados a lo largo de todo lo que dura la infección y, tomando como referencia una cepa  $\Delta$ pinT para infectar células HeLa. Esto permitió la predicción de que este sRNA reprime los genes de SPI-2 durante las etapas tempranas después de la invasión de la célula huésped. PinT

afecta la virulencia de la *Salmonella* mediante modificaciones post traduccionales, función que se observó en la investigación usando células HeLa; pero su impacto en el huésped es aparentemente a lo largo de toda la infección. La represión observada de SPI-2 mediada por PinT fue validado experimentalmente de forma independiente en diversos experimentos de expresión donde se vio que su regulación afecta el aparato de secreción y proteínas efectoras. Haciendo una secuenciación dual de RNA en las células de cerdos infectadas con *Salmonella* (un organismo en el que PinT es reconocido como un potencial factor de virulencia), también confirmó el efecto que tiene PinT en la represión de SPI-2 durante la infección de este patógeno. En segundo lugar, el perfil de mRNA sugirió que PinT actúa río arriba o *upstream* del factor de transcripción maestro de SPI-2, SsrB, sin afectar a su propio activador PhoP/Q o los genes que regulan la invasión celular, HilD. El complejo PhoP-PhoQ está involucrado en la adaptación cuando hay poco Mg<sup>2+</sup>, ion que la bacteria necesita para su supervivencia. En bajas concentraciones periplasmáticas de Mg<sup>2+</sup> PhoQ fosforila PhoPb, dando como resultado la expresión de los genes activados por PhoPb (PAG) y la represión de los genes reprimidos PhoPb (PRG). Cuando hay altas concentraciones de Mg<sup>2+</sup> circundante, PhoQ desfosforila a PhoPb, lo que resulta en la represión de PAG y puede conducir a la expresión de algunos genes reprimidos de PhoPb. En tercer lugar, se ha reconfirmado con éxito la represión de los genes SPI-2 mediada por Pin T bajo ciertas condiciones definidas in vitro (72). En conclusiones generales, durante la infección por *Salmonella* se induce la expresión de PinT, que controla temporalmente los genes de virulencia de este patógeno. En la internalización controla el SPI-1, en la infección reprime SPI-2, haciendo que pase de un estado invasivo a uno replicativo.

Dos de los sRNAs codificados en la isla de patogenicidad, IsrJ e IsrM, resultaron ser particularmente importantes para la proliferación de *Salmonella* dentro células no fagocíticas y/o macrófagos (73,74). IsrJ está regulado positivamente en condiciones que promueven la invasión de las células epiteliales y está regulado positivamente por HilA, el activador transcripcional central de SPI-1. La supresión de IsrJ resulta en una cepa mutante menos invasiva que se ve afectada por la translocación de la proteína efectora SptP, que se requiere para la remodelación del citoesqueleto de la célula huésped después de la entrada de la bacteria. (73,75). El mutante  $\Delta$ IsrM mostró un amplio defecto de virulencia: reducción de la invasión de las células epiteliales, menor replicación/supervivencia intracelular en macrófagos, y la reducción en el crecimiento en íleon y el bazo en ratones. La expresión post-transcripcional de IsrM reprime los factores de virulencia HilE y SopA. La mayoría de los genes de SPI-1 están regulados negativamente por HilE mediante el secuestro de HilD, el principal activador transcripcional de SPI-1, mientras SopA es una proteína secretada que está implicada en causar inflamación y por lo tanto diarrea (76,77).

AmgR es un transcripto antisentido de 1.2 Kb codificado en la cadena complementaria del operon mgtCBR. El gen mgtC codifica para una proteína necesaria para que *Salmonella* sobreviva dentro de los macrófagos en donde existe un ambiente con baja concentración de Mg<sup>2+</sup> y para su virulencia vista en ratones de experimentación (78). PhoQ es la quinasa del sistema regulador de dos componentes PhoPQ, que sensa bajos niveles de Mg<sup>2+</sup> y el regulador que responde a esto es PhoP, que induce la transcripción del operon mgtCBR. AmgR regula la expresión de mgtCBR mediante la desestabilización por una RNAasaE dependiente de los genes mgtC y mgtB. La RNAasa detecta la deshibridización del sRNA y lo degrada. Una cepa mutante para este sRNA (amgR) se ha encontrado más virulenta que el tipo salvaje o *wild type* en experimentos realizados en ratones. El gen amgR es dependiente de PhoP, el cual (PhoP) se une directamente con el promotor de amgR, llevando a la expresión de amgR en condiciones de baja concentración de Mg<sup>2+</sup>. Por lo tanto, la expresión de PhoP tiene un efecto aparentemente paradójico sobre la expresión del gen mgtC, porque al mismo tiempo PhoP activa mgtC y amgR y este último tiene un efecto represivo sobre mgtC. Este sistema regulador puede haber evolucionado para regular los niveles de este gen expresado en los momentos justos de la infección (79).

RpoS es un factor sigma alternativo ( $\sigma$ ) (80) que juega un papel clave en la infección por *Salmonella* y es requerido, por ejemplo, para la virulencia de *S. Typhimurium* (80,81). Específicamente, RpoS es importante para la persistencia en los órganos linfoides, tales como el bazo y el hígado, y para las etapas iniciales de la infección en murinos, visualizadas en placas de Peyer (81). RpoS también activa los genes spvR y spvABCD que son genes llevados por plásmidos, necesarios para el crecimiento intracelular y infección sistémica en ratones y humanos. En *E. coli*, la traducción de RpoS es reprimida por OxyS (80) y el factor sigma es regulado positivamente por sRNA dependiente de Hfq, a saber DsrA, ArcZ y RprA, que actúan aliviando la inhibición de la estructura secundaria que impide la traducción de RpoS (82-84).

### **Comparación entre especies**

*Salmonella* es el patógeno que presenta el mayor número de reguladores dependientes de Hfq, muchas de las cuales involucran proteínas, factores de transcripción y genes de respuesta al estrés (85). Sin embargo, mutaciones en el gen hfq perjudican la virulencia de varias otras bacterias (16). Más aún, aunque la regulación por Hfq dependiente de RNA pequeños se ha adjudicado por tiempo solamente a las bacterias Gram-negativas, ha sido descubierta también en las Gram-positivas como *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, etc. (86). Los sRNAs son encontrados de manera abundante en casi todas las especies de procariotas, han sido

identificados en la mayoría de las bacterias y también en varias especies del dominio Archea (87). Hoy se sabe que la regulación por sRNAs es global en procariotas. Más de 10 pequeños RNA en *E. coli* y *Salmonella* se conservan en otras enterobacterias patógenas (88).

### Aureus

La alta capacidad de infección de *S. aureus* depende de la producción de muchos factores de virulencia y de elementos reguladores, incluyendo algunas proteínas reguladoras de la transcripción, sistemas de dos componentes, y otros reguladores (89,90). Como ejemplo de sRNA, uno de los reguladores más importantes es el complejo Agr/ARN III. Cerca de unos cien nuevos sRNAs se han encontrado en *S. aureus* en los últimos años por análisis computacional o experimental (91-93).

Un nuevo sRNA fue más recientemente descubierto y estudiado, se le llamó ArtR y se encontró que era reprimido por el regulador transcripcional AgrA. Se demostró que AgrA puede unirse al promotor de ArtR, y se confirmó que AgrA puede reprimir la transcripción de ArtR. La supresión de Hfq no afectó la transcripción de ArtR, y la proteína Hfq no podía unirse al transcripto de ArtR in vitro, lo que indica que Hfq no tiene ninguna influencia sobre la estabilidad o el funcionamiento del ArtR. Además, se demostró también que ArtR está implicado en la regulación de la virulencia de varios estafilococos. La supresión de ArtR da lugar a una disminución de la  $\alpha$  (alfa) toxina (94).

### Pseudomona

El desarrollo del biofilm por especies de *Pseudomona*, el elemento principal de adaptación a fenotipos de infección aguda o crónica, requiere reguladores globales y de pequeños ARNs no codificantes (95). El sistema de CSR / Rsm es un sistema de regulación que se compone de los reguladores y sRNAs que regulan la expresión de genes post-transcripcionales globales de unión a RNA. El sistema de CSR / Rsm, conservado en bacterias Gram-negativas y positivas, puede afectar tanto positiva como negativamente en la abundancia de más del 20% de todo el ARNm, y controla una gran variedad de procesos fisiológicos (96,97). RsmA, un miembro de la extensa familia de homólogos de CsrA descritos en primer lugar en *E. coli*, es un regulador de unión al RNA que tiene efecto en hasta un 9% de los ARNm del genoma de *Pseudomona aeruginosa* (98). RsmA reprime regulones o *regulons* necesarios para el establecimiento de infecciones crónicas, incluyendo los sistemas de secreción tipo VI (T6SS), la producción de exopolisacáridos, la formación de biofilm, y la homeostasis del hierro (98, 99).

## Enterobacterias

Tanto MicA como RybB están conservados en todas las enterobacterias. InvR se encuentra solo en los serotipos de *Salmonella*, *typhimurium* y *bongori*. *rseX* no está presente en *Yersinia*, *Erwinia* y *Klebsiella*, así como *omrB* y *MicC*, tampoco se presentan en *Yersinia*, pero sí en *Klebsiella*, y también faltan en *Serratia*. Ambos no están presentes en *Photobacterium luminescens*. *OmrA* falta también en este, estando presente en todas las demás enterobacterias. *MicF* no se conserva en *Erwinia* ni en *P. luminescens* (68) (Figura 1).

	<i>micA</i>	<i>micC</i>	<i>micF</i>	<i>omrA</i>	<i>omrB</i>	<i>rseX</i>	<i>rybB</i>	<i>invR</i>
<i>Escherichia coli</i> K12	■	■	■	■	■	■	■	□
<i>Shigella flexneri</i>	■	■	■	■	■	■	■	□
<i>Salmonella typhimurium</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Salmonella bongori</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Yersinia pestis</i>	■	□	■	■	□	□	■	□
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	■	□	■	■	□	□	■	□
<i>Erwinia carotovora</i>	■	□	□	■	□	□	■	□
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	■	■	■	■	■	□	■	□
<i>Serratia marcescens</i>	■	□	■	■	□	■	■	□
<i>Photobacterium luminescens</i>	■	□	□	□	□	■	■	□
<i>Citrobacter rodentium</i>	■	■	■	■	■	■	■	□

Current Opinion in Microbiology

**Figura 1.** Conservación de genes que codifican pequeños RNA reguladores de OMP en enterobacterias seleccionadas. La presencia o ausencia de un determinado gen de RNA pequeño es indicado con espacios llenos o vacíos respectivamente (tomado de 68).

Como ejemplo de regulación sobre el metabolismo, tenemos el caso de RyhB. La proteína Fur reprime, bajo condiciones de suficiencia de hierro, a una gran cantidad de genes cuya función es la de capturar y transportar hierro al interior de la célula. Se sabe que existe un sRNA, RyhB, que está muy conservado en *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio* y *Yersinia*, el cual es regulado negativamente por Fur, pero que en condiciones de escases de hierro se produce y aparece con los mRNAs de *sodB* y *sdh*, provocando la degradación de los mismos, reduciendo de este modo los requerimientos de hierro de la célula (100). En este ejemplo se observa como un mismo sRNA puede aparearse con diferentes mRNAs de modo de concertar la expresión de los mismos bajo diferentes condiciones metabólicas. En *P. aeruginosa* se han encontrado otros dos sRNAs llamados Prr1 y Prr2 que funcionan de manera similar, aunque no presentan homología alguna con RyhB (101).

Ciertas condiciones de estrés o crecimiento requieren el aumento o descenso de la expresión de ciertos cistrones individuales, así la coordinación de la expresión de un operón completo (102). El operón *glmUS* de *E. coli* codifica enzimas de la ruta de síntesis del amino azúcar para GlcN (glucosamina), y su derivado GlcNAc (N-acetilglucosamina). Estos amino azúcares son precursores de la síntesis de peptidoglicano y lipopolisacáridos, componentes esenciales de la pared de las bacterias Gram negativas. GlmS es una sintasa de GlcN que convierte fructosa 6 fosfato en GlcN fosfato usando glutamina como donante de amino. GlmS se vuelve esencial cuando GlcN 6 fosfato es sintetizado a partir de fructosa y glutamina cuando los amino azúcares externos son escasos. El operón de *GlmUS* es transcripto de dos promotores que están localizados arriba de *GlmU* (103). El sRNA *GlmY*, aumenta la síntesis de GlmS interactuando con el ARNm de *glmUS* sin alterar la expresión de *GlmU*. La sobreexpresión de *GlmY* lleva a la acumulación de GlmS (105). Este sRNA, y probablemente su función, es conservadas en la familia Enterobacteriaceae y en diversas bacterias Gram negativas (104). Genes de *GlmY* fueron encontrados en *Yersinia*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Photobacterium* (106). Podemos citar algunos otros ejemplos de non coding en varias bacterias, como es el ARNIII que fue descrito originalmente como el ARNm de hemolisina *g* de *Staphylococcus aureus*. Análisis moleculares subsecuentes revelaron que además de expresar hemolisina desde la región 5' el ARNIII actúa como un regulador antisentido de la virulencia y de la síntesis de las proteínas de superficie, interaccionando en su región 3' (12).

Otros ejemplos son *SprD*, que reprime el factor de evasión inmune *Sbi* (107), *FasX*, que aumenta la interacción de *S. pyogenes* con las células epiteliales, y *RivX* que regula la expresión de factores de transcripción de virulencia. También *VrrA* (*Vibrio regulatory RNA of ompA*) tiene papel en la síntesis de vesículas de membrana en *Vibrio cholerae*. *VrrA* regula positivamente la producción de vesículas de la membrana externa a través de la regulación en menos de la proteína de membrana *OmpA*. La inactivación de *VrrA* resulta en un aumento de la colonización por *V. cholerae* en ratones (108).

Se han encontrado varios sRNA en cianobacterias del linaje *Prochlorococcus/Synechococcus*. Algunos están presentes en solo dos o tres de las especies investigadas, mientras que *Yfr7* por ejemplo, está presente en al menos siete especies. 4 cianobacterias del género *Prochlorococcus*, cepas MED4, MIT 9313 y SS120, y *Synechococcus* WH 8102 fueron estudiados mediante geles de policrilamida de alta resolución para estudiar la presencia de ARNs pequeños (109).

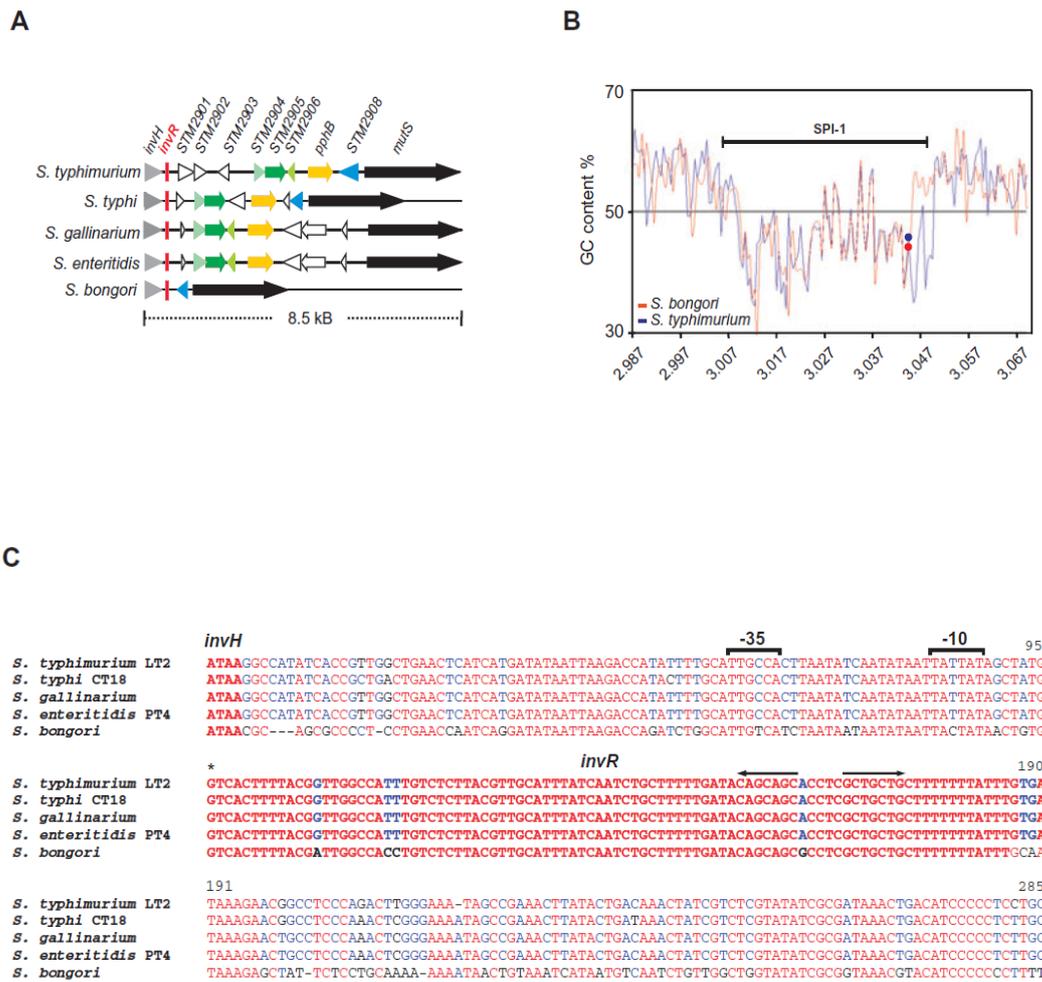
*Yfr1* fue detectado en 3 de las 5 cianobacterias estudiadas, MED4, MIT 9313 y WH 8102. Comparado con otros sRNA, *Yfr1* es uno de los más cortos, con una longitud de solo 54nt (110,111). Aunque la información acerca de RNA en cianobacterias es escasa (112), se sabe que la vida media de *Yfr1* es extremadamente estable, durando más de 60 minutos, mientras que la

vida medias de los ARNm es frecuentemente de unos pocos minutos (113). Existe una familia de RNAs estructuralmente similares (Yfr2, Yfr3 y Yfr4) que puede ser ejemplo para demostrar el grado de conservación de los RNAs, viendo al mismo tiempo que no se localizan en la misma posición del genoma. Los sRNA Yfr2-4 en MED4 y sus homólogos en otros genomas están codificados por locis distantes y la posición de los genes (con respecto a los genes adyacentes) no es fija, ni siquiera en los 5 genomas cercanamente relacionados que se han investigado (113).

### **sRNA en *Salmonella* y las variantes de los serotipos**

Los sRNAs en *Salmonella* se han descubierto de forma relativamente reciente, y se ha obtenido relevante información acerca de sus funciones, descubriendo que son claves en algunos casos a través de su regulación de la expresión de algunos genes (ver arriba). Conocer como varía la composición y expresión de los distintos sRNAs entre diferentes serotipos de *Salmonella* nos ayudará a responder ciertas preguntas en relación a como por ejemplo las bases genéticas de las diferencias que existen entre aquellas cepas virulentas y las que no lo son.

Como se mencionó mas arriba, existen genes muy conservados que expresan pequeños ARN no codificantes que no varían entre los serotipos. El gen InvR que se encuentra dentro de SPI-1 es un ejemplo de ellos. InvR a través de su expresión reprime la síntesis de la porina OmpD. Es activado por un factor de transcripción, HilD en condiciones que favorecen a la invasión de la célula huésped. El gen InvR se identificó por primera vez utilizando un estudio biocomputacional en *S. Typhimurium*. Entre los candidatos que aparecieron, muchos parecen ser conservados, apareciendo temprano en el linaje de *Salmonella*. Observando y comparando la localización genómica de estos genes candidatos con las coordenadas de regiones de virulencia de *Salmonella* (115) (McClelland et al., 2001) se reveló una superposición de candidato STnc270 (InvR) con la isla SPI-1 (Figura 2A y B). El gen InvR reside entre los genes de invH y STM2901, y se codifica en la misma cadena como estos dos últimos genes (Figura 2A). Un promotor de tipo *s70* se predijo aproximadamente 70 pb. aguas abajo del codón de parada de invH; este promotor es seguido de cerca por una repetición invertida de 7 pb y un tramo de Ts, característica de la transcripción de terminadores p-independiente (Figura 2C). Estas características se conservan en genes InvR de otras cepas de *Salmonella* para los cuales secuencias del genoma están disponibles. (Figura 2C) (114).



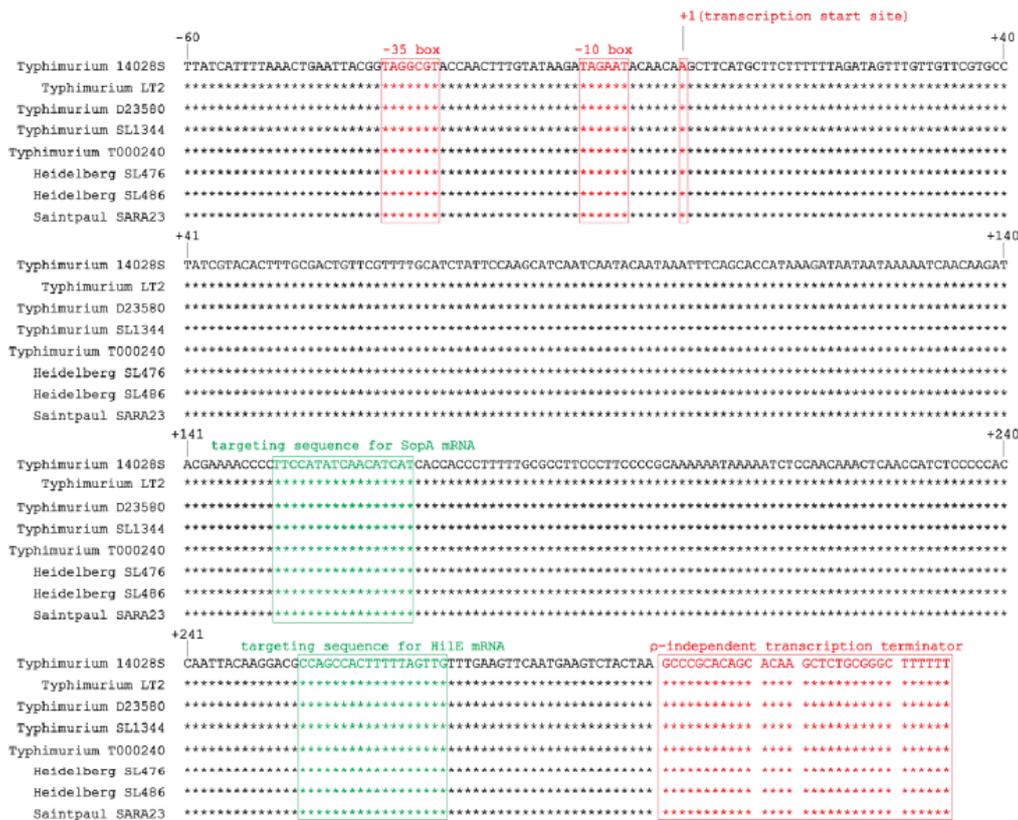
**Figura. 2.** La identificación del gen InvR (sRNA) en SPI-1. **A.** Estructura mosaico del borde derecho de la region SPI-1 (invH-mutS región) en diversas cepas de *Salmonella*. Las esquemas se derivan de la secuencia de todo el genoma de *S. Typhimurium* LT2 (nº de acceso: CN 003197), *S. Typhi* CT18 (CN 003198), *S. Gallinarium* 287/91 (NCTC 13346), *S. Enteritidis* PT4 (NCTC 13349) y *S. bongori* (ATCC 12419 43975). Genes ortólogos se indican con el mismo color. **B.** El gen InvR comparte el bajo contenido GC de la región de virulencia SPI-1. El contenido GC desde la región genómica de ygbD a PCM en *S. Typhimurium* LT2 (azul) y en *S. bongori* (rojo). La región SPI-1 de FlhA a mutS está indicado por una barra horizontal. El loci de InvR *S. Typhimurium* y *S. bongori* se indican con puntos azul y rojo, respectivamente. Genoma coordinadas (2,987 a 3,067 Mb) se refieren a la anotación LT2. **C.** Alineación (obtenida mediante el programa MultAlin) de la región invH y InvR en varias especies de *Salmonella* [mismos números de acceso como en (A)] muestran la fuerte conservación del gen InvR. Residuos 3' de la región codificante invH y la secuencia de InvR se establecen en negrita. Sobre la secuencia se indican las cajas del promotor InvR (-10 y -35). El sitio de inicio de transcripción de InvR se denota por un asterisco. La estructura de tallo del terminador r-independiente de INVR se indica mediante flechas (adaptado de 114).

Hay pruebas que sugieren que InvR es una “antiguo” gen, adquirido por transferencia horizontal junto a la región de virulencia SPI-1 en una etapa temprana de la evolución de *Salmonella* (116). SPI-1 tiene un contenido de G + C (47%) promedio significativamente más bajo que el

núcleo conservado del genoma de *Salmonella* (52%), y el gen *InvR* comparte este bajo contenido de región G + C (39,6%) (Figura 2B). La evolución de *Salmonella* dio como resultado una estructura de mosaico en el límite derecho de SPI-1 (*invH-mutS*). Sin embargo, las inserciones/deleciones ocurridas en la región no afectaron a *InvR*, ni su estrecha asociación con *invH* (Figura 2A) (114). Como se mencionó anteriormente, *InvR* es co-regulado por otros genes SPI-1 y estrictamente requiere al gen *HilD*, el factor de transcripción que actúa en la parte superior de la jerarquía transcripcional de SPI-1 (117). *HilD* no es conocido para controlar los genes fuera de SPI-1, excepto *RTSA* (118). Por lo tanto, la localización genómica, la conservación y la regulación apoyan la idea de que *InvR* fue adquirido junto con SPI-1 muy temprano en la evolución del linaje *Salmonella* luego (poco después) de la divergencia de la *E. coli*. La secuencia *InvR* parece ser más conservada que sus límites (Figura 2C), lo que sugiere que *InvR* y su secuencia se mantiene gracias a la selección negativa o purificadora y por lo tanto que es un gen funcional e importante, lo que de alguna manera es sorprendente dado la falta de evidencia de que las funciones de *InvR* están implicadas en la secreción por el SPI-1 del T3SS (118).

El gen que codifica el sRNA *IsrM* no se encuentran en la *Samonella bongori* pero si puede encontrarse en varios serotipos de *Salmonella enterica*, tales como Typhimurium, pero no otros serotipos, como Typhi (Figura 3). Actualmente no está claro por qué *IsrM* se encuentran en algunos, pero no otros serotipos de *Salmonella*, aunque es posible que la presencia de *IsrM* en un serovar específico pueda estar relacionada con la patogénesis única del serovar y/o con un hospedero en particular (74). *IsrM* dirige a los ARNm que codifican para *SOPA*, un efector de SPI-1, e *HILE*, un regulador global de la expresión de SPI-1, que son los principales factores de virulencia esenciales para la invasión bacteriana. Las mutaciones en *IsrM* dan como resultado la desregulación de la expresión de *HILE* y *SOPA*, así como otros genes de SPI-1 cuya expresión está regulada por *HILE*. Cepas de *Salmonella* con la supresión de *IsrM* tienen defectos en la invasión de células epiteliales, en la replicación intracelular y en la supervivencia en macrófagos. Por otra parte, la salmonella con mutaciones en *IsrM* aumenta la supervivencia de animales y el crecimiento de las mismas es defectuoso en el íleon y el bazo en ratones (74).

Un artículo publicado en el 2010 nos habla sobre un estudio experimental realizado que identificó y caracterizó 97 nuevos ARNs no codificantes en *Salmonella enterica* serovar Typhi. Tres son específicos para *S. Typhi*, 22 eran restringidas a *Salmonella* y 33 eran diferencialmente expresados durante el crecimiento de *S. Typhi* (119). El descubrimiento de la expresión diferencial de algunos tipos de ARN no codificantes fue la base para su posible utilización como marcadores en la práctica clínica, de manera de posibilitar una diferenciación entre las diferentes cepas patógenas que causan salmonelosis y poder desarrollar una vacuna eficaz.



**Figura 3.** Alineación de las secuencias IsrM de diferentes cepas de *Salmonella*, incluyendo la región promotora hacia arriba, sobre la base de búsquedas BLAST de las secuencias IsrM en GenBank. Los sitios de inicio de la transcripción - 10 boxes - 35 boxes-, y terminadores de la transcripción de los genes IsrM están en boxes y de rojo. Las secuencias de expresión para sopa e hile mRNA que fueron identificados en este estudio están en boxes y en verde (74).

En esta idea se centró un estudio publicado en el 2015. Formularon una estrategia de detección y diferenciación de salmonelosis mediante una “multiplex” PCR usando los genes de ARN no codificante pertenecientes a serotipos diferentes. Se seleccionaron tres genes codificantes para sRNA, *Styr-3*, *styr-36*, *styr-143*, para el diseño de cebadores o “primers” de la PCR. *StyR-3* (GenBank N° Acc.: FJ746361.1) (119) es un gen con un promotor-sRNA asociado que es cotranscrito con el gen *RamA* (que media la resistencia a múltiples fármacos) y se solapa con el sitio de unión ADN del represor *RamR*. Mediante análisis bioinformáticos se ha demostrado que el gen *styr-3* (144-nt) esta presente en todas las cepas de *Salmonella*. Por otro lado, *StyR-36* (175 nt) está presente sólo en *S. Typhi* y está situado entre los nucleótidos 2.746.553 y 2.746.379, en el genoma de *S. Typhi* Ty2. Este sRNA se superpone en la región 5'-UTR con el gen que codifica para una proteína hipotética t2658 (120). La detección de *styr-36* en el ensayo mediante mPCR indica específicamente la infección por *S. Typhi*. El tercer candidato de los biomarcadores analizados en este estudio fue *Styr-143* (144 nt) (GenBank N° Acc: FJ746389.1)

(119), que estaría presente tanto en *S. Typhi* como en *S. Paratyphi A*. Styr-143 es un gen antisentido ubicado en el extremo 3' del marco de lectura abierto (ORF) codificante para la proteína hipotética t4293 (121).

La amplificación por PCR del producto 475bp que corresponde al gen styr-3 indica la presencia de *Salmonella* especies dentro de la muestra, mientras que la detección de la banda styr-143 (304bp) demuestra la presencia de *S. typhi* y/o *S. paratyphi A*. *S. typhi* se puede identificar específicamente a través de un producto de 204bp, que se amplifica a partir del styr-36 ya que es *S. typhi* específico. La estrategia propuesta para la diferenciación de *S. typhi* y *S. paratyphi A* se basa en el hecho de que las bandas de styr-3, Styr-143 y styr-36 deben detectarse en muestras infectadas con *S. typhi* (475bp, 304bp y 204bp bandas, respectivamente). Sin embargo, en el caso de *S. paratyphi A* la infección, sólo las bandas de 475bp (styr-3) y 304bp (styr-143) deben ser observadas (121).

Se ha probado la especificidad del ensayo mPCR mediante el examen de un total de 37 cepas bacterianas (Tabla 3). Se encontró que el ensayo de PCR amplificó con éxito el ADN de todas las cepas de *Salmonella* ensayadas (carriles 1 a 24, Fig. 5), lo que se detecta a través de la presencia del gen Styr-3 (475bp) específico de las especies de *Salmonella*. Por otra parte, las infecciones por *S. Typhi* se detectaron específicamente a través de la amplificación del producto de 204 pb del gen styr-36 (carriles 5 y 15, Fig. 5). El gen StyR-143 producto de PCR (304bp) estaba presente en ambos *S. Typhi* y *Paratyphi A*. (121).

Por lo tanto, la amplificación del gen styr-143 indica infección con *S. Typhi* y/o *S. paratyphi A* (carriles 5, 10, 15, y 20; Fig. 5). Por esta razón, la amplificación tanto styr-36 y Styr-143 puede distinguir *S. Typhi* y muestras infectadas *S. paratyphi A*. (121).

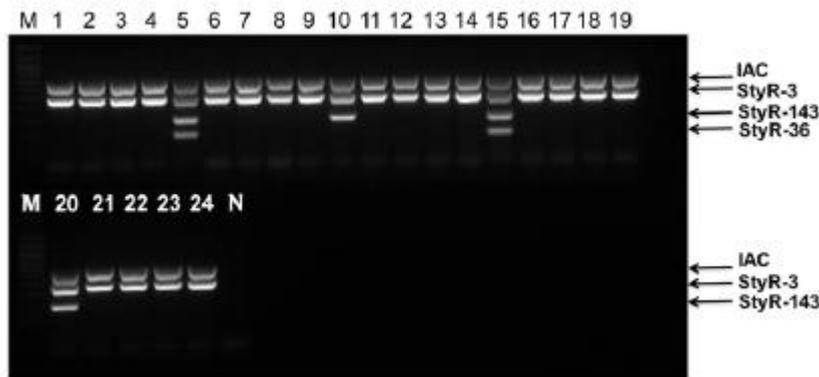
Se experimentó utilizando muestras fecales, para valorar la reproducibilidad de esta técnica en la práctica clínica observándose resultados significativos que avalan la utilidad de la amplificación por PCR de los ARN no codificantes mencionados anteriormente para diferenciar los agentes etiopatogenicos de salmonelosis en humanos (121).

Table 3. Bacterial samples used for the evaluation of primer specificity in the mPCR assay and the results.

Bacterial sample	sRNA genes		
	StyR-3	StyR-143	StyR-36
<b><i>Salmonella enterica</i> Serovar</b>			
Pulitorum	+	-	-
Jawa	+	-	-
Kedougou	+	-	-
Mikawashima	+	-	-
Typhi	+	+	+
Giva	+	-	-
Hadar	+	-	-
Corvallis	+	-	-
Rissen	+	-	-
Paratyphi A	+	+	-
Barilly	+	-	-
Newport	+	-	-
Agona	+	-	-
Tennessee	+	-	-
Typhimurium	+	-	-
Waikareden	+	-	-
Enteritidis	+	-	-
Albany	+	-	-
Paratyphi B	+	-	-
Paratyphi C	+	-	-
Beuenderup	+	-	-
Infantis	+	-	-
<b>Non-salmonella species</b>			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	-
<i>Aerobacter baumannii</i>	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Providencia</i> spp	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-

+ presence,  
- absence

Table 1. Genes de ARN no codificantes como nuevos marcadores diagnóstico de discriminación entre los serotipos de *Salmonella* usando PCR. Representa el primer ejemplo de la aplicación del estudio de la variabilidad a nivel de la presencia ausencia de sRNAs en serotipos de *Salmonella* en la práctica clínica. Este es un primer paso simple pero útil para empezar a investigar sobre la función de los mismos y su posible rol biológico en la virulencia diferencial de distintos serotipos (Tomada de 121).



**Fig 5.** Representación en gel de agarosa de los productos de mPCR amplificados utilizando ADN genómico de Salmonella: Carril M : escalera de 100 pb., carril N : Control negativo , carril 1 : *S. pullorum* , carril 2 : *S. Jawa* , carril 3: *S. Kedougou* , carril 4 : *S. Mikawashima* , carril 5 : *S. Typhi* , carril 6 : *S. Dale* , carril 7 : *S. Hadar* , carril 8 : *S. Corvallis* , carril 9 : *S. Rissen* , carril 10: *S. paratyphi A*, Carril 11 : *S. Bareilly* , carril 12: *S. Newport* , carril 13: *S. Agona* , carril 14: *S. Tennessee* , carril 15: *S. Typhi* , carril 16: *S. Typhimurium* , carril 17: *S. Weltevreden* , carril 18: *S. Enteritidis* , carril 19: *S. Albany* , carril 20: *S. paratyphi A* , carril 21: *S. paratyphi B* , carril 22: *S. paratyphi C* , carril 23: *S. Braenderup* , carril 24: *S. Infantis* (Tomado de 121).

### **Discusión de resultados comparativos.**

Se discutirá sobre los resultados de los análisis comparativos generados y brindados al grupo por el Orientador, Dr. Iriarte. En el análisis comparativo se compararon los genomas de las especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* disponibles actualmente en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Dentro de *S. enterica* se analizan de forma independiente las subespecies, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* y los serotipos de *Salmonella enterica* subespecie entérica (N 95 serotipos). El análisis comparativo parte de 282 sRNAs descritos en *Typhimurium*, y mediante búsquedas por identidad de secuencias se identifican los sRNAs presentes en cada genoma. Esta búsqueda tiene sentido sobre la base de la alta identidad de secuencia reportada, que presentan estos genes en este género. Se discuten en el grupo los resultados que se muestran en la tabla comparativa y se sacan algunas conclusiones primarias.

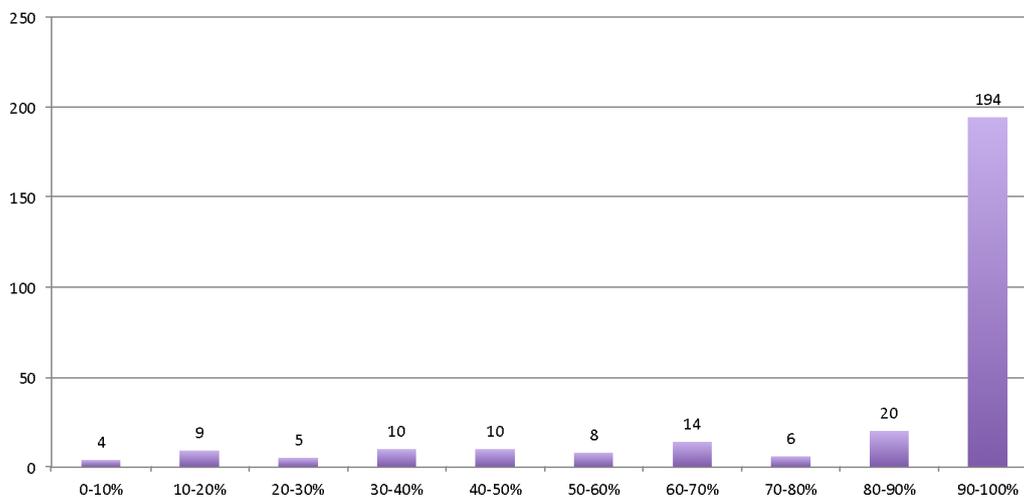
Es interesante desde el punto de vista evolutivo saber que sRNAs son compartidos y se conservan entre los genomas porque tiene importancia desde el punto de vista funcional y estructural de las bacterias. Si se conservan en todas ambas especies se sugiere una relevancia funcional, lo que significa que cumple un rol muy importante y determinante en la célula.

Utilizamos como límite mínimo de conservación un valor mayor o igual a 0,5. Lo primero que identificamos son los sRNAs que se comparten entre las especies *S. bongori* y *S. entérica* para lo que utilizamos la tabla de frecuencias y funciones estadísticas de Excel.

Concluimos que 139 sRNAs aparecen como conservados, lo que implica una conservación de 49,2% de los sRNAs analizados. Podemos asumir entonces desde el punto de vista evolutivo que la el ancestro comun del genero *Salmonella*, que dio lugar a los linajes de *S. bongori* y *S. entérica* ya los presentaba. Mediante esta teoría de conservación podemos inferir sobre la importancia de la función de estos ARNs, ya que, si fueran suficientemente importantes, la bacteria en su evolución los hubiese eliminado en alguno de los linajes. Es esperable que, como se ha demostrado en varios trabajos (ver arriba), varios de estos genes esten conservados en *E. coli* y otras enterobacterias.

De los sRNA que están presentes en *S. entérica* y no están en *S. bongori* podemos concluir que aparecieron, es decir fueron adquiridos por transferencia horizontal en el linaje *S. enterica*, o desaparecieron, fueron perdidos en el linaje de *S. bongori*, en procesos evolutivos secundarios, luego de la separación linaje. En este caso estos serian genes denominados linaje-especificos.

Comparando las subespecies *houtenae*, *arizonae*, *salamae*, *diarizonae* e *indica* concluimos que de los restantes sRNA, se comparten entre ellas 117 con una frecuencia mayor a 0,5. El resto de los sRNAs tienen un comportamiento variable entre las subespecies y entre los serotipos dentro de *S. enterica*.



**Figura 6.** Distribución de la conservación de los 280 sRNAs analizados. 194 sRNA aparecen altamente conservados, localizándose en entre 90 y 100% de los grupos analizados. Se considera que un sRNA está presente en el grupo si se encuentra en más del 20% de los genomas analizados del grupo. 4 sRNAs aparecen como grupo-específico, identificándose en menos del 10% de los grupos analizados.

Luego estudiamos la frecuencia de aparición de los sRNAs en los distintos serotipos de *S. enterica* (Figura 6). 194 sRNAs están presentes (>20% de los genomas de cada serotipo

estudiado) en 90 o más de los serotipos estudiados. Por lo tanto, podemos inferir que probablemente tengan un rol conservado e importante en la sobrevivencia de todos los serotipos. 4 sRNAs están presentes en menos del 10% del total de los serotipos analizadas, lo que sugiere un rol serotipo-específico. Estos sRNAs pueden ser interesantes para estudiar pues podrían asociarse con las características diferenciales de virulencia, patogenicidad y adaptación al medio ambiente de serotipos específicos. IsrM aparece como uno de los 4 sARN presentes en menos del 10% del total de sub especies. Por ejemplo, se encuentra en *S. Typhimurium* pero no en *S. Typhi*, esto resulta interesante al considerar que IsrM juega un rol fundamental en la invasión de células epiteliales y la replicación intracelular dentro de los macrófagos huéspedes.

### **Conclusión**

Resultó interesante, estudiar que, la regulación genómica no solo está dada por la transcripción y traducción del ARN, sino que existen nuevas evidencias que involucran regulaciones a nivel posttranscripcional del genoma. En este trabajo específicamente nos enfocamos en los sRNAs, recientemente descubiertos en bacterias. Teniendo en cuenta la prevalencia epidemiológica, la gravedad potencial que pueden causar algunas de las cepas más virulentas de *Salmonella* y la carencia de vacunas activas, nos parece importante tomar a este patógeno como referencia. Sabemos que existe una diferencia en la virulencia de las distintos serotipos y subespecies dentro de *Salmonella enterica*. Esta diferencia puede estar relacionada con la expresión de determinados sRNAs. A partir de este descubrimiento en bacterias, se ha comenzado a profundizar los estudios sobre los sRNAs en eucariotas, lo cual tendría, en un futuro, posibles implicancias médicas, en cuanto a que, controlando la regulación de expresión de estos ARNs no codificantes se podrían descubrir nuevas armas diagnósticas y terapéuticas.

### **Referencias bibliográficas**

1. Papenfort K, Vogel J. Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*. 2010 Jul 22;8(1):116–27.
2. Huang Y, Zhang JL, Yu XL, Xu TS, Wang ZB, Cheng XC. Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochemistry* . 2013 Mar;78(3):221–30.
3. Kugel JF, Goodrich JA. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochem Sci*. 2012 Apr;37(4):144–51.
4. Chinen M, Tani T. Diverse functions of nuclear non-coding RNAs in eukaryotic gene expression. *Front Biosci* . 2012 Jan 1;17:1402–17.
5. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):219–30.
6. Lejeune E, Allshire RC. Common ground: small RNA programming and chromatin modifications. *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Jun;23(3):258–65.
7. Mattick JS. The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genet*. 2009 Apr;5(4):e1000459.
8. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem*. 2011 Mar;67(1):129–39.

9. Tang F. Small RNAs in mammalian germline: Tiny for immortal. *Differentiation*. 2010 Mar;79(3):141–6.
10. Arnvig K, Young D. Non-coding RNA and its potential role in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *RNA Biol*. 2012 Apr;9(4):427–36.
11. Bette S, Unger T, Lakowa N, Friedrich M, Engele J. Sequences of the non-coding RNA, NTAB, are contained within the 3'-UTR of human and rat EAAT2/GLT-1 transcripts and act as transcriptional enhancers. *Cell Mol Neurobiol*. 2011 Apr;31(3):393–9.
12. Chevalier C, Boisset S, Romilly C, Masquida B, Fechter P, Geissmann T, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of *coa* mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog*. 2010 Mar;6(3):e1000809.
13. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J*. 1993 Oct;12(10):3967–75.
14. Livny J, Waldor MK. Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Curr Opin Microbiol*. 2007 Apr;10(2):96–101.
15. Sharma CM, Vogel J. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Oct;12(5):536–46.
16. Chao Y, Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2010 Feb;13(1):24–33.
17. Lucchetti-Miganeh C, Burrowes E, Baysse C, Ermel G. The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology*. 2008 Jan;154(Pt 1):16–29.
18. Roth A, Breaker RR. The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:305–34.
19. Klinkert B, Narberhaus F. Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Aug;66(16):2661–76.
20. Ali Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol*. 1999 Oct;181(20):6361–70.
21. Kajitani M, Kato A, Wada A, Inokuchi Y, Ishihama A. Regulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene encoding the host factor for phage Q beta. *J Bacteriol*. 1994 Jan;176(2):531–4.
22. Franze de Fernandez MT, Hayward WS, August JT. Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem*. 1972 Feb 10;247(3):824–31.
23. Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature*. 1968 Aug 10;219(5154):588–90.
24. Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol*. 2004 Mar;51(6):1525–33.
25. Sigle-Rushton W, McLanahan S. The living arrangements of new unmarried mothers. *Demography*. 2002 Aug;39(3):415–33.
26. Leininger MM. Looking to the future of nursing and the relevancy of Culture Care theory. *NLN Publ*. 1991 Nov;(15-2402):391–418.
27. Møller T, Franch T, Højrup P, Keene DR, Bächinger HP, Brennan RG, et al. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell*. 2002 Jan;9(1):23–30.
28. Kawamoto H, Koide Y, Morita T, Aiba H. Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol Microbiol*. 2006 Aug;61(4):1013–22.
29. Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell*. 2002 Jan;9(1):11–22.
30. Mikulecky PJ, Kaw MK, Brescia CC, Takach JC, Sledjeski DD, Feig AL. *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, *rpoS* and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Dec;11(12):1206–14.
31. Lease RA, Woodson SA. Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J Mol Biol*. 2004 Dec 10;344(5):1211–23.

32. Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol.* 2003 Nov;50(4):1111–24.
33. Urban JH, Vogel J. Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLoS Biol.* 2008 Mar 18;6(3):e64.
34. Vytvytska O, Moll I, Kaberdin VR, von Gabain A, Bläsi U. Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev.* 2000 May 1;14(9):1109–18.
35. Hajnsdorf E, Régnier P. Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 15;97(4):1501–5.
36. Mohanty BK, Maples VF, Kushner SR. The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2004 Nov;54(4):905–20.
37. Muffler A, Fischer D, Hengge-Aronis R. The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 1996 May 1;10(9):1143–51.
38. Brown L, Elliott T. Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene. *J Bacteriol.* 1996 Jul;178(13):3763–70.
39. Sharma AK, Payne SM. Induction of expression of *hfq* by *DksA* is essential for *Shigella flexneri* virulence. *Mol Microbiol.* 2006 Oct;62(2):469–79.
40. Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger K-E, et al. Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog.* 2003 Nov;35(5):217–28.
41. Christiansen JK, Nielsen JS, Ebersbach T, Valentin-Hansen P, Søgaaard-Andersen L, Kallipolitis BH. Identification of small Hfq-binding RNAs in *Listeria monocytogenes*. *RNA.* 2006 Jul;12(7):1383–96.
42. Ding Y, Davis BM, Waldor MK. Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol.* 2004 Jul;53(1):345–54.
43. Nakao H, Watanabe H, Nakayama S, Takeda T. *yst* gene expression in *Yersinia enterocolitica* is positively regulated by a chromosomal region that is highly homologous to *Escherichia coli* host factor 1 gene (*hfq*). *Mol Microbiol.* 1995 Dec;18(5):859–65.
44. Alabama Insurance Report. 1970.
45. Robertson GT, Roop RM Jr. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol.* 1999 Nov;34(4):690–700.
46. Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 2007 Jan;63(1):193–217.
47. Figueroa-Bossi N, Lemire S, Maloriol D, Balbontín R, Casadesús J, Bossi L. Loss of Hfq activates the sigmaE-dependent envelope stress response in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2006 Nov;62(3):838–52.
48. Wilson JW, Ott CM, Höner zu Bentrup K, Ramamurthy R, Quick L, Porwollik S, et al. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 9;104(41):16299–304.
49. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005 Sep 15;437(7057):376–80.
50. Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol.* 2007 Mar;5(3):e16.
51. Lee CA, Falkow S. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jun;87(11):4304–8.
52. Garcia-Vallve S, Guzman E, Montero MA, Romeu A. HGT-DB: a database of putative horizontally transferred genes in prokaryotic complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):187–9.
53. Ammirati M, Mirzai S, Samii M. Transient mutism following removal of a cerebellar tumor. A case report and review of the literature. *Childs Nerv Syst.* 1989 Feb;5(1):12–4.
54. Storz G. An expanding universe of noncoding RNAs. *Science.* 2002 May 17;296(5571):1260–3.

55. Washietl S, Hofacker IL, Stadler PF. Fast and reliable prediction of noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15;102(7):2454–9.
56. Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*. 2001 Jul 1;15(13):1637–51.
57. Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem*. 1989 May 15;264(14):8012–8.
58. Bruce AG, Uhlenbeck OC. Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res*. 1978 Oct;5(10):3665–77.
59. Ikemura T, Dahlberg JE. Small ribonucleic acids of *Escherichia coli*. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis. *J Biol Chem*. 1973 Jul 25;248(14):5024–32.
60. Griffin BE. Separation of 32P-labelled ribonucleic acid components. The use of polyethylenimine-cellulose (TLC) as a second dimension in separating oligoribonucleotides of “4.5 S” and 5 S from *E. coli*. *FEBS Lett*. 1971 Jun 24;15(3):165–8.
61. Hindley J. Fractionation of 32P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *J Mol Biol*. 1967 Nov 28;30(1):125–36.
62. Sanger F, Brownlee GG, Barrell BG. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *J Mol Biol*. 1965 Sep;13(2):373–98.
63. Gupta RC, Randerath K. Use of specific endonuclease cleavage in RNA sequencing—an enzymic method for distinguishing between cytidine and uridine residues. *Nucleic Acids Res*. 1977 Oct;4(10):3441–54.
64. Peattie DA. Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Apr;76(4):1760–4.
65. Yarus M, Barrell BG. The sequence of nucleotides in tRNA Ile from *E. coli* B. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971 May 21;43(4):729–34.
66. Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, et al. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*. 2011 Dec;157(Pt 12):3268–81.
67. Shimoni Y, Friedlander G, Hetzroni G, Niv G, Altuvia S, Biham O, et al. Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view. *Mol Syst Biol*. 2007 Sep 25;3:138.
68. Vogel J, Papenfort K. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Dec;9(6):605–11.
69. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*. 2000 Jul;37(2):239–53.
70. Chen S, Zhang A, Blyn LB, Storz G. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004 Oct;186(20):6689–97.
71. Shpak VP. [Indices of immunologic reactivity in the diagnosis of the post-infarct syndrome]. *Vrach Delo*. 1987 Jun;(6):67–9.
72. Westermann AJ, Förstner KU, Amman F, Barquist L, Chao Y, Schulte LN, et al. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. *Nature*. 2016 Jan 28;529(7587):496–501.
73. Padalon-Brauch G, Hershberg R, Elgrably-Weiss M, Baruch K, Rosenshine I, Margalit H, et al. Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res*. 2008 Apr;36(6):1913–27.
74. Gong H, Vu G-P, Bai Y, Chan E, Wu R, Yang E, et al. A *Salmonella* small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors. *PLoS Pathog*. 2011 Sep;7(9):e1002120.
75. Fu Y, Galán JE. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*. 1999 Sep 16;401(6750):293–7.
76. Zhang S, Santos RL, Tsolis RM, Stender S, Hardt W-D, Bäumlér AJ, et al. The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3843–55.

77. Baxter MA, Fahlen TF, Wilson RL, Jones BD. Hile interacts with HilD and negatively regulates hilA transcription and expression of the Salmonella enterica serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1295–305.
78. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC. Characterization of MgtC, a virulence factor of Salmonella enterica Serovar Typhi. *PLoS One*. 2009 May 14;4(5):e5551.
79. Lee E-J, Groisman EA. An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. *Mol Microbiol*. 2010 May;76(4):1020–33.
80. Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, et al. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the Salmonella SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol*. 2011 Jun;80(6):1637–56.
81. Wilmes-Riesenberg MR, Foster JW, Curtiss R 3rd. An altered rpoS allele contributes to the avirulence of Salmonella typhimurium LT2. *Infect Immun*. 1997 Jan;65(1):203–10.
82. Majdalani N, Cunning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 13;95(21):12462–7.
83. Majdalani N, Chen S, Murrow J, St John K, Gottesman S. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol*. 2001 Mar;39(5):1382–94.
84. Mandin P, Gottesman S. Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J*. 2010 Sep 15;29(18):3094–107.
85. Vogel J. A rough guide to the non-coding RNA world of Salmonella. *Mol Microbiol*. 2009 Jan;71(1):1–11.
86. Nielsen JS, Lei LK, Ebersbach T, Olsen AS, Klitgaard JK, Valentin-Hansen P, et al. Defining a role for Hfq in Gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(3):907–19.
87. Wagner EGH, Romby P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet*. 2015 Jul 3;90:133–208.
88. Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Fiorini F, Bossi L. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev*. 2009 Sep 1;23(17):2004–15.
89. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong Y-Q. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004 Jan 15;40(1):1–9.
90. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*. 2003 Jun;48(6):1429–49.
91. Henkin TM. Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. *Genes Dev*. 2008 Dec 15;22(24):3383–90.
92. Pichon C, Felden B. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4;102(40):14249–54.
93. Beaume M, Hernandez D, Farinelli L, Deluen C, Linder P, Gaspin C, et al. Cartography of methicillin-resistant *S. aureus* transcripts: detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions. *PLoS One*. 2010 May 20;5(5):e10725.
94. Xue T, Zhang X, Sun H, Sun B. ArtR, a novel sRNA of *Staphylococcus aureus*, regulates  $\alpha$ -toxin expression by targeting the 5' UTR of sarT mRNA. *Med Microbiol Immunol*. 2014 Feb;203(1):1–12.
95. Miller CL, Romero M, Karna SLR, Chen T, Heeb S, Leung KP. RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiol*. 2016 Jul 19;16(1):155.
96. Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 2003 Jun;48(6):1633–45.
97. Vakulskas CA, Potts AH, Babitzke P, Ahmer BMM, Romeo T. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015 Jun;79(2):193–224.

98. Burrowes E, Baysse C, Adams C, O’Gara F. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*. 2006 Feb;152(Pt 2):405–18.
99. Brencic A, Lory S. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol*. 2009 May;72(3):612–32.
100. Massé E, Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4620–5.
101. Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, et al. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 29;101(26):9792–7.
102. Adhya S. Suboperonic regulatory signals. *Sci STKE*. 2003 Jun 3;2003(185):e22.
103. Plumbridge J. Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites. *EMBO J*. 1995 Aug 15;14(16):3958–65.
104. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*. 2004 Mar 18;428(6980):281–6.
105. Vogel J, Bartels V, Tang TH, Churakov G, Slagter-Jäger JG, Hüttenhofer A, et al. RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res*. 2003 Nov 15;31(22):6435–43.
106. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1;31(13):3406–15.
107. Chabelskaya S, Gaillot O, Felden B. A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog*. 2010 Jun 3;6(6):e1000927.
108. Kogaki H, Inoue S, Ikeda K, Samejima Y, Omori-Satoh T, Hamaguchi K. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J Biochem*. 1989 Dec;106(6):966–71.
109. Schopf JW. Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*. 1993 Apr 30;260:640–6.
110. Rivas E, Klein RJ, Jones TA, Eddy SR. Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. *Curr Biol*. 2001 Sep 4;11(17):1369–73.
111. Tjaden B, Saxena RM, Stolyar S, Haynor DR, Kolker E, Rosenow C. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* using high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleic Acids Res*. 2002 Sep 1;30(17):3732–8.
112. Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ. Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *J Bacteriol*. 1997 Apr;179(8):2678–89.
113. Axmann IM, Kensche P, Vogel J, Kohl S, Herzel H, Hess WR. Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis. *Genome Biol*. 2005 Aug 17;6(9):R73.
114. Pfeiffer V, Sittka A, Tomer R, Tedin K, Brinkmann V, Vogel J. A small non-coding RNA of the invasion gene island (SPI-1) represses outer membrane protein synthesis from the *Salmonella* core genome. *Mol Microbiol*. 2007 Dec;66(5):1174–91.
115. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 2001 Oct 25;413(6858):852–6.
116. Groisman EA, Ochman H. How to become a pathogen. *Trends Microbiol*. 1994 Aug;2(8):289–94.
117. Ellermeier JR, Slauch JM. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol*. 2007 Feb;10(1):24–9.
118. Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2005 Aug;57(3):691–705.

119. Chinni SV, Raabe CA, Zakaria R, Randau G, Hoe CH, Zemann A, et al. Experimental identification and characterization of 97 novel npcRNA candidates in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep;38(17):5893–908.
120. Deng W, Liou S-R, Plunkett G 3rd, Mayhew GF, Rose DJ, Burland V, et al. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol.* 2003 Apr;185(7):2330–7.
121. Nithya R, Ahmed SA, Hoe C-H, Gopinath SCB, Citartan M, Chinni SV, et al. Non-protein coding RNA genes as the novel diagnostic markers for the discrimination of *Salmonella* species using

P  
C  
R

.

P  
L  
o  
S

O  
n  
e  
.

2  
0  
1  
5

M  
a  
r

1  
6

;

1  
0

(  
3

)

:

e  
0  
1  
1  
8  
6  
6