

upna

Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa



## **Operones no-contiguos: una nueva estrategia para coordinar la expresión de genes en bacterias**

Memoria presentada por

**Sonia Sáenz Lahoya**

para optar al grado de Doctor por la Universidad Pública de Navarra

**Director: Dr. Iñigo Lasa Uzcudun**

Pamplona – Iruña, 2020



**Dr. ÍÑIGO LASA UZCUDUN**, Catedrático del área Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra,

INFORMA:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral “**Operones no-contiguos: una nueva estrategia para coordinar la expresión de genes en bacterias**” elaborada por Doña **Sonia Sáenz Lahoya** ha sido realizada bajo su dirección y que cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Pamplona, a 28 de Septiembre de 2020

Fdo. Iñigo Lasa Uzcudun



***A mis padres, Alberto y Hugo***



## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, me gustaría dar las gracias a todas las personas e instituciones que han hecho posible que este trabajo saliera adelante, en especial al Ministerio de Educación y Formación Profesional por haber financiado esta tesis.*

*Confieso que hubo momentos en los que dude sobre si algún día escribiría estas líneas, pero con la ayuda incondicional de Iñigo lo he conseguido. Gracias por aquella llamada para ofrecermme un hueco en el labo, por insistir, por tenderme siempre tu mano y por enseñarme tu amor incondicional por la ciencia. Me siento muy afortunada por haber podido trabajar en tu equipo.*

*A Ale, por aquellos eternos debates en el despacho que tanto me enseñaron, por tu paciencia y por demostrarme que no hay que estar en el labo para sentir que siempre estás ahí.*

*A Cris y Jaio, gracias por vuestra capacidad de escucha en mis rabietas, por las proposiciones de experimentos cuando estábamos en blanco y por dar los mejores consejos en el momento adecuado.*

*A Jean Marc Ghigo, por hacerme un acogermme en su laboratorio y tratarme como una más.*

*A Bego, por ser mi compañera de peripecias con el operon men, solo tu y yo sabemos lo que esta historia ha dado de sí.*

*A todos los biofilms, los de antes y los de ahora: Igor, Villanueva, Tana, Charly, Amaia, Juani y Pedro. Por ser el mejor de los equipos a lo largo de estos años. A Nerea comenzar esta historia. A Echeverz, por aquellos inicios compartiendo espacio, eres un ejemplo de constancia.*

*A Carmentxu, por ser una de las mejores personas que la vida ha puesto en mi camino.*

*A Saio y Bea, ese triángulo que la mayoría de las veces está “cojo” y que con el paso de los años hemos sabido equilibrar, mi empatía me dice que seguiremos construyendo momentos. Saio, gracias por ser mi medio tiroides en los momentos experimentales clave.*

*A Lore, mi riojana preferida, sigue siendo como eres. Solo tengo una cosa que decir: ¡lo hemos conseguido!*

*A los AT's: Pilar, Arancha, Loren y Naiara, por los buenos ratos que hemos compartido.*

*A toda la gente del IdaB, en especial a Victor y MaryJose por no tener nunca un no por respuesta.*

*A todo el personal de Navarrabiomed, en especial a Maribel, por aquellas conversaciones cuando ya no quedaba nadie.*

*A mis Kalis: Koko, Marga, Arthur, Bea, Hanna y las Paces. Por ser la mejor cuadrilla que podría tener. Por saber cuándo hay que preguntar y cuando es mejor no hacerlo. Por toda una vida ahí y lo que nos queda .... gracias por apoyarme una vez más. Seguiremos sumando juntas.*

*A Patri, por estar siempre ahí y enseñarme el significado de una amistad pura.. Estábamos equivocadas, 2020 va a ser nuestro año.*

*A la familia JRS por aquellos Juepintxos en Bara, riojanos jóvenes y frescos y miles de momenticos que seguiremos sumando. Gracias por tratarme como una más.*

*A mi familia política: Juanjo, Marian y Ardi por los buenos momentos vividos.*

*A toda mi familia por estar siempre ahí. Tengo una suerte infinita por teneros.*

*A Alberto, por ser mi mitad, mi equilibrio y el mejor compañero de vida que pude elegir. Gracias por tu paciencia, amor y apoyo incondicionales, por decirme siempre las cosas como son para hacerme reaccionar y tirar para adelante. La mitad de esta tesis es tuya.*

*A Hugo, por ser el impulso que necesitaba para poner fin a esta etapa. Te quiero hijo.*

*A mis padres, Pedro y Tere, por darme este regalo que es la vida. Por luchar siempre para darme lo mejor de lo mejor y enseñarme a valorar lo bueno y lo malo, porque de todo se aprende. Por escucharme siempre, por muy loca que sea la idea, sin vuestra ayuda no hubiera sido capaz. La otra mitad, es vuestra.*

*¡¡¡¡GRACIAS A TOD@S DE CORAZÓN!!!!*



Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral están incluidos en la siguiente publicación:

Sáenz-Lahoya, S. *et al.* (2019) Noncontiguous operon is a genetic organization for coordinating bacterial gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 1733–1738.

Este trabajo ha sido realizado dentro de los siguientes proyectos de investigación:

Título del proyecto: “Estudio de la transferencia horizontal de genes y de la formación del biofilm a nivel de célula individual en *Staphylococcus aureus*”. BIO2011-30503-C02-02 MINECO. Duración: 2012- 2014

Título del proyecto: “Descifrando las singularidades del exopolisacárido universal del biofilm (PNAG) y evaluación de su potencial biotecnológico”. BIO2014-53530-R MINECO. Duración: 2015- 2017



## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	7
ÍNDICE .....	11
RESUMEN .....	15
INTRODUCCIÓN.....	23
1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
1.1. Resistencia a antibióticos de <i>S. aureus</i> .....	23
1.2. Patogénesis de la infección por <i>S. aureus</i> .....	24
1.3. Moléculas de RNA reguladoras de factores de virulencia en <i>S. aureus</i> .....	26
2. Análisis transcriptómico en bacterias .....	29
3. Regulación de la expresión génica mediada por RNAs .....	31
3.1. RNAs pequeños (sRNAs) .....	31
3.2. UTRs (untranslated regions).....	35
3.3. Transcripción solapante .....	38
3.3.1. Degradación del RNA “sentido” .....	39
3.3.2. Estabilización del mRNA.....	39
3.3.3. Regulación de la traducción .....	39
4. Transcriptoma de <i>S. aureus</i> .....	41
5. Síntesis de menaquinona en <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
OBJETIVOS .....	53
MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
1. Estirpes bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos, y condiciones de cultivo. ....	57
2. Electrocompetentes de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
3. Construcción de plásmidos .....	57
4. Generación de mutantes .....	58
5. Extracción de RNA.....	59
6. Síntesis de sondas de RNA.....	60
7. Northern-blot.....	60
8. Western-blot .....	61
9. Curvas de crecimiento .....	61
10. Ensayo de reducción Alamar Blue .....	62

11. Ensayo de consumo de oxígeno .....	62
12. Ensayo de producción de nitritos .....	62
13. Medida de la producción de L- y D-lactato .....	62
14. Antibiograma .....	63
15. Ensayo de persistencia epitelial.....	63
17. Declaración de ética .....	64
18. Análisis estadístico.....	64
RESULTADOS .....	73
1. Identificación de potenciales “operones no-contiguos” en el genoma de <i>S. aureus</i> .....	73
2. Coexpresión de los genes <i>menE-menC-ytkD-MW1731</i> .....	79
3. Expresión del gen <i>MW1733</i> .....	80
4. La expresión del operón <i>menE-menC-ytkD-MW1731</i> y del gen <i>MW1733</i> está regulada recíprocamente.....	83
5. Análisis de la función de RNasa III en la regulación de los operones no-contiguos. .....	87
6. Efecto de la interferencia transcripcional en la regulación de la expresión de los transcritos de un operón no-contiguo.....	92
7. La descoordinación en la expresión de transcripción del operón no-contiguo <i>menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731</i> produce colonias con fenotipo SCV .....	95
8. Caracterización del fenotipo SCV que causa la sobreexpresión de <i>MW1733</i> .....	96
9. Caracterización de los mutantes con fenotipo SCV durante el proceso de infección .....	100
DISCUSIÓN.....	105
CONCLUSIONES.....	117
CONCLUSIONS.....	121
REFERENCIAS.....	123

# RESUMEN

---



---

## RESUMEN

En las bacterias, los genes que codifican para proteínas que intervienen en el mismo proceso biológico, con mucha frecuencia se agrupan en operones que se definen como grupos de genes adyacentes que se transcriben como una única molécula de mRNA policistrónico bajo el control de un mismo promotor. Esta organización proporciona un mecanismo eficiente para coordinar la expresión de genes funcionalmente relacionados y es la base de la regulación de genes en bacterias.

En esta tesis demostramos la existencia de un nivel superior de organización en la estructura del operón que denominamos operón no-contiguo y que consiste en un operón que contiene un gen o genes que se transcriben en la dirección opuesta al resto del operón. Esta nueva arquitectura de transcripción está ejemplificada por los genes *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* que están implicados en la síntesis de menaquinona en *Staphylococcus aureus*. Nuestros resultados indican que los genes *menE-menC-ytkD-MW1731* se transcriben como una unidad de transcripción, mientras el gen *MW1733*, ubicado entre *menC* e *ytkD*, se transcribe en dirección opuesta. Esta organización genética genera transcritos solapantes cuya expresión está regulada a través del procesamiento mediado por RNasa III y por un mecanismo de interferencia transcripcional. El operón *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* es necesario para la síntesis de menaquinona, un intermediario de la cadena transportadora que tiene por función ceder los electrones a los citocromos. La sobreexpresión de *MW1733* es capaz de reducir los niveles de *menE-menC* y en consecuencia la síntesis de menaquinona reduciendo la velocidad de crecimiento de la bacteria y produciendo colonias de tamaño muy pequeño, que se denominan Small Colony Variants (SCV). El fenotipo SCV es característico de aislados clínicos de *S. aureus* procedentes de infecciones persistentes y es un fenotipo que revierte cuando las bacterias se crecen en el laboratorio. Nuestros resultados indican que la arquitectura de transcripción del operón *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* podría explicar la variación de fase característico del fenotipo SCV.

A la vista de nuestros resultados, la visión clásica de la estructura de los operones debe revisarse para tener en cuenta esta nueva disposición de operón en la que la cotranscripción y la transcripción solapante se combinan para coordinar la expresión genética que está relacionada funcionalmente.





# SUMMARY

---



**SUMMARY**

Bacterial genes encoding for proteins involved in the same biological process are typically grouped into operons defined as clusters of adjacent genes encoding for proteins that fill related roles and are transcribed into a single polycistronic mRNA molecule under the control of the same promoter. This organization provides an efficient mechanism to coordinate the expression of functionally related neighboring genes and is at the basis of gene regulation in bacteria.

In this thesis, we report the existence of a higher level of organization in operon structure that we named non-contiguous operon and consists in an operon containing a gene (s) that is transcribed in the opposite direction to the rest of the operon. This novel transcriptional architecture is exemplified by the genes *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* involved in menaquinone synthesis in the major human pathogen *Staphylococcus aureus*. We show that *menE-menC-ytkD-MW1731* genes are transcribed as a single transcription unit whereas the *MW1733* gene, located between *menC* and *ytkD*, is transcribed in the opposite direction. This genomic organization generates overlapping transcripts whose expression is mutually regulated by transcriptional interference and RNase III processing at the overlapping region.

The *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* operon is necessary for the synthesis of the menaquinone, an intermediary of the electron transport chain. Our results revealed that the overexpression of *MW1733* can diminish the expression of *MenE-MenC* and the menaquinone synthesis and a consequence bacterial growth rate is reduced and form colonies of small size, currently known as Small Colony Variants (SCV). The SCV phenotype is characteristic of clinical isolates of *S. aureus* obtained from patients with persistent infections. The SCV phenotype is unstable and it reverts when bacteria are grown in the laboratory. Our results suggest that transcriptional organization of the *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* non-contiguous operon may explain the phenotypic variation of the SCV phenotype.

In the light of our results, the canonical view of operon structure should be revisited by including this novel operon arrangement in which co-transcription and overlapping transcription are combined to coordinate functionally related gene expression.



# INTRODUCCIÓN

---



## INTRODUCCIÓN

### 1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, inmóvil, coagulasa y catalasa positiva, no esporulada y de color dorado que crece en forma de racimos. Aproximadamente el 30% de las personas adultas están colonizados intermitentemente por *S. aureus* en zonas como nariz, vagina o área perianal (Archer, 1998). *S. aureus* es inerte en estas localizaciones, sin embargo, cuando consigue atravesar la barrera epitelial se convierte en un patógeno capaz de producir infecciones en tejidos muy diversos como válvulas cardíacas (endocarditis), hueso (osteomielitis), epitelio respiratorio (neumonía), músculo (abscesos), o sangre (bacteriemia) (Gordon and Lowy, 2008). La capacidad de *S. aureus* para causar infecciones en tejidos tan diversos se debe a la producción de una gran cantidad de factores de virulencia y a su capacidad para reconocer las condiciones ambientales de cada nicho y adaptarse a las mismas. Esto es posible porque *S. aureus* ha desarrollado un eficaz sistema sensorial que adecua la síntesis de factores de virulencia responsables de la adhesión, invasión y diseminación en los tejidos del huésped en respuesta a las condiciones ambientales (Novick, 2003). Estos sistemas sensoriales están constituidos por una compleja red de regulación en la que destacan los sistemas de dos componentes, proteínas reguladoras de la transcripción y RNAs reguladores (Cheung *et al.*, 2004; Villanueva *et al.*, 2018; Romilly *et al.*, 2012).

#### 1.1. Resistencia a antibióticos de *S. aureus*

Muy poco tiempo después de la introducción de la penicilina en 1941 como antibiótico para el tratamiento de infecciones estafilocócicas, comenzaron a registrarse cepas de *S. aureus* resistentes al mismo (Barber and Rozwadowska-Dowzenko, 1984). Estas cepas producían una penicilinasas que rompía el anillo  $\beta$ -lactámico de la penicilina. Aunque inicialmente las cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina se adquirían en ambientes hospitalarios, pronto las resistencias se extendieron a la comunidad incluyendo animales de granja, aguas residuales e incluso animales salvajes. Actualmente, se estima que el 90% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a penicilina. A finales de los años 50 se desarrolló un derivado de la penicilina, la meticilina, que tenía la propiedad de resistir la acción de las penicilinasas. Al igual que había ocurrido con la penicilina, inmediatamente tras su introducción para uso terapéutico, se comenzó a notificar el aislamiento de cepas resistentes a la meticilina, las conocidas

como *S. aureus* meticilin-resistente o MRSA (Chambers, 1988). El mecanismo de resistencia a meticilina se genera a partir de una proteína fijadora de penicilina llamada PBP2a que presenta una baja afinidad por  $\beta$ -lactámicos (PBP2a) y que es codificada por el gen *mecA*. El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil (SCC- cassette cromosómico estafilocócico) junto al complejo denominado SCCmec. Actualmente existen once variantes de SSCmec, que se numeran del I al XI y que difieren entre si en tamaño y composición de los elementos de resistencia antibiótica (Peacock and Paterson, 2015). Debido a la relevancia clínica de los clones resistentes a meticilina, se recomienda utilizar herramientas de genotipado de MRSA para identificar clones prevalentes y facilitar el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo (Kluytmans *et al.*, 1997).

### 1.2. Patogénesis de la infección por *S. aureus*

*S. aureus* produce una gran cantidad de factores de virulencia que juegan un papel muy importante en la patogénesis de la infección (Novick, 2003; Foster, 2005; Chambers and DeLeo, 2009). Uno de estos factores de virulencia, lo constituyen un grupo de proteínas de superficie denominadas MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) que son mediadoras en la adherencia de la bacteria a los tejidos del huésped (Patti *et al.*, 1994). Estas proteínas de superficie se unen a moléculas del huésped como: colágeno (cna), fibronectina (fnbA, fnbB) o fibrinógeno (ClfA y ClfB) y facilitan el desarrollo de infecciones endovasculares, articulares o de hueso y en infecciones de dispositivos protésicos (Foster and Höök, 1998). Aunque *S. aureus* es capaz de adherirse en ausencia de estas proteínas, sus propiedades de adhesión e invasión se ven reducidas en su ausencia (Foster *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2000).

Otra proteína de superficie de *S. aureus* es proteína A. Esta proteína se une a la fracción Fc de las inmunoglobulinas G y como resultado puede prevenir la opsonización del microorganismo (Uhlén *et al.*, 1984). Además, puede unirse al factor de von Willebrand, una proteína presente en los sitios donde hay lesiones del endotelio, favoreciendo la adherencia de la bacteria a estas lesiones y agravando el daño endovascular (Hartleib *et al.*, 2000). Una vez que *S. aureus* se adhiere a los tejidos del huésped o a materiales protésicos puede iniciar un modo de vida sésil, en el cual las bacterias sintetizan una matriz extracelular en cuyo interior crece la bacteria (Donlan and Costerton, 2002). En el caso de materiales protésicos colonizados por biofilms, la



erradicación de la bacteria resulta muy complicada y con mucha frecuencia la única estrategia posible es retirar la prótesis infectada, mantener el tratamiento en ausencia de la prótesis para eliminar completamente la infección y posteriormente volver a implantar la prótesis (Somerville and Proctor, 2009). Incluso con todas estas precauciones, la posibilidad de que se produzca la reinfección de prótesis es muy elevada.

Durante la infección, *S. aureus* produce gran cantidad de enzimas como proteasas, lipasas, elastasas, catalasas, coagulasas, estafiloquinasas, hialuronidasas, DNasas o fosfatasas que le permiten invadir, destruir y metastatizar los tejidos del huésped. Las proteasas, fosfatasas y DNasas colaboran en el proceso infeccioso y en la producción de lesiones, las lipasas ayudan al organismo a diseminarse en tejidos cutáneos y subcutáneos y la catalasa degrada el peróxido de hidrógeno proporcionando protección al microorganismo frente a la fagocitosis. Por otro lado, la coagulasa se encuentra en dos formas: como factor de agregación o coagulasa ligada (clumping factor) y como coagulasa libre. La coagulasa ligada es capaz de convertir, sin intervención de factores plasmáticos, el fibrinógeno en fibrina dando lugar a una coagulación del plasma, este efecto facilita el desarrollo de sepsis y abscesos. Las estafiloquinasas degradan la fibrina y favorecen la invasión de tejidos vecinos y las hialuronidasas contribuyen a la diseminación de tejidos adyacentes hidrolizando la matriz intracelular de mucopolisacárido de los tejidos (Novick, 2003; Foster, 2005; Chambers and DeLeo, 2009). Una de las consecuencias más graves derivada de la infección por *S. aureus* es el shock séptico en el que la bacteria interacciona y activa el sistema inmune del huésped y con ello la coagulación. En este proceso pueden intervenir el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y la  $\alpha$ -toxina.

*S. aureus* puede producir toxinas con distintos efectos biológicos entre las que se encuentran las citotoxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y leucocidina de Panton-Valentine) que ayudan a la destrucción de los leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos mediante la formación de poros en la membrana que alteran su permeabilidad celular (Gladstone and Van Heyningen, 1957). Otro tipo de toxinas son las exfoliatinas (ETA, ETB y ETD), responsables del síndrome de la piel escaldada que actúan como proteasas rompiendo los puentes intercelulares del estrato granuloso de la epidermis. Las enterotoxinas (A-E, G-I) actúan como superantígenos estimulando la proliferación de las células T y la liberación de citotoxinas. En resumen, durante el proceso de infección por *S. aureus* las adhesinas de superficie reconocen componentes de los tejidos del

huésped facilitando su colonización, que es seguido de la multiplicación del microorganismo y la secreción de determinadas toxinas y enzimas responsables de causar el daño tisular.

### 1.3. Moléculas de RNA reguladoras de factores de virulencia en *S. aureus*

*S. aureus* produce un gran número de RNAs con funciones reguladoras que juegan un papel muy importante en los procesos adaptativos de la bacteria. Los microorganismos utilizan estos RNAs para modificar rápidamente la expresión de determinados genes en respuesta a cambios ambientales o bien para sobrevivir dentro del huésped (Felden *et al.*, 2011). *S. aureus* tiene el honor de ser la bacteria en la que se describió por primera vez un RNA regulador (Novick *et al.*, 1993). Este RNA, denominado RNAIII, es el efector del sistema quorum sensing agr y constituye el paradigma de la multifuncionalidad de un mRNA bacteriano con respecto a la regulación de genes de virulencia (Novick and Geisinger, 2008). El sistema de quorum sensing detecta la densidad de la población y realiza funciones relacionadas con la fisiología y patogénesis de *S. aureus* (Felden *et al.*, 2011). Este sistema está compuesto por dos transcritos divergentes. El primero de ellos, RNAII codifica para el cassette de quorum sensing (AgrBD) y para un sistema de dos componentes (AgrAC). El cassette de quorum sensing produce un péptido autoinductor (AIP) (AgrD) que al alcanzar una concentración umbral activa a la quinasa de membrana AgrC y al regulador de respuesta AgrA mediante fosforilación. A continuación, AgrA activa la transcripción del operón AgrACDB y de otro transcrito que se produce en orientación contraria y al que se denomina RNAIII. RNAIII es un transcrito bifuncional, por un lado, codifica para la  $\delta$ -hemolisina (*hld*) y por otro lado actúa como un RNA regulador que promueve cambios a nivel post-transcripcional en la expresión de proteínas de superficie y síntesis de toxinas excretadas. La región 3'UTR de RNAIII actúa como dominio represor bloqueando sitios de unión de ribosomas y provocando una represión de la traducción. Estas regiones de unión RNAIII-mRNA son sustrato para la enzima RNasa III que degrada RNA de cadena doble (Boisset *et al.*, 2007; Huntzinger *et al.*, 2005). Ejemplos de mRNAs que son reprimidos mediante este mecanismo corresponden a factores de virulencia como proteína A (*spa*), coagulasa (*coa*), hidrolasas y amidasas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano y el represor transcripcional de toxinas Rot (Geisinger *et al.*, 2006). Una consecuencia de que RNAIII facilite la degradación de Rot, es la activación de la transcripción de exotoxinas. La mayoría de los aislados clínicos

expresan RNAlII pero sus niveles varían dependiendo del aislado y con cierta frecuencia se seleccionan en el laboratorio cepas que contienen mutaciones en el sistema *agr* (Traber *et al.*, 2008). Esto lleva a suponer que el sistema *agr* no solo no es necesario para crecer en condiciones de laboratorio, sino que su activación resulta perjudicial para el crecimiento de la bacteria. Recientemente se han realizado estudios en pacientes infectados con *S. aureus* meticilin-resistentes (MRSA) a partir de los que aislaron cepas de *S. aureus* con mutaciones en *agr*. Esto puede deberse a una adaptación del patógeno dentro del huésped que a su vez puede resultar perjudicial para la bacteria fuera del mismo (Shopsin *et al.*, 2010).

El sistema *agr* también puede regular genes directamente a través de otros RNA reguladores. Un ejemplo de esta situación es ArtR, un sRNA que regula positivamente la síntesis de  $\alpha$ -hemolisina (Xue *et al.*, 2014). AgrA reprime la síntesis de ArtR cuando la densidad celular es elevada. Cuando la densidad celular es baja, ArtR interacciona con el mRNA de *sarT*, provocando una rápida degradación del mismo mediada por RNasa III. Como SarT es un represor de la transcripción de *hla*, la consecuencia final de la inhibición de ArtR a densidades de población elevadas es la activación de la producción de  $\alpha$ -hemolisina. Es importante señalar que en cepas en las que se produzca una mutación del sistema *agr*, AgrA no podrá reprimir la transcripción de ArtR provocando una regulación positiva de *hla*.

Otro ejemplo de un sRNA regulado positivamente por AgrA es RsaE. RsaE es el único sRNA conservado en todas las especies estafilocócicas estudiadas y actúa apareándose a distintos mRNAs que codifican para enzimas implicadas en distintas rutas metabólicas impidiendo su transcripción. Esto provoca una regulación negativa de rutas como el ciclo de Krebs, transporte de aminoácidos y proteínas, síntesis de cofactores, metabolismo de lípidos y carbohidratos cuando las reservas de carbono escasean (**Figura 1**) (Geissmann *et al.*, 2009; Bohn *et al.*, 2010).

Además de estos ejemplos concretos, se han descrito mas de 100 RNA reguladores en *S. aureus* de los que todavía no se conoce su función, pero hay suficientes evidencias para afirmar que son intermediarios importantes que conectan el metabolismo, la respuesta a condiciones de estrés y la virulencia de la bacteria (Tomasini *et al.*, 2014).

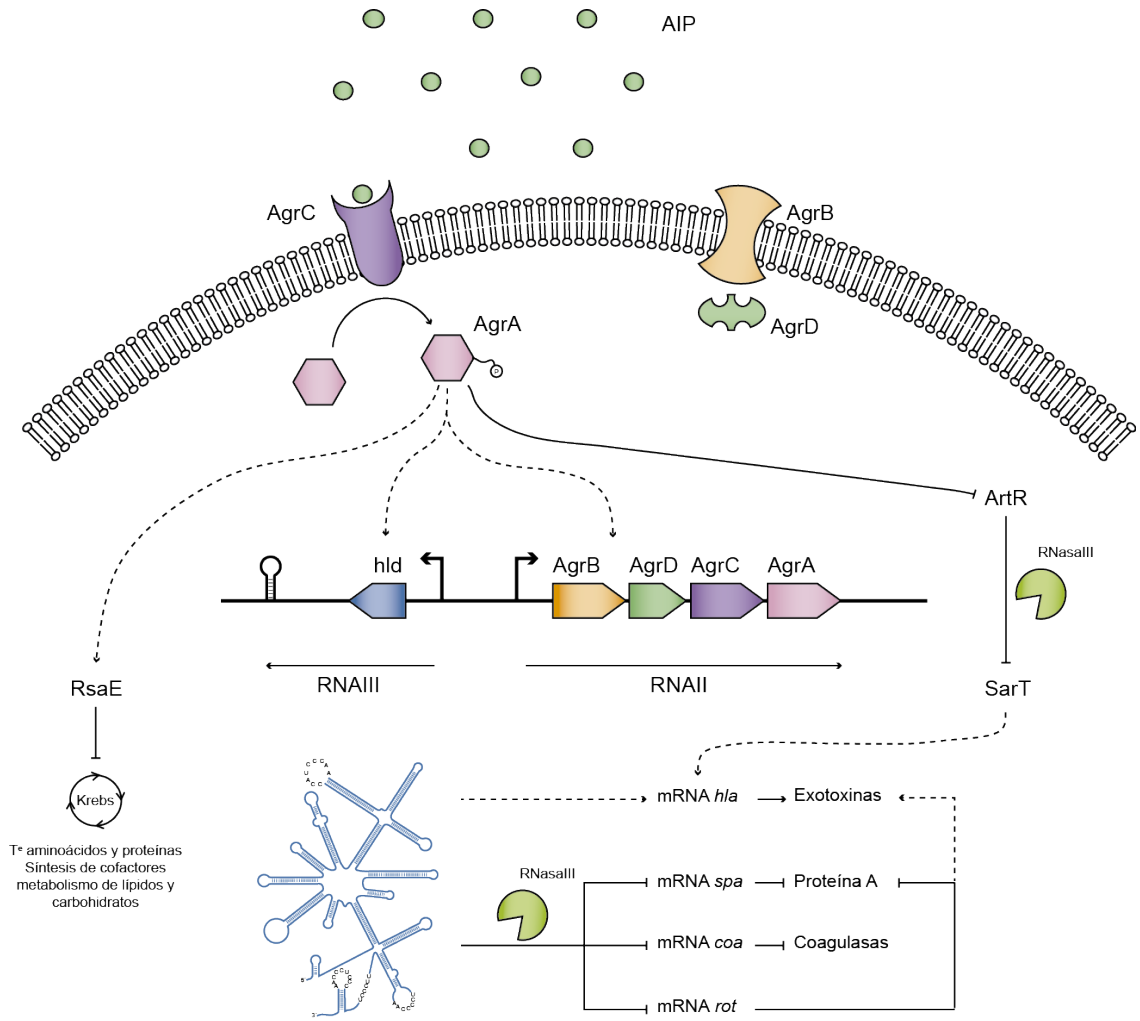


Figura 1. Sistema *agr* con dos efectores intracelulares principales: RNAIII y AgrA.

## 2. Análisis transcriptómico en bacterias

En los últimos años, la transcriptómica se ha convertido en una herramienta indispensable para obtener información como una determinada condición ambiental, un determinado tratamiento o la mutación de un gen afectan a la expresión génica global en cualquier organismo. La transcriptómica es la disciplina que estudia y analiza el transcriptoma, que es el conjunto de transcritos de RNA producidos por una célula, tipo celular u organismo (Sorek and Cossart, 2010). Como en otras tecnologías, la normalización en la utilización de esta metodología se ha producido gracias a un enorme desarrollo tecnológico. El primer método utilizado para comparar los niveles de RNA entre dos muestras biológicas fue el Northern-blot. Esta técnica consiste en la separación por tamaño del RNA total mediante una electroforesis en gel. Los RNAs se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o nylon a partir de la cual se detecta la presencia de los RNAs de interés mediante la hibridación con una sonda complementaria de ácidos nucleicos marcada radiactivamente. La técnica de Northern-blot permite la detección de un único transcrito en cada experimento para el que previamente se ha diseñado la sonda. Además, se necesita una elevada concentración de RNA y normalmente se utilizan métodos radiactivos para marcar la sonda (Alwine *et al.*, 1977). El siguiente salto tecnológico fue el desarrollo de métodos de reacción en cadena de la polimerasa unidos a un proceso de transcripción inversa (RT-PCR) que requiere una concentración de RNA menor que el Northern-blot y es un proceso metodológicamente mas sencillo. Al igual que el northern-blot, la RT-PCR también necesita conocer previamente el RNA cuya concentración se quiere comparar y en cada reacción se compara la concentración de un único gen (Bustin, 2000). La primera metodología desarrollada para comparar de forma global los niveles de RNA entre muestras biológicas fue la denominada como SAGE (Serial analysis of gene expression) (Velculescu *et al.*, 1997). El fundamento de la técnica consiste en la retrotranscripción del mRNA de la muestra, y la digestión del cDNA con una enzima a la que se le añaden unos adaptadores. Tras un proceso de amplificación, los fragmentos, denominados tags, se ligan para formar di-tags que a su vez se unen a otros di-tags, para generar concatémeros que son finalmente secuenciados. El análisis de la secuencia permite determinar el número de Tags presentes en la muestra y se infiere que este número debe ser proporcional al número de moléculas de ese mRNA en la muestra biológica. El mayor inconveniente de esta técnica es su complejidad y los laboriosos procedimientos para la producción de los concatémeros de “tags”. La siguiente aproximación técnica se

llevó a cabo con el desarrollo de microarrays (Siezen *et al.*, 2010). Esta técnica se basa en el principio de hibridación de los ácidos nucleicos y permite analizar los patrones de expresión de cientos de genes de forma mucho más sencilla que el SAGE en un mismo experimento (Srinivasan *et al.*, 2005). Los microarrays son superficies sólidas a las que están adheridas sondas de DNA. El RNA objeto de estudio se retrotranscribe a cDNA y este se une por complementariedad a las sondas del microarray. La detección de la complementariedad es posible porque el cDNA está conjugado con marcadores fluorescentes. Inicialmente, los microarrays solo tenían sondas complementarias a la región codificante de los genomas y por tanto no se podía obtener información de las regiones intergénicas y tampoco de la cadena complementaria (Siezen *et al.*, 2010). El desarrollo de escáneres más potentes permitió aumentar la densidad de sondas por unidad de superficie y con ello se desarrollaron los denominados “tiling arrays”. En los tiling arrays, se incluyen sondas solapantes que cubren ambas cadenas del genoma del organismo o célula que se está estudiando, de forma que cualquier RNA que se produzca puede ser detectado, sin el sesgo que introduce el considerar que solo la región codificante del genoma tiene capacidad para producir RNA. Lógicamente, esta metodología sigue necesitando para su diseño el conocimiento de la secuencia completa del genoma del organismo objeto de estudio (Y. H. Yang *et al.*, 2002; Smyth and Speed, 2003; Hinton *et al.*, 2004). Utilizando la metodología de los tiling arrays, distintos grupos fueron capaces de resolver el transcriptoma completo de distintas bacterias: *Listeria monocytogenes* (Toledo-Arana *et al.*, 2009), *Bacillus subtilis* (Rasmussen *et al.*, 2009), *Halobacterium salinarum* (Koide *et al.*, 2009), *Mycoplasma pneumoniae* (Güell *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (Selinger *et al.*, 2000) y *Caulobacter crescentus* (McGrath *et al.*, 2007).

Aunque el desarrollo tecnológico que supuso el desarrollo de los microarrays y de los tiling arrays en particular fue inmenso, esta metodología fue rápidamente sustituida por la técnica de secuenciación masiva, conocida como RNA-seq (Z. Wang *et al.*, 2009). Esta técnica consiste en la secuenciación directa de RNA, tras su conversión en cDNA. Para ello, de la fracción de RNA total, se eliminan los rRNA ribosómicos y los RNA de transferencia, lo que permite enriquecer en la fracción de mRNA. El mRNA resultante se retrotranscribe a cDNA y posteriormente se fragmenta. Estos fragmentos de cDNA se ligan a adaptadores específicos en sus regiones 5' y 3' para no perder la direccionalidad en las lecturas. De cada cDNA se obtiene la lectura de una secuencia cuyo tamaño puede oscilar entre 25-400 pb (Wang *et al.*, 2009). Una vez realizada la secuenciación, las lecturas son mapeadas sobre un genoma de referencia

determinándose las regiones de expresión (Sorek and Cossart, 2010). El número de lecturas que mapea sobre un determinado gen es directamente proporcional al número de moléculas de RNA presentes en la célula en el momento de la purificación del RNA. La técnica del RNA-seq tiene ventajas respecto al tilling array. Por un lado, presenta un mayor rango dinámico, aumentando la ventana donde se pueden detectar diferencias entre dos muestras y una resolución a nivel de nucleótido en los extremos 5' y 3' de cada molécula de RNA (Wang *et al.*, 2009). A partir de la técnica del RNA-seq se han obtenido los transcriptomas de una gran cantidad de bacterias como: *Burkholderia cenocepacia* (Yoder-Himes *et al.*, 2009), *Chlamydia trachomatis* (Albrecht *et al.*, 2010), *Escherichia coli* (Dornenburg *et al.*, 2010), *Halobacterium salinarum* (Koide *et al.*, 2009), *Helicobacter pylori* (Sharma *et al.*, 2010), *Lactococcus lactis* (van der Meulen *et al.*, 2016), *Mycoplasma pneumoniae* (Güell *et al.*, 2009), *Salmonella* spp. (Perkins *et al.*, 2009), *S. aureus* (Lasa *et al.*, 2011), *Salmonella Typhimurium* (Kröger *et al.*, 2012), *Clostridium difficile* (Soutourina *et al.*, 2013), *Neisseria gonorrhoeae* (Remmele *et al.*, 2014),

Gracias a las metodologías de los microarrays y del RNA-seq se ha obtenido una imagen mucho mas precisa del transcriptoma de bacterias. De forma general, el hallazgo mas sorprendente en el que coinciden los estudios transcriptómicos ha sido que el genoma se transcribe desde muchas mas regiones que las inicialmente consideradas como codificantes. Así, se ha visto que existe una gran cantidad de RNA antisentido, que las regiones 5' y 3' de los RNA en muchos casos son mas largas de lo esperado y que existe un gran número de RNAs no codificantes tanto de tamaño corto (sRNA) como de tamaño largo (lncRNA, mayor a 200 nucleótidos) (Jensen *et al.*, 2013; Kapranov *et al.*, 2007; Wade and Grainger, 2014).

### 3. Regulación de la expresión génica mediada por RNAs

Los RNAs reguladores son RNAs normalmente no codificantes que actúan mediante varios mecanismos para controlar la expresión génica a distintos niveles como la transcripción, traducción o estabilidad del mRNA. A continuación, se describen los distintos tipos de RNAs reguladores que podemos encontrar en bacterias.

#### 3.1. RNAs pequeños (sRNAs)

La mayoría de los sRNAs regulan la expresión génica mediante complementariedad de bases con mRNAs diana. Existen dos tipos de sRNAs, los sRNAs codificados en *cis* y los sRNAs codificados en *trans*. Los sRNAs codificados en *cis* son

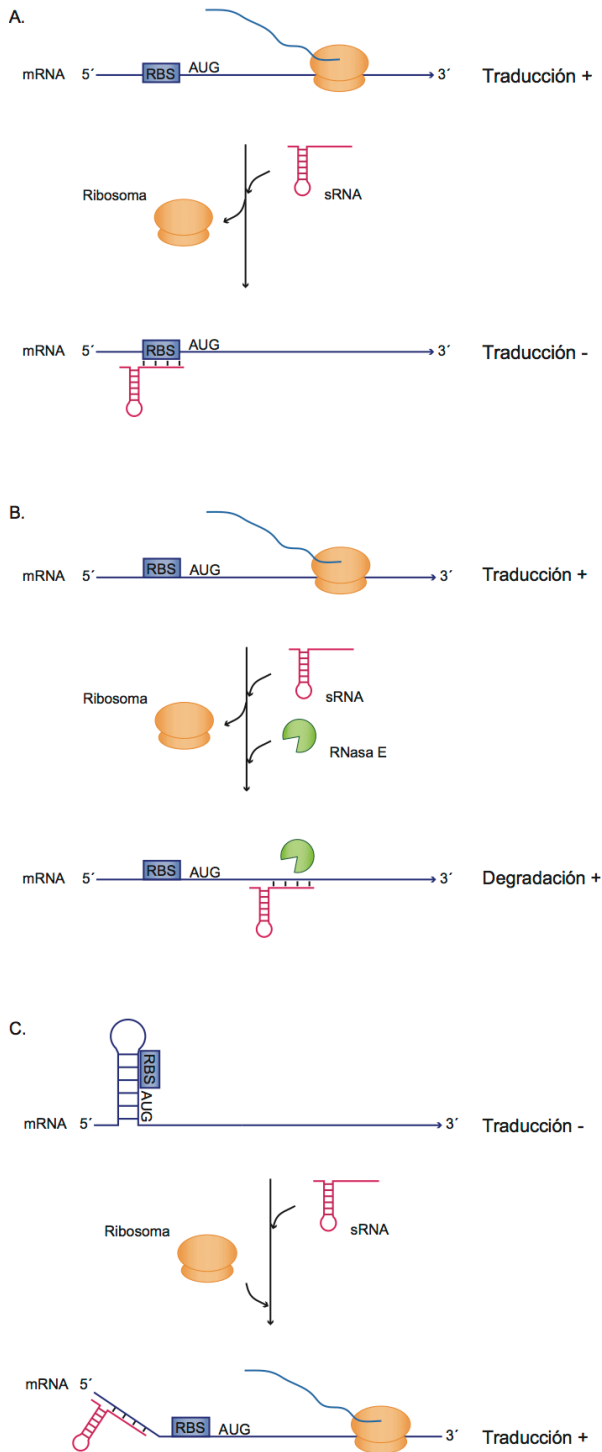
aquellos que se sintetizan en el mismo locus genómico que los mRNA diana lo que implica que la complementariedad entre ambos es total (Waters and Storz, 2009). Los sRNAs codificados en *trans* se sintetizan en un *locus* genómico distinto a los mRNA diana, esto normalmente se traduce en que la complementariedad con el mRNA diana es parcial, característica que permite a los sRNAs tener múltiples mRNAs diana (Waters and Storz, 2009). En muchos casos, estos sRNAs necesitan asociarse a chaperonas como Hfq para facilitar su unión al mRNA

(De Lay *et al.*, 2013; Gottesman and Storz, 2011; Vogel and Luisi, 2011). Los sRNAs pueden regular la traducción y estabilidad del mRNA mediante distintos mecanismos: por un lado pueden unirse a la región 5'UTRs del mRNA bloqueando la RBS lo que impide la unión del ribosoma y provoca inhibición de la traducción del mRNA (**Figura 2A**) (Sharma *et al.*, 2007). En otras ocasiones, RNAsas específicas pueden reconocer las zonas de solapamiento del dúplex sRNA-mRNA y procesarlas provocando la degradación del mRNA (**Figura 2B**) (Morita *et al.*, 2005; Desnoyers *et al.*, 2009). Por último, la unión del sRNAs también pueden activar la traducción del mRNA mediante la unión a una región aguas arriba del sitio de unión del ribosoma y liberar estructuras secundarias que impidan la unión del mRNA al ribosoma (**Figura 2C**) (Gottesman, 2005; Prévost *et al.*, 2007; Papenfort *et al.*, 2013). Normalmente la transcripción de los sRNAs codificados en *trans* se induce en condiciones específicas como: estrés, fase estacionaria, temperatura o cambios metabólicos en los que se requiere su actividad reguladora solo excepcionalmente estos sRNAs se expresan de forma constitutiva (Wagner and Romby, 2015). Además de actuar mediante emparejamiento de bases, los sRNAs pueden interactuar con proteínas y modificar su actividad. Dos familias de sRNAs reguladores que actúan de éste modo son 6S y CsrB sRNA (Gottesman and Storz, 2011). El sRNA 6S de *E. coli* representa a una familia de sRNAs que se asocian con la RNA polimerasa (RNAP) y evitan que ésta se una al promotor de sus genes diana e inhiba la transcripción de los genes correspondientes. Podemos encontrar este tipo de sRNAs en bacterias gram negativas y gram positivas aunque su secuencia no esta conservada

(Wassarman, 2007; Wassarman and Storz, 2000). CsrB y CsrC son RNAs de *E. coli* que modulan la actividad de una proteína de unión a RNA denominada CsrA. CsrA se une a la 5'UTR de un mRNA afectando a su estabilidad y/o traducción pero cuando los niveles de CsrB y CsrC aumentan estos secuestran a CsrA evitando que actúe (Waters and Storz, 2009).



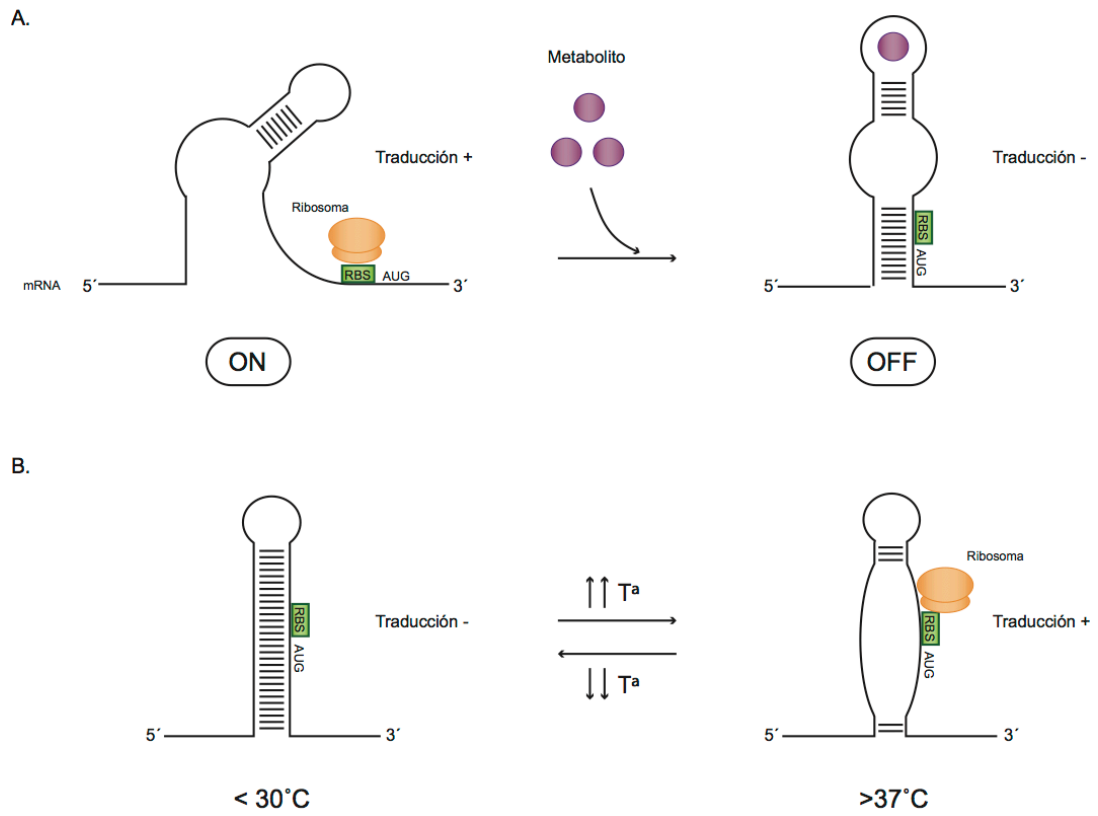




**Figura 2.** Mecanismos de regulación de la traducción y estabilidad de mRNAs mediados por sRNAs. (A) Unión al extremo 5'UTR del mRNA bloqueando el sitio de unión al ribosoma y la traducción del mRNA (B) Formación de un dúplex sRNA-mRNA que es reconocido y procesado por enzimas degradadoras del RNA; (C) Liberar estructuras secundarias que inhiben la traducción del mRNA.

### 3.2. UTRs (*untranslated regions*)

Las denominadas 5' y 3'UTRs son regiones no traducidas del RNA que se encuentran antes (5') o después (3') de la región codificante del mRNA. En relación con las regiones 5'UTR de los mRNAs, en ellas podemos encontrar la secuencia de unión al ribosoma, sitios de unión para sRNAs, proteínas reguladoras de RNA, riboswitches y termosensores. Los riboswitches son elementos reguladores en *cis* que se encuentran en las regiones 5'UTR de los mRNA y que sufren cambios conformacionales tras la unión de un determinado metabolito. La estructura alterada del mRNA afecta a la expresión del transcrito que se encuentra aguas abajo del mismo (Roth and Breaker, 2009; Mandal *et al.*, 2003). Los riboswitches pueden detectar cambios en la concentración intracelular de metabolitos como iones, coenzimas, aminoácidos o c-di-GMP, lo interesante es que la mayoría de los genes que son regulados mediante riboswitches están involucrados en el transporte y la biosíntesis de éstos metabolitos efectores (Lioliou *et al.*, 2010). Los riboswitches están formados por dos dominios, el aptámero que reconoce al ligando y una plataforma de expresión que controla el transcrito que se encuentra aguas abajo. La estructura de la plataforma de expresión es dependiente del dominio aptámero. La unión de un metabolito al aptámero puede inducir un secuestro de la plataforma de expresión y provocar que la conformación del riboswitch pase de encendido a apagado, o viceversa (Lioliou *et al.*, 2010). Dependiendo de su localización, los riboswitches pueden controlar: la terminación de la transcripción, el inicio de la traducción o el procesamiento del mRNA (**Figura 3A**). Otros elementos reguladores de las 5'UTRs son los termosensores o termómetros de RNA que normalmente están implicados en patogénesis microbiana, desarrollo de bacteriófagos o lisogenia (Narberhaus *et al.*, 2006; Klinkert and Narberhaus, 2009). Si los genes que se encuentran aguas abajo del termosensor producen proteínas de choque térmico, a bajas temperaturas los termómetros de RNA tendrán una conformación "cerrada" de modo que la RBS será completamente inaccesible para el ribosoma y el RNA no se traducirá. Cuando se produzca un incremento de temperatura, la conformación del termosensor cambiará a "abierta" posibilitando la unión del ribosoma y en consecuencia traducción del mRNA (**Figura 3B**) (Lioliou *et al.*, 2010). Existe la posibilidad de que algunos riboswitches controlen determinados sRNAs y que estos actúen en *trans*.



**Figura 3.** Elementos reguladores de las 5'UTRs (A) Riboswitches (B) Termosensores.

En eucariotas, las regiones 3'UTRs de los mRNAs tienen secuencias reguladoras a las que se pueden unir microRNAs que actúan en *trans* y pueden dar lugar a una regulación post-transcripcional mediante el silenciamiento de genes, la desestabilización del mRNA o la alteración del proceso de la traducción (Mignone *et al.*, 2002). Hasta hace unos años, no se tenían evidencias de que en procariotas, las regiones 3' UTR tuviesen ninguna función reguladora, mas allá de contener la secuencia terminadora del proceso de la transcripción y la existencia de regiones con una secuencia similar a la de algunos sRNAs (Zhang *et al.*, 2003; Vogel *et al.*, 2003; Miyakoshi *et al.*, 2015). El avance en las técnicas de RNA-seq han permitido detectar la existencia de 3'UTRs inusualmente largas y cuya secuencia esta tan conservada como la de las regiones codificantes, lo que sugiere que estas regiones pueden tener un papel en la regulación de la expresión de los mRNAs. En un estudio realizado en *S. enterica* estudiando la función de la 3'UTR (310 nucleótidos) del mRNA *hilD*, López-Garrido *et al.* mostraron que la delección de la región 3'UTR de *hilD* provoca un incremento en la cantidad de transcrito *hilD* (López-Garrido *et al.*, 2014). La fusión de la 3' UTR al gen de la GFP disminuía su expresión, indicando que la 3' UTR actúa como un módulo independiente que facilita la degradación del mRNA en el degradosoma. En otro estudio realizado en *S. aureus* por nuestro grupo de investigación, se observo que un tercio de los transcritos producidos en *S. aureus* tienen 3'UTRs de más de 100 nucleótidos. De entre estas 3'UTRs largas destacaba especialmente la del gen que codifica para el represor de la síntesis de exopolisacárido PIA/PNAG, *icaR* (Ruiz de Los Mozos *et al.*, 2013). La delección de la región 3'UTR de *icaR* provocaba la estabilización del mRNA de *icaR* e incrementaba la cantidad de proteína. Un análisis detallado de la estructura secundaria del mRNA de *icaR* sugería una posible hibridación entre el dominio UCCGUG presente en la región 3' con el sitio de unión al ribosoma localizado en la región 5'UTR. Los resultados mostraron que la hibridación de las regiones 5' y 3' de *icaR* provocaba por un lado la inhibición en la traducción del mRNA porque impedía la unión del ribosoma y por otro lado facilitaba la degradación del RNA de cadena doble a través de RNasa III. Los estudios con las 3' UTR de *hilD* e *icaR* mostraban por primera vez que las regiones 3'UTRs bacterianas pueden tener un papel en la regulación de la expresión génica (López-Garrido *et al.*, 2014).

Otra función de las regiones 3' UTR que tiene influencia en la expresión génica es como fuente de RNAs reguladores. Estos sRNAs pueden generarse a partir de un promotor propio e independientemente de la expresión del mRNA con el que solapa, o como consecuencia del procesamiento del mRNA. Lógicamente, en el segundo caso, el

sRNA solo se produce en el caso de que el mRNA se transcriba. El grupo de J. Vogel, ha mostrado que *S. entérica* produce un sRNA denominado CpxQ a partir del procesamiento realizado por RNasaE del extremo 3'UTR del mRNA *cpxP* (Chao and Vogel, 2016) (Miyakoshi *et al.*, 2015). En esta estrategia, a partir del mismo mRNA (*cpxP*) se produce una chaperona (CpxP) que controla la expresión de proteínas mal plegadas que se acumulan en el periplasma y tras su procesamiento por RNasaE un sRNA regulador (CpxQ) que evita la síntesis de dichas proteínas en el citosol. La vía Cpx y el sRNA CpxQ son necesarios para la supervivencia de la bacteria en condiciones de disipación de potencial de membrana lo que evidencia la importancia de este tipo de mecanismos de regulación.

### 3.3. Transcripción solapante

El termino transcripción solapante se refiere a dos RNA cuya secuencia es complementaria porque se producen a partir de la transcripción de una misma secuencia de DNA leída en direcciones opuestas. El efecto regulador de los RNA solapantes fue inicialmente descrito estudiando los mecanismos de replicación de determinados plásmidos. En el estudio del plásmido R1 de *E. coli* se observó que su replicación estaba regulada por un RNA denominado CopA. CopA es un RNA no codificante constituido por 93 nucleótidos que se caracteriza por su estructura de horquilla interrumpida por varios nucleótidos desapareados. En el plásmido R1 se forma un complejo fuertemente estable entre el RNA CopA y el mRNA diana CopT que inhibe la replicación del plásmido a través de este mecanismo de transcripción solapante (Stougaard *et al.*, 1981). Años después se observó que la secuencia de inserción IS10 puede reprimir la síntesis de su propia transposasa a nivel traduccional. La inhibición en la síntesis de esta proteína se debe al solapamiento que se produce entre el mRNA de la transposasa y un sRNA procedente de la secuencia IS10. Ambos transcritos tienen una región de complementariedad de 36 pb que incluye el codón de inicio de la traducción de la transposasa, esto impide la unión del ribosoma al mRNA lo que provoca la inhibición en la traducción de la proteína (Simons and Kleckner, 1983). Hasta este momento y dado que las técnicas no eran lo suficientemente sensibles, la existencia de transcripción solapante no era fácilmente identificable (Brantl, 2007). El análisis transcriptómico ha mostrado que una gran cantidad del genoma bacteriano se transcribe de forma solapante. La transcripción solapante se puede producir entre un mRNA y un RNA no codificante o dos mRNA. Aunque ambos RNAs tienen que tener su

propio promotor, la región promotora de muchos de los RNA antisentido identificados no esta bien definida. El tamaño de la región solapante es muy variable, y tenemos ejemplos de asRNAs de 77 nucleótidos como SymR de *E. coli* (Kawano *et al.*, 2007) pero también de 2Kb como ocurre en *L. monocytogenes* con una de sus 5'UTR largas que solapa con tres genes que intervienen en la síntesis del flagelo (Toledo-Arana *et al.*, 2009).

La transcripción solapante puede regular la expresión de los genes a nivel de la transcripción, promoviendo la degradación o estabilización del mRNA, o a nivel de la traducción. A continuación, se describe como pueden tener lugar estos procesos de regulación

### 3.3.1. Degradación del RNA “sentido”

Los asRNAs pueden inducir la degradación de los mRNA sentido. En *S. enterica* ser. Typhimurium el asRNA denominado AmgR (1,2kb) es complementario a la región *mgtC* del operón *mgtCBBR*. La expresión de AmgR promueve la disminución de MgtC y MgtB en un proceso que requiere de RNasaE e independiente de RNasa III (Lee and Groisman, 2010).

### 3.3.2. Estabilización del mRNA

La transcripción solapante puede tener un efecto en la estabilidad del mRNA promoviendo su corte por endorribonucleasas o exonucleasas. En bacterias las dos endorribonucleasas que se asocian principalmente con esta función son RNasa III y RNasaE (Thomason and Storz, 2010). Este tipo de mecanismo de regulación se observa en *E. coli* donde GadY es un tipo de RNA regulador codificado en la hebra opuesta y dirección contraria a *gadX* y *gadW*, que además solapa con ambos en su región intergénica. El mRNA producido por *gadX* y *gadY* se procesa en la zona de complementariedad con GadY dando lugar a dos transcritos que se acumulan en mayor cantidad que el mRNA sin procesar. Parte de este procesamiento se realiza por RNasa III aunque parece que hay más endorribonucleasas implicadas (Opdyke *et al.*, 2004; Opdyke *et al.*, 2011).

### 3.3.3. Regulación de la traducción

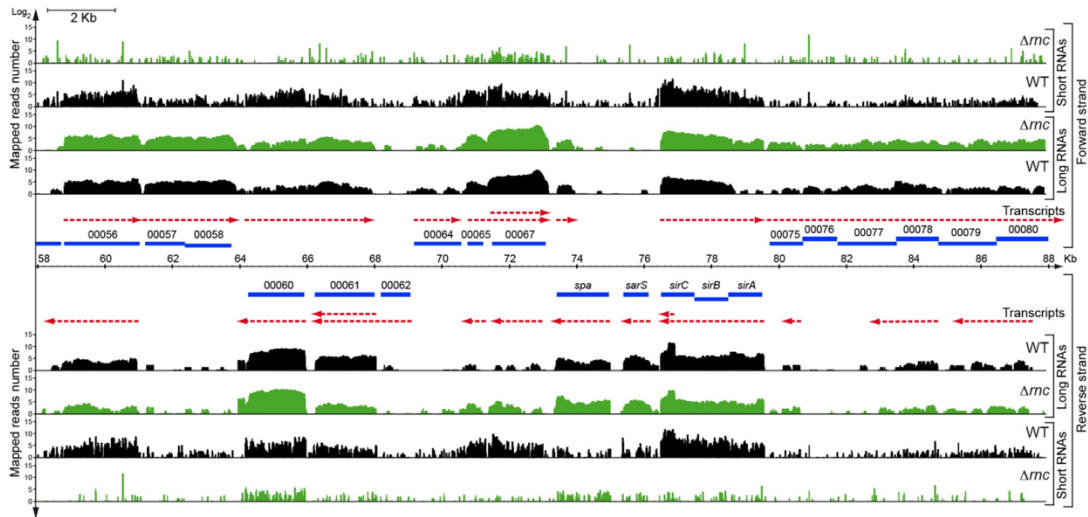
Al igual que ocurre con los RNAs codificados en “trans” que a menudo se unen a la secuencia Shine-Dalgarno (SD) del mRNA, la transcripción solapante pueden actuar

inhibiendo la traducción (Sesto *et al.*, 2013). Un ejemplo de regulación a nivel de la traducción lo encontramos en *E. coli* donde se estudió el par sentido/antisentido: SymE/SymR. La interacción entre SymR y el mRNA de *symE* provoca que la secuencia SD sea inaccesible para el ribosoma lo que bloquea la producción de SymE. En ausencia de SymR la cantidad de transcrito *symE* apenas aumenta, sin embargo, hay un gran incremento a nivel de proteína. Esto quiere decir que SymR tiene un efecto moderado con respecto a la estabilidad del transcrito y que su función principal es inhibir la traducción de SymE (Kawano *et al.*, 2007).



#### 4. Transcriptoma de *S. aureus*

En un estudio previo de nuestro laboratorio determinamos el transcriptoma de *S. aureus* (Lasa *et al.*, 2011). La singularidad de este análisis radicó en que se secuenció no sólo la fracción de RNAs largos, sino también la fracción de RNAs menores a 50 nucleótidos. La fracción de RNAs cortos no se había analizado hasta ese momento debido a que contiene una gran cantidad de RNAs de transferencia (tRNA) así como el RNA ribosomal 5S, lo que hacía pensar que su análisis no aportaría ninguna información relevante. La novedad metodológica que se introdujo en ese estudio fue la purificación de la fracción de RNAs menores a 50 nucleótidos adaptando un protocolo que se había utilizado previamente en *Drosophila* para purificar microRNAs (Czech *et al.*, 2008). Las librerías de RNA-seq que se construyeron a partir de ambas fracciones se secuenciaron mediante RNA seq (Illumina Genome Analyzer II). El análisis de los resultados reveló que los RNAs cortos se acumulaban de forma simétrica en regiones que coincidían con zonas donde los resultados de RNA-seq de RNA largos identificaba zonas de solapamiento de RNA sentido/antisentido (**Figura 4**). Otra particularidad que puso de manifiesto el análisis de las librerías de RNAs cortos era que su acumulación en ambas cadenas era similar, sugiriendo que los RNAs cortos eran el producto del procesamiento de estas regiones en las que un transcrito generado en la hebra sentido solapaba con otro transcrito generado en la hebra antisentido generando una región de RNA de cadena doble. Posteriormente se observó que el procesamiento de los RNAs solapantes y la generación de los RNAs cortos dependía de la actividad de la enzima RNasa III, la única endoribonucleasa de cadena doble presente en el genoma de *S. aureus* (Anderson and Dunman, 2009). En ausencia de RNasa III, la acumulación simétrica de RNAs cortos en las regiones de solapamiento de RNAs largos desaparecía completamente, sin que el patrón de expresión de los mRNAs se modificase significativamente (Lasa *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Esta imagen representa la información transcriptómica obtenida a partir de la secuenciación de los RNAs largos y cortos de *Staphylococcus aureus* en una región de 30 kb del genoma de *S. aureus*, lo que representa 1% del genoma de la bacteria. Las líneas azules representan ORFs y las flechas rojas transcritos detectados. En negro se representa la información correspondiente a la wild type y en verde el mutante en RNasa III (Lasa *et al.*, 2011).

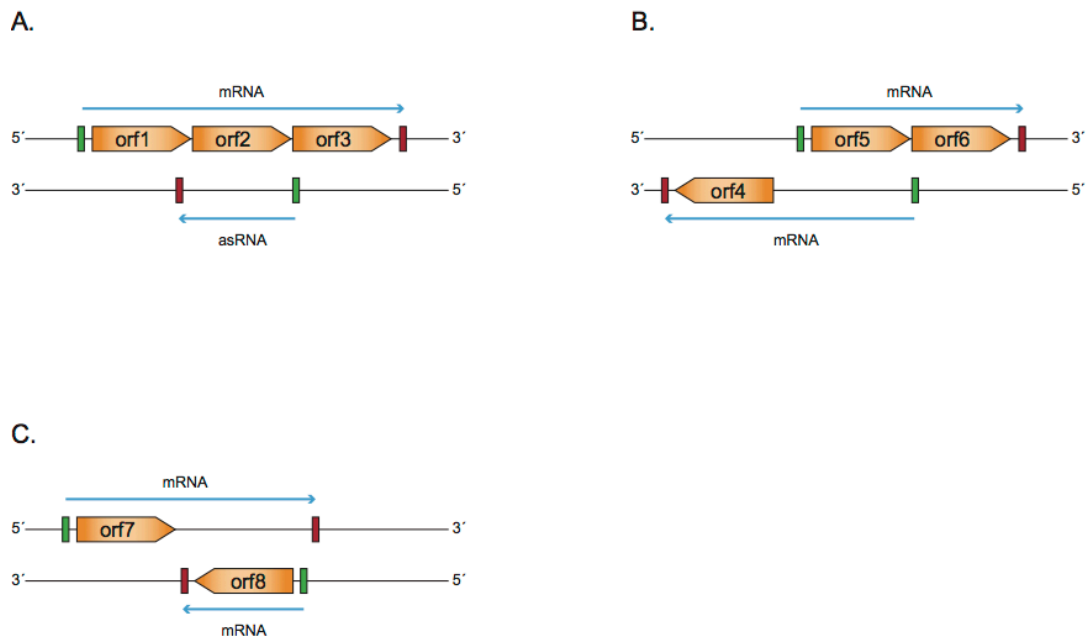
A partir de este estudio se identificaron varias formas de transcripción solapante en *S. aureus* (Figura 5) (Lasa *et al.*, 2012):

- *RNAs antisentido*: Son transcritos no codificantes que solapan parcial o completamente con transcritos producidos en la otra hebra (**Figura 5A**).

- *5'UTR solapantes*: El promotor de un gen está localizado aguas arriba del mismo siendo esta región del transcrito la que solapará con el transcrito que se produzca desde la hebra contraria (**Figura 5B**).

- *3'UTRs solapantes*: Los terminadores de un gen se localizan aguas abajo a una distancia muy grande del final de la región codificante del RNAm y eso provoca que se solape con el final del gen adyacente que se transcribe en dirección contraria. En algunos casos, el solapamiento se produce porque el terminador tiene escape y la transcripción continua en un porcentaje más allá del terminador. (**Figura 5C**).

En todos los ejemplos de transcripción solapante debido a solapamiento entre las regiones 5' y 3' UTRs, el proceso de solapamiento, podría ser fácilmente evitado, poniendo los promotores o terminadores más próximos a la región codificante del gen o situando el gen solapante en otra región del genoma. El hecho de que durante la evolución se haya seleccionado la existencia del solapamiento y no se haya evitado su existencia, es una sólida evidencia de que debe de jugar un papel regulador.

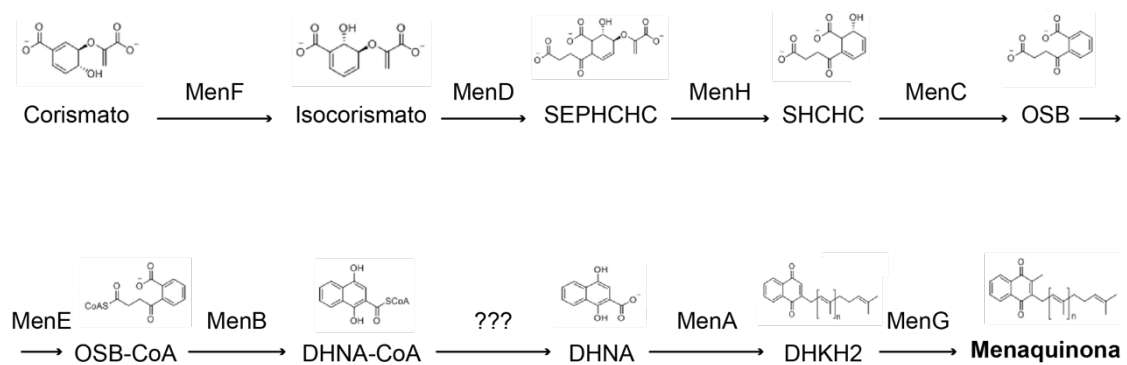


**Figura 5.** Tipos de transcripción solapante en *Staphylococcus aureus* (A) RNAs cis-antisense (B) 5'UTRs solapantes (C) 3'UTRs solapantes (Lasa *et al.*, 2012).

En este estudio también se analizó si el proceso de digestión de RNAs solapantes mediado por RNasa III era un proceso específico de *S. aureus* o si ocurría también en otras bacterias. Para responder a estas preguntas se analizaron las fracciones de RNAs cortos en tres bacterias gram positivas (*E. faecalis*, *L. monocytogenes* y *B. subtilis*) para las que existían estudios transcriptómicos previos (Rasmussen *et al.*, 2009; Toledo-Arana *et al.*, 2009; Fouquier d'Hérouel *et al.*, 2011). Los resultados evidenciaron una acumulación de cantidades simétricas de RNAs cortos en aquellas regiones en las que los estudios previos mostraban la existencia de RNAs solapantes. Estos resultados sugerían que el proceso de digestión de los RNAs solapantes ocurre de forma generalizada en las bacterias gram positivas. Sin embargo, un estudio similar de secuenciación de la fracción de RNAs cortos en la bacteria *S. enteritidis* no consiguió mostrar la existencia de fracciones de RNAs cortos que se acumulasen de forma simétrica en aquellas regiones donde se produce transcripción solapante. La interpretación más simplista de estos resultados es que el proceso de digestión de RNAs solapantes no ocurre en bacterias gram negativas. Otra posible interpretación es que las bacterias gram negativas tengan un sistema de procesamiento similar pero que los fragmentos cortos resultantes de la digestión sean inmediatamente degradados por la acción de otras ribonucleasas, lo que impide su purificación. En apoyo de esta segunda hipótesis, Lybecker *et al.* realizaron un estudio en el que inmunoprecipitaron todos los RNAs de cadena doble existente en la bacteria *E. coli* utilizando un anticuerpo que reconoce la estructura del RNA de cadena doble independientemente de la secuencia (Lybecker *et al.*, 2014). Los resultados de este estudio mostraron que en un mutante en RNasa III la cantidad de RNA de cadena doble era muy superior a la bacteria salvaje, indicando que RNasa III degrada el RNA solapante existente en la bacteria.

## 5. Síntesis de menaquinona en *Staphylococcus aureus*

La menaquinona, también denominada vitamina K<sub>2</sub>, es la molécula que actúa como primer aceptor de electrones de la cadena transportadora y tiene por función ceder los electrones captados del NADH y FADH<sub>2</sub> a los citocromos. Las moléculas de NADH y FADH<sub>2</sub> se obtienen en el ciclo de krebs tras la degradación del piruvato que proviene de la glucólisis. Los electrones que provienen de las moléculas de NADH y FADH<sub>2</sub> llegan a la cadena transportadora donde la menaquinona actúa como aceptor y los conduce hasta los grupos hemo de los citocromos bd y aa<sub>3</sub> desde donde accederán a la proteína integral de membrana denominada F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPasa. Esta enzima, gracias a un gradiente de protones, sintetiza moléculas de ATP que proporcionan a la bacteria la energía necesaria para llevar a cabo procesos biológicos (Zamboni and Sauer, 2003; Proctor *et al.*, 1998; McNamara and Proctor, 2000). La menaquinona se sintetiza a partir de corismato en una serie reacciones en las que intervienen, al menos, ocho enzimas (**Figura 6**). Esta quinona también se puede obtener a partir de precursores sintéticos como menadiona o hemina (**Figura 7**) (Lu *et al.*, 2012)

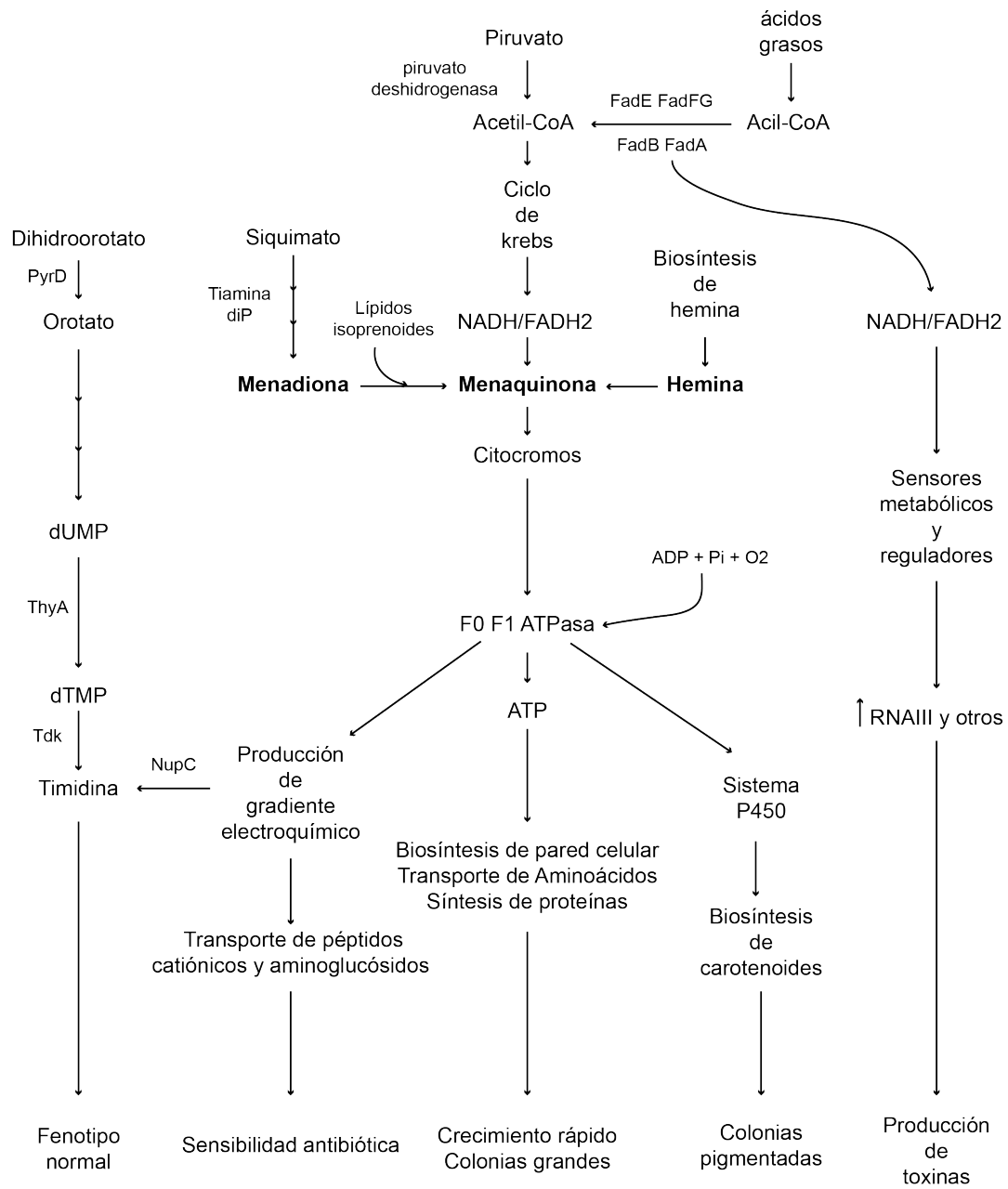


**Figura 6.** Síntesis de menaquinona en *S. aureus*.

Determinadas mutaciones en los genes necesarios para la síntesis de menaquinona producen un déficit de la misma que da lugar a un fenotipo denominado Small Colony Variant (SCV). Este fenotipo es frecuente en aislados de estafilococos procedentes de infecciones crónicas o persistentes y se ha especulado que es una adaptación de las bacterias a la vida intracelular (Proctor *et al.*, 1995; Kahl *et al.*, 1998; Lannergård *et al.*, 2008). Con el objetivo de entender las bases genéticas para la formación de SCVs se han realizado varios estudios clínicos. En uno de ellos se obtuvieron aislados de *S. aureus* con fenotipo SCV de pacientes que estaban recibiendo largos tratamientos con antibióticos. Al realizar la secuenciación de los genes implicados en la síntesis de menaquinona observaron mutaciones en el gen *menB* en todos los aislados (Lannergård *et al.*, 2008). En otro estudio clínico se obtuvieron aislados clínicos de *S. aureus* causantes de distintas infecciones. Tras realizar la secuenciación de los genes responsables de la síntesis de menaquinona se observaron polimorfismos a nivel de nucleótido en los genes *menE*, *menC* y *menF* (Dean *et al.*, 2014). También se realizaron estudios utilizando mutantes en *menC*, *menE*, *menB*, *menA* y *menG* para evaluar el efecto de las mismas en la síntesis de menaquinona. Los resultados mostraron que todas estas mutaciones dan lugar a fenotipo SCV provocado por un déficit en la síntesis de menaquinona, excepto la mutación realizada en *menG* que conserva su fenotipo salvaje. Se cree que la dimetilmenaquinona (molécula que precede a la menaquinona en la ruta de síntesis) puede tener un papel similar que la menaquinona en la bacteria (Wakeman *et al.*, 2012; Proctor *et al.*, 2006). Las SCVs deficientes en el transporte de electrones se caracterizan por un ritmo lento de crecimiento, disminución en la pigmentación, pérdida de actividad hemolítica, menor actividad coagulasa, reducción en la utilización de carbohidratos, menor producción de factores de virulencia, mayor resistencia a aminoglucósidos, ausencia de RNAlII y disminución en la síntesis de toxinas (McNamara and Proctor, 2000). Para la síntesis de la pared celular bacteriana se requiere un gran aporte de energía, como las SCVs deficientes en el transporte de electrones tienen una producción de ATP insuficiente, la bacteria va a crecer lentamente y con tamaño reducido. Por otro lado, el transporte de electrones está directamente relacionado con la síntesis de carotenoides por lo que en su defecto las colonias se despigmentan. La limitación en la actividad coagulasa y la disminución en la síntesis de aminoácidos se debe a que la bacteria reduce la síntesis de componentes no esenciales. Para importar moléculas cargadas como pueden ser los aminoglucósidos se requiere gradiente electroquímico, un defecto en el gradiente hace que las bacterias sean resistentes a estos antibióticos (Proctor *et al.*, 1998). Como



consecuencia, las SCV son resistentes a esta familia de antibióticos (Figura 7). La asociación entre el fenotipo SCV y la persistencia siempre ha llamado la atención de los grupos estudiando la patogénesis asociada a esta bacteria. Sin embargo, el estudio de este fenotipo resulta muy complejo, porque en muchos casos el fenotipo SCV resulta reversible y tras el crecimiento de las bacterias en medios de laboratorio el fenotipo desaparece, sugiriendo que existe un proceso de regulación génica que da lugar al fenotipo transitorio de SCV y no se deba a mutaciones en los genes implicados en su síntesis.



**Figura 7.** Modelo de vías metabólicas y energéticas asociadas a el fenotipo *small colony variant* (Proctor et al., 2006).

# OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS

En base a los resultados obtenidos en el análisis del mapa transcriptómico de *Staphylococcus aureus*, en esta tesis nos planteamos analizar una nueva arquitectura de transcripción utilizando como modelo el grupo de genes *menEC*, *ytkD-MW1731* y *MW1733* que son necesarios para la síntesis de menaquinona.

Los objetivos concretos que hemos abordado han sido:

1. Analizar si *menEC* y *ytkD-MW1731* constituyen una única unidad de transcripción.
2. Estudiar el efecto que esta organización transcripcional tiene sobre la expresión de *MW1733*.
3. Analizar el papel de RNasa III en la regulación de esta estructura transcripcional.



# MATERIAL Y MÉTODOS

---





## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Estirpes bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos, y condiciones de cultivo.

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el estudio están enumerados en la **Tabla 1**, **Tabla 2** y **Tabla 3** respectivamente. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Stabvida (Caparica-Portugal). Las cepas de *Staphylococcus aureus* se crecieron en TSB (trypticase soy broth) suplementado con 0,25% de glucosa (TS-gluc) (Pronadisa). Cuando las bacterias requerían crecimiento selectivo el medio era suplementado con los antibióticos apropiados a las siguientes concentraciones: eritromicina (Em) 1.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  o 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , ampicilina (Amp) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 2. Electrocompetentes de *Staphylococcus aureus*

Las bacterias electrocompetentes de *S. aureus* se obtuvieron siguiendo un protocolo ya establecido (Schenk and Laddaga, 1992). A modo de resumen, las bacterias se crecieron en 200 ml de medio de cultivo B2 a 37°C en agitación (200 rpm) hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Posteriormente el cultivo se incubaba 15 min en hielo y después era centrifugado. El pellet era lavado tres veces con agua estéril fría y una vez con 30 ml de glicerol 10% frío. El pellet resultante era resuspendido en 15 ml de glicerol 10% frío e incubado durante 15 min a 20°C. El cultivo era centrifugado y el pellet bacteriano era resuspendido en 200  $\mu\text{l}$  de glicerol 10% frío a partir del que se realizaban alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  que se congelaban en N<sub>2</sub> líquido y almacenaban a -80°C.

### 3. Construcción de plásmidos

Para la obtención de los plásmidos utilizados en este estudio amplificamos mediante PCR los fragmentos de DNA a partir del DNA cromosómico de la cepa de *S. aureus* MW2 con el enzima DNA polimerasa Phusion High Fidelity (Thermo Scientific) y los oligonucleótidos correspondientes (**Tabla 3**). Los productos de PCR se purificaron con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y ligaron al plásmido pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) para posteriormente transformar la cepa de *E. coli* XL1-blue (Stratagene). Para obtener el plásmido, crecimos las bacterias ON y utilizamos el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Posteriormente el plásmido era digerido con enzimas de restricción FastDigest (Thermo Scientific). Una vez obtenidos los fragmentos de DNA se purificaban y ligaban con el kit Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific) a los plásmidos finales pCN40 y pMAD (ver generación de mutantes). Tras verificar las secuencias de los plásmidos, se transformaba mediante electroporación la

cepa de *S. aureus* RN4220 a partir de la cual se extraían los plásmidos finales que serían electroporados en la cepa final de *S. aureus* MW2 o derivadas.

El plásmido pCN40 *MW1733-3XFLAG* se diseñó para expresar constitutivamente *MW1733*. Realizamos una amplificación del gen *MW1733* mediante PCR a partir del DNA cromosómico de la cepa de *S. aureus* MW2 *MW1733-3XFLAG* (oligonucleótidos *MW1733-Flag-pCN-BamHI/MW1733-Flag-pCN-EcoRI*) (**Tabla 3**) en la que incluimos las dianas de restricción BamHI/EcoRI. Digerimos el plásmido pCN40 y el fragmento amplificado con los enzimas BamHI/EcoRI para posteriormente realizar la ligación entre ambos. Finalmente transformamos las cepas de *S. aureus* *menC-3XFLAG*, *MW1731-3XFLAG* y  $\Delta Pmen$  con el plásmido final pCN40 *MW1733-3XFLAG*.

#### 4. Generación de mutantes

Los mutantes se obtuvieron mediante reemplazo alélico utilizando el plásmido pMAD (Arnaud *et al.*, 2004) siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Valle *et al.*, 2003). A modo de resumen, estos plásmidos contienen dos fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases fusionados entre sí. Ambos fragmentos flanquean las regiones derecha e izquierda de la región a modificar. La cepa de *S. aureus* MW2 se transforma con el plásmido pMAD resultante mediante electroporación y posteriormente tiene lugar el proceso de recombinación homóloga. Finalmente, las colonias eritromicina sensibles que no contienen el vector pMAD se chequean mediante PCR con los oligonucleótidos adecuados para cada mutante. A continuación, se describen detalladamente como se obtuvieron los distintos mutantes:

Para obtener los mutantes  $\Delta Pmen$  y  $\Delta PMW1733$  realizamos una delección de 64 pares de bases en la región promotora del operón ( $\Delta Pmen$ ) y una delección de 27 pares de bases en la región promotora de *MW1733* ( $\Delta PMW1733$ ) utilizando los plásmidos pMAD:: $\Delta Pmen$  and pMAD:: $\Delta PMW1733$  respectivamente (**Tabla 2**). Los mutantes se chequearon mediante PCR utilizando los oligonucleótidos  $\Delta PmenE/\Delta PmenF$  ( $\Delta Pmen$ ) y  $\Delta PMW1733E/\Delta PMW1733F$  ( $\Delta PMW1733$ ) (**Tabla 3**).

Para generar los mutantes *PblaZ-men* y *PblaZ-MW1733* se reemplazaron los promotores de *menEC* y *MW1733* por promotores constitutivos *PblaZ* que se amplificaron por PCR a partir del plásmido pCN40 (Charpentier *et al.*, 2004) (pCN40-*PblaZ-fw-EcoRI/pCN40-PblaZ-rv-XmaI*) (**Tabla 3**) y se incluyeron en los plásmidos pMAD::*PblaZ-men* y pMAD::*PblaZ-MW1733* (**Tabla 2**). Los mutantes se chequearon

mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PblaZ-men-E/PblaZ-men-F (*PblaZ-men*) y PblaZ-MW1733-E/PblaZ-MW1733-F (*PblaZ-MW1733*) (**Tabla 3**).

Para obtener los mutantes *menC*-3XFLAG, *MW1731*-3XFLAG, *MW1733*-3XFLAG se añadió la secuencia 3XFLAG (Uzzau *et al.*, 2001) al extremo C-terminal de los genes utilizando los plásmidos pMAD::*menC*-3XFLAG, pMAD::*MW1731*-3XFLAG and pMAD::*MW1733*-3XFLAG respectivamente (**Tabla 2**). Los mutantes *MW1733*-3XFLAG y *menC*-3XFLAG se chequearon mediante PCR utilizando los oligonucleótidos MW1733-Flag-E/MW1733-Flag-F y *menC*-Flag-E/*menC*-Flag-F respectivamente y los mutantes *MW1731*-3XFLAG se confirmaron utilizando los oligonucleótidos MW1731-Flag-E/MW1731-Flag-F (**Tabla 3**).

Para inactivar el gen *rnc* utilizamos el plásmido pMAD::*Δrnc::cat86* (pLUG774) que se diseñó en un estudio previo (Lasa *et al.*, 2011). Los mutantes *Δrnc* se chequearon mediante PCR con los oligonucleótidos *rncG/rncH* (**Tabla 3**).

Para obtener los mutantes *ΔPMW1733 MW1733*-3XFLAG *trans* y *ΔPMW1733 PblaZ-men MW1733*-3XFLAG *trans* se diseñó un plásmido derivado del plásmido pMAD para la inserción de genes en el sitio inocuo *attB* del gen de la lipasa, el plásmido se denominó pINSA::*PMW1733*-3XFLAG-TT *trans* (**Tabla 2**). Los mutantes se chequearon mediante PCR con los oligonucleótidos INS-E/INS-F (**Tabla 3**).

Para generar los mutantes *ΔmenEC* realizamos una delección de 323 pares de bases de la región codificante de *menE* y una delección completa de *menC* utilizando el plásmido pMAD::*ΔmenEC* (**Tabla 2**). Los mutantes fueron chequeados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *ΔmenEC*-E/*ΔmenEC*-F (**Tabla 3**).

## 5. Extracción de RNA

Las bacterias se crecieron en 80 ml de TSB-gluc a 37°C en agitación (200 rpm) hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.8. Se recogieron 20 ml de cada cultivo, se centrifugaron y los pellets resultantes fueron congelados en N<sub>2</sub> líquido para posteriormente almacenarlos a -80°C. A partir de los pellets bacterianos se extrajo el RNA total utilizando un protocolo previamente descrito (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Brevemente, los pellets se resuspendieron en 400 μl de solución A (glucosa 10%, Tris 12.5 mM, EDTA 10 mM pH 7.6) y posteriormente se añadieron 60 μl de EDTA 0.5 M. La mezcla se transfirió a tubos Lysing Matrix B (MP Biomedicals) que contenían 500 μl de fenol ácido pH 4.5 (Ambion), la mezcla fue vortexeada. Las bacterias fueron lisadas mecánicamente con un dispositivo Fastprep-24™ 5G (MP Biomedicals) a velocidad 6.0 durante 45 s a 4°C. La

fase acuosa fue transferida a tubos de 2 ml que contenían 1 ml de TRIzol (Ambion), la mezcla fue vortexeada e incubada 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100 µl de cloroformo (Merck milipore), la mezcla fue vortexeada e incubada 3 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C. El RNA de la fase acuosa se precipitó mediante la adición de 500 µl de isopropanol (Merck milipore), la mezcla fue incubada durante 15 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron durante 15 min a 14.000 rpm a 4°C. Los pellets de RNA fueron lavados con etanol 75%. Los pellets secados se resuspendieron en agua DEPC (Ambion). Los RNAs fueron cuantificados utilizando el espectrofotómetro (BioPhotometer-epENDORF). Los RNAs se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

## 6. Síntesis de sondas de RNA

Las sondas de RNA específicas para la detección de los mRNAs (*MW1731-ytkD / menCE / MW1733*) se sintetizaron a partir de un producto de PCR que contenía la secuencia promotora del fago T7 en uno de sus extremos (**Tabla 3**). Se utilizó un microgramo del producto de PCR como molde para llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa del fago T7, 0.5 Mm de ATP, GTP, CTP y 50 mCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP con el kit Maxiscript (Ambion). Las sondas de RNA se trataron con TURBO DNAsal a 37°C durante 30 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 1 µl de EDTA 0.5M. Las sondas de RNA se purificaron en columnas Bio-spin 30 siguiendo las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad) y se utilizaron inmediatamente.

## 7. Northern-blot

Los Northern blots fueron realizados siguiendo el protocolo ya descrito (Ruiz de los Mozos *et al.*, 2003). A modo de resumen, el RNA total con concentraciones de 8-15 µg se separó en geles de agarosa precast 1.25% (Sigma) utilizando 1XNorthernMax Mops como running buffer (Ambion). Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron para verificar la carga de las muestras de RNA. Posteriormente los RNAs fueron transferidos a membranas de Nytran (tamaño de poro 0.2 µm) (Sigma) utilizando NorthernMax Transfer Buffer (Ambion). Los RNAs se cross-linkearon a la membrana con un UV Stratalinker 1800 (Stratagene). Las membranas fueron prehibridadas con la solución ULTRAhyb (Ambion) a 65°C durante al menos 30 min, a continuación, se añadieron las sondas específicas marcadas radiactivamente y se procedió a la hibridación con el RNA ON a 65°C. Tras el proceso de hibridación las

membranas se lavaron tantas veces como fue necesario con 2XSSC-0.1% SDS en lavados de 5 min a 65°C. El marcador de peso molecular utilizado fue RNA millenium Marker (Ambion). El revelado de las autoradiografías (Healthcare) se realizó a distintos tiempos de exposición dependiendo de lo requerido en cada experimento.

## 8. Western-blot

Las bacterias se cultivaron en 100ml de TSB-gluc a 37 °C en agitación (200 rpm) hasta una  $OD_{600nm}$  de 0.8. Los cultivos se centrifugaron y los pellets obtenidos se lavaron con 1ml de PBS 1X. Los pellets lavados se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS 1X. Las bacterias fueron lisadas mecánicamente con Fastprep-24™ 5G (MP Biomedicals) a velocidad 6.0 durante 45 s a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min y posteriormente se recogieron 400  $\mu$ l de la fase acuosa para la cuantificación de la concentración proteica de las muestras mediante el método de BCA (Thermo Scientific). Las muestras se ajustaron a concentraciones de proteína total de 10 a 40  $\mu$ g/ $\mu$ l añadiendo el volumen correspondiente de PBS 1X y Sample buffer. La mezcla resultante a la concentración deseada se desnaturizó hirviendo las muestras a 100°C durante 5 min. Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 15% y se tiñeron con 0.25% Coomassie brilliant blue R250 (Sigma) o con Ponceau para tener los controles de carga. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare) mediante electrotransferencia. Las membranas se bloquearon durante ON con leche desnatada al 5% resuspendida en PBS 1X con un 0.1% de Tween 20 (PBST). Las membranas se incubaron durante 1 h y 30 min con una dilución 1:500 de anticuerpo anti-3XFLAG conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Las proteínas menC, MW1731 y MW1733 fueron detectadas mediante el revelado de autoradiografías (Healthcare) a distintos tiempos de exposición utilizando el dispositivo ChemiDoc MP (BioRad) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## 9. Curvas de crecimiento

Se inocularon 5  $\mu$ l de cultivo bacteriano a una  $OD_{600nm}$  de 0.1 en 195  $\mu$ l de TSB-gluc para cada una de las cepas objeto de estudio y se incubaron durante 13 horas sin agitación a 37 °C. Los datos de crecimiento bacteriano se monitorizaron cada 30 min a una  $OD_{650nm}$  en el dispositivo Microplate reader SynergyH1 (Biotek). Para estudiar los efectos de la menadiona sobre el crecimiento se suplementó el medio de cultivo (TSB-gluc) con 10 ng/ml de menadiona (M5625, Sigma) en DMSO. En los ensayos de curvas

de crecimiento en condiciones de microaerofilia se añadió aceite de parafina en la superficie de cada pocillo. Para todos los ensayos los valores representados son las medias y desviaciones estándar de las medidas realizadas por triplicado.

#### 10. Ensayo de reducción Alamar Blue

Las cepas de *S. aureus* objeto de estudio se inocularon en TSB-gluc y se incubaron ON a 37 °C. El cultivo resultante se diluyó 1:100 en TSB-gluc en un volumen final de 1ml. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadió 100 µl de cada muestra y posteriormente 10 µl del reactivo Alamar Blue (Invitrogen). Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C, a continuación, se midió la fluorescencia de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La menadiona y el DMSO se añadieron a cada pocillo antes de la adición del reactivo Alamar Blue.

#### 11. Ensayo de consumo de oxígeno

Las bacterias se crecieron en TSB-gluc a 37°C hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.8. Se utilizaron 2ml de los cultivos y se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 30 min en presencia de 2.5% de azul de metileno (M4159, Sigma).

#### 12. Ensayo de producción de nitritos

Las bacterias se crecieron ON en el medio TSB-KNO<sub>3</sub> (0,2%) a 37°C en agitación con condiciones de microaerofilia. Los niveles de nitrito se midieron utilizando el Sistema del reactivo Griess (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, los cultivos se centrifugaron y se mezclaron 50 µl del sobrenadante con el mismo volumen de sulfanilamida en una placa de 96 pocillos, la mezcla se incubó durante 5 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 50 µl del reactivo N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) y se incubó durante 5 min en las mismas condiciones. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 13. Medida de la producción de L- y D-lactato

Se realizaron diluciones 1:100 en TSB-gluc de los cultivos bacterianos crecidos a 37°C ON. Los cultivos diluidos se crecieron a 37°C durante 15 horas. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados para la obtención del sobrenadante a partir del cual

se midieron el L- y D-lactato utilizando el método UV enzimático (NZYTech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 14. Antibiograma

Los cultivos se ajustaron a 0.5 en la escala McFarland y posteriormente se sembraron homogéneamente en placas de TSA agar. Los discos antibióticos (tobramicina, 30 µg; amicacina, 30 µg; gentamicina, 120 µg; kanamicina, 30 µg y estreptomina, 25 µg) (Oxoid) se colocaron en las placas de TSA agar con la ayuda del molde diseñado para proporcionar la distancia máxima entre discos. Las placas de TSA se incubaron a 37°C durante 24 horas. La captura de imágenes se realizó con un dispositivo ChemiDoc MP (BioRad).

#### 15. Ensayo de persistencia epitelial

Los ensayos de persistencia se llevaron a cabo como está descrito en (Valle et al., 2003). Brevemente, las células MAC-T se sembraron  $0.5 \times 10^5$  células MAC-T por pocillo en placas cultivo de tejidos con 24 pocillos. Una vez que las células estaban unidas ( $0.2 \times 10^6$  células por pocillo) se reemplazaba el medio de cultivo y las células se lavaban con PBS estéril. Se mezclaron vigorosamente los cultivos bacterianos que habían sido incubados ON y se añadieron en DMEM a las células monocapa en una multiplicidad de infección de 40. Las células se incubaron durante 1 hora y 30 min a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Para matar a las bacterias extracelulares se reemplazó el medio con 500 µl de DMEM que contenía 10 µg de gentamicina (Sigma) durante 2, 24, 48 y 72 horas. Antes de lisar las células eucariotas con el 0.1% de Tritón X-100 la monocapa de células se lavó tres veces con PBS estéril. El número de bacterias intracelulares se determinó realizando diluciones seriadas y plaqueo de las mismas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 16. Modelo de infección retro-orbital

Los ensayos de infección se llevaron a cabo en ratones hembra CD1 con 6 semanas de edad (Charles River). Para anestesarlas se utilizó una mezcla de ketamina (80 mg.ml<sup>-1</sup>) y xilacina (10 mg.ml<sup>-1</sup>). Para inocular vía retro-orbital a las ratonas se utilizó una solución de 100 µl que contenía 10<sup>7</sup> CFU de MW2, MW2  $\Delta$ PMW1733, MW2  $\Delta$ Pmen, MW2  $\Delta$ Pmen *PblaZ*-MW1733 y MW2  $\Delta$ PMW1733 MW1733-3XFLAG *trans*. Las

CFU de cada inóculo se cuantificaron realizando diluciones seriadas en TSA agar. Las ratonas fueron eutanasiadas 5 días post infección y el recuento de CFU a partir del tejido renal se realizó mediante diluciones seriadas en TSA agar.

### 17. Declaración de ética

Los ensayos con animales se realizaron siguiendo la Guía de la Comunidad Europea para el cuidado y uso de animales (Directive 2010/63/EU). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Pública de Navarra (Comité de ética, Experimentación Animal y Bioseguridad de la Universidad Pública de Navarra) (Protocolo aprobado PI-005/11). Los experimentos se llevaron a cabo en el animalario del Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra. Los animales fueron almacenados con condiciones ambientales controladas con agua y comida *ad libitum*. Las ratonas fueron eutanasiadas con inhalación de CO<sub>2</sub> y posterior dislocación cervical. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal.

### 18. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.01. La invasión de *S. aureus* en células MAC-T, susceptibilidad antibiótica y los experimentos de Alamar blue se analizaron mediante análisis simple de la varianza combinado con el test múltiple de bonferroni. Los experimentos de virulencia en ratonas se analizaron mediante análisis doble de la varianza combinado con el test múltiple de tukey.



Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio

Cepas	Características relevantes	MIC <sup>a</sup>	Referencia
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>			
15981	Cepa clínica. Biofilm positiva en TSBg	532	(Valle <i>et al.</i> , 2003)
15981 $\Delta$ rcn::cat86	Cepa 15981 mutante en RNasa III (delección del gen <i>rnc</i> e inserción de cassette de cloranfenicol)	1327	(Lasa <i>et al.</i> , 2011)
15981 $\Delta$ Pmen	Cepa 15981 con delección de 64pb de la región promotora del operón <i>men</i>	3136	Este estudio
15981 <i>PblaZ-men</i>	Cepa 15981 con promotor constitutivo <i>blaZ</i> en la región promotora del operón <i>men</i>	4205	Este estudio
15981 $\Delta$ PMW1733	Cepa 15981 con delección de 27pb de la región promotora del gen <i>MW1733</i>	3918	Este estudio
15981 <i>PblaZ-MW1733</i>	Cepa 15981 con promotor constitutivo <i>blaZ</i> en la región promotora de <i>MW1733</i>	4197	Este estudio
15981 $\Delta$ Pmen <i>PblaZ-MW1733</i>	Cepa 15981 con delección de 64pb de la región promotora del operón <i>men</i> y promotor constitutivo <i>blaZ</i> en la región promotora de <i>MW1733</i>	4418	Este estudio
15981 $\Delta$ Pmen pCN40:: <i>MW1733-3XFLAG</i>	Cepa 15981 con el plásmido pCN40:: <i>MW1733-3XFLAG</i>	4474	Este estudio
15981 $\Delta$ menEC	Cepa 15981 con delección de los genes <i>menE</i> y <i>menC</i>	4728	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG</i>	Cepa 15981 marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>menC</i>	4198	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG</i> $\Delta$ Pmen	Cepa 15981 $\Delta$ Pmen marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>menC</i>	4199	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG PblaZ-men</i>	Cepa 15981 <i>PblaZ-men</i> marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>menC</i>	4268	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG</i> $\Delta$ PMW1733	Cepa 15981 $\Delta$ PMW1733 marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>menC</i>	4267	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG PblaZ-MW1733</i>	Cepa 15981 <i>PblaZ-MW1733</i> marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>menC</i>	4200	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG PblaZ-MW1733</i> $\Delta$ rcn	Cepa 15981 <i>menC-3XFLAG PblaZ-MW1733</i> $\Delta$ rcn::cat86	5252	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG</i> $\Delta$ rcn	Cepa 15981 <i>menC-3XFLAG</i> $\Delta$ rcn::cat86	5185	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG</i>	Cepa 15981 marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1731</i>	4456	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> $\Delta$ Pmen	Cepa 15981 $\Delta$ Pmen marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1731</i>	4461	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG PblaZ-men</i>	Cepa 15981 <i>PblaZ-men</i> marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1731</i>	4462	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> $\Delta$ PMW1733	Cepa 15981 $\Delta$ PMW1733 marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1731</i>	4463	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG PblaZ-MW1733</i>	Cepa 15981 <i>PblaZ-MW1733</i> marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1731</i>	4464	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG PblaZ-MW1733</i> $\Delta$ rcn	Cepa 15981 <i>MW1731-3XFLAG PblaZ-MW1733</i> $\Delta$ rcn::cat86	7056	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> $\Delta$ rcn	Cepa 15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> $\Delta$ rcn::cat86	5179	Este estudio
15981 <i>MW1733-3XFLAG</i>	Cepa 15981 marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1733</i>	4429	Este estudio
15981 <i>MW1733-3XFLAG</i> $\Delta$ Pmen	Cepa 15981 $\Delta$ Pmen marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1733</i>	4431	Este estudio
15981 <i>MW1733-3XFLAG PblaZ-men</i>	Cepa 15981 <i>PblaZ-men</i> marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1733</i>	4433	Este estudio
15981 <i>MW1733-3XFLAG</i> $\Delta$ PMW1733	Cepa 15981 $\Delta$ PMW1733 marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1733</i>	4435	Este estudio
15981 <i>MW1733-3XFLAG PblaZ-MW1733</i>	Cepa 15981 <i>PblaZ-MW1733</i> marcada con el epítipo 3XFLAG en <i>MW1733</i>	4437	Este estudio
15981 <i>MW1733-3XFLAG PblaZ-men</i> $\Delta$ rcn	Cepa 15981 <i>MW1733-3XFLAG PblaZ-men</i> $\Delta$ rcn::cat86	5313	Este estudio
15981 <i>MW1733-3XFLAG</i> $\Delta$ rcn	Cepa 15981 <i>MW1733-3XFLAG</i> $\Delta$ rcn::cat86	5180	Este estudio
15981 $\Delta$ PMW1733 <i>MW1733-3XFLAG trans</i>	Cepa 15981 $\Delta$ PMW1733 expresando <i>MW1733-3XFLAG</i> con su propio promotor y terminador insertado en el sitio <i>attB</i> del gen de la lipasa	6542	Este estudio
15981 $\Delta$ PMW1733 <i>PblaZ-men</i> <i>MW1733-3XFLAG trans</i>	Cepa 15981 $\Delta$ PMW1733 <i>PblaZ-men</i> expresando <i>MW1733-3XFLAG</i> con su propio promotor y terminador insertado en el sitio <i>attB</i> del gen de la lipasa	6543	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG</i> pCN40	Cepa 15981 <i>menC-3XFLAG</i> con el plásmido pCN40	4202	Este estudio
15981 <i>menC-3XFLAG</i> pCN40:: <i>MW1733-3XFLAG</i>	Cepa 15981 <i>menC-3XFLAG</i> con el plásmido pCN40:: <i>MW1733-3XFLAG</i>	4203	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> pCN40	Cepa 15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> con el plásmido pCN40	4465	Este estudio
15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> pCN40:: <i>MW1733-3XFLAG</i>	Cepa 15981 <i>MW1731-3XFLAG</i> con el plásmido pCN40:: <i>MW1733-3XFLAG</i>	4466	Este estudio
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
XL1 Blue	Utilizada en clonajes		

<sup>a</sup>Cepas pertenecientes a el laboratorio de Patogénesis Microbiana

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados en este estudio

Cepas	Características relevantes	Referencia
pJET 1.2/blunt	vector de clonaje	Thermo Scientific
pMAD	Plásmido para <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> con origen de replicación termosensible en bacterias Gram +. Amp <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pMAD::ΔPmen	Plásmido pMAD que contiene la delección de 64pb de la región promotora del <i>operón men</i>	Este estudio
pMAD::PblaZ-men	Plásmido pMAD que contiene el promotor constitutivo <i>blaZ</i> para la expresión constitutiva del <i>operon men</i>	Este estudio
pMAD::ΔPMW1733	Plásmido pMAD que contiene la delección de 27pb de la región promotora de <i>MW1733</i>	Este estudio
pMAD::PblaZ-MW1733	Plásmido pMAD que contiene el promotor constitutivo <i>blaZ</i> para la expresión constitutiva de <i>MW1733</i>	Este estudio
pMAD::ΔmenEC	Plásmido pMAD que contiene la delección de los genes <i>menE</i> y <i>C</i>	Este estudio
pMAD::menC-3XFLAG	Plásmido pMAD que contiene el epítipo 3XFLAG para el marcaje de <i>menC</i> en el extremo C-terminal	Este estudio
pMAD::MW1731-3XFLAG	Plásmido pMAD que contiene el epítipo 3XFLAG para el marcaje de <i>MW1731</i> en el extremo C-terminal	Este estudio
pMAD::MW1733-3XFLAG	Plásmido pMAD que contiene el epítipo 3XFLAG para el marcaje de <i>MW1733</i> en el extremo C-terminal	Este estudio
pMAD::Δrnc::cat86 (pLUG774)	Plásmido pMAD para la delección del gen <i>rnc</i> e inserción de cassette de cloranfenicol	(Huntzinger <i>et al.</i> , 2005)
pINSA	Plásmido pMAD para inserción de genes en el sitio cromosómico <i>attB</i> de la lipasa	Este estudio
pINSA::PMW1733-3XFLAG-TT <i>trans</i>	Plásmido pMAD para la inserción de <i>MW1733-3XFLAG</i> con su propio promotor y terminador en el sitio cromosómico <i>attB</i> de la lipasa	Este estudio
pCN40	Plásmido para <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> para expresar genes con el promotor constitutivo P <sub>blaZ</sub> . Amp <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pCN40::MW1733-3XFLAG	Plásmido pCN40 que expresa constitutivamente <i>MW1733-3XFLAG</i>	Este estudio

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencia
<b>Sondas Northern blot</b>	
Probe-A-sense men	AGGGCATCCTGATGATAC
Probe-A-T7-sense men	TAATACGACTCACTATAGGGACCATTGCTCAATTACATGT
Probe-B-sense yktD-MW1731	CGAAGTTGAATCATTGGTA
Probe-B-T7-sense yktD-MW1731	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTCAATTGGCATTCTT
Probe-C-sense MW1733	ATTCTTGGCGATGATTAT
Probe-C-T7-sense MW1733	TAATACGACTCACTATAGGGTATGTGAATGCTGCTTGCTG
<b>Delección de la región promotora del operon <i>men</i></b>	
ΔPmen-A-BamHI	<u>GGATCCTTCCAGTGGCAAGGTACA</u>
ΔPmen-B-SalI	<u>GTCGACTTTGGGAGGAATAACGCA</u>
ΔPmen-C-SalI	<u>GTCGACAAAAGTAGACGAATTGATT</u>
ΔPmen-D-EcoRI	<u>GAATTCCTTCCAGCAGACTATGCACATA</u>
ΔPmen-E	CCAGCGAATTCAATATCAT
ΔPmen-F	TAGTAGGCCAACGATTGTA
<b>Clonaje del promotor constitutivo <i>PblaZ</i></b>	
pCN40-PblaZ-fw-EcoRI	<u>GAATTCAGCTTACTATGCCATTATTA</u>
pCN40-PblaZ-rv-Xmal	<u>CCCGGGTGCAGAATAAACCTCCG</u>
<b>Promotor constitutivo <i>PblaZ</i> en región promotora de operón <i>men</i></b>	
PblaZ-men-A-BamHI	<u>GGATCCTTCCAGTGGCAAGGTACA</u>
PblaZ-men-B1	<b>CGGAGGGTTATTCTGCA</b> TCGACTTTGGGAGGAATAACGCATGGACTTT
PblaZ-men-B2	AAAGTCCATGCGTTATCTCCAAAAGTCGACT <b>GCGAATAAACCTCCG</b>
PblaZ-men-C1	AATCATATCAATGAATCAATTCGTCTACTTT <b>AGCTTACTATGCCATTATTA</b>
PblaZ-men-C2	<b>TTAATAATGGCATAGTAAGCT</b> AAAAGTAGACGAATTGATTGATTGATGATGAT
pBlaZ-men-D-EcoRI	<u>GAATTCCTTCCAGCAGACTATGCACATA</u>
PblaZ-men-E	CCAGCGAATTCAATATCAT
PblaZ-men-F	TAGTAGGCCAACGATTGTA
<b>Delección de la región promotora de <i>MW1733</i></b>	
ΔPMW1733-A-BamHI	<u>GGATCCAATGGTACTATCTTGACGTA</u>
ΔPMW1733-B-EcoRI	<u>GAATTCGTAGGGATGTGATGCGCGT</u>
ΔPMW1733-C-EcoRI-Xmal	<u>GAATTCCTCCCGGGTATCGTTGGAGGCATTAAT</u>
ΔPMW1733-D-NcoI	<u>CCATGGGATGTTACACCAGCAGGT</u>
ΔPMW1733-E	TGATTGCAACCTCTCTAC
ΔPMW1733-F	AGCGATGCTGCTCGTAA
<b>Promotor constitutivo <i>PblaZ</i> en región promotora de <i>MW1733</i></b>	
PblaZ-MW1733-A-BamHI	<u>GGATCCAATGGTACTATCTTGACGTA</u>
PblaZ-MW1733-B-EcoRI	<u>GAATTCGTAGGGATGTGATGCGCGT</u>
pCN40-PblaZ-fw-EcoRI	<u>GAATTCAGCTTACTATGCCATTATTA</u>

Continuación en la siguiente página

**Tabla 3.** Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia
pCN40-Pblaz-rv-Xmal	<u>CCCGGG</u> TGCAGAATAAACCCCTCCG
Pblaz-MW1733-C-EcoRI-Xmal	<u>GAATTC</u> CCCCCGGGTATCGTTGGAGGCATTAAT
Pblaz-MW1733-D-NcoI	<u>CCATGG</u> GATGTTACACCAGCAGGT
Pblaz-MW1733-E	TGATTGCACCCCTCTCTAC
Pblaz-MW1733-F	AGCGATGCTTGCTCGTAA
<b>MW1731-3XFLAG</b>	
MW1731-Flag-A-BamHI	<u>GGATCCA</u> AGTTGAACATATTGCTGAAA
MW1731-Flag-B-Sall	<u>GTCGACT</u> AGTAGTAAACGTGGTGTG
MW1731-Flag-C-Sall	<u>GTCGAC</u> TTACTATTTATCGTCGTCATCTTTGTAGTCGATATCATGATC TTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCATATGGTCAACTTGT
MW1731-Flag-D-EcoRI	<u>GAATTC</u> AAGAGGCATGCTACGAAG
MW1731-Flag-E	AGCACAAGCAGAAGATTTA
MW1731-Flag-F	TCTCAGATATTGATTTAATGTA
<b>menC-3XFLAG</b>	
menC-Flag-A-BamHI	<u>GGATCCA</u> AATTACTATCGTTGGAGGC
menC-Flag-B-EcoRI	<u>GAATTC</u> ATGGTTATGTTTATGTGAATG
menC-Flag-C-EcoRI	<u>GAATTC</u> TTACTATTTATCGTCGTCATCTTTGTAGTCGATATCATGATC TTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCATATGGTGAATTGAGTTATA
menC-Flag-D-NcoI	<u>CCATGG</u> CTTTATATCGAAGAGCCATT
menC-Flag-E	AATGGTACTATCTTGCAAGTA
menC-Flag-F	TCAAATGTTTCATGACTGCTC
<b>MW1733-3XFLAG</b>	
MW1733-Flag-A-BamHI	<u>GGATCCA</u> AATTACTATCGTTGGAGGC
MW1733-Flag-B-EcoRI	<u>GAATTC</u> TTACTATTTATCGTCGTCATCTTTGTAGTCGATATCATGATC TTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCATGTTATGTTTATGTGAATG
MW1733-Flag-C-EcoRI	<u>GAATTC</u> ATATGGTTGTAATTGAGTTATA
MW1733-Flag-D-NcoI	<u>CCATGG</u> CTTTATATCGAAGAGCCATT
MW1733-Flag-E	AATGGTACTATCTTGCAAGTA
MW1733-Flag-F	TCAAATGTTTCATGACTGCTC
<b>Delección del gen rnc</b>	
rncG	TGTAATGGTGAATGATACAT
rncF	CAAGTTTATTTAATGATTCAGCCT
<b>Expresión de MW1733 en trans</b>	
INS-A-NcoI	<u>CCATGGT</u> AACGTTAGATGGCTCTGCAAAATTG
INS-B-EcoRI	<u>GAATTC</u> TACTATTTTAAATTCACACTGTG
P-MW1733-Trans-Sall	CCCGTCGACTTAACTTGACGATTATCTTTATCCCTAAACTCAGCGGC
P-MW1733-3XFLAG-Trans-EcoRI	CCGAATTCCTCCCTTTAGTGGATATAACTCAATTACAACCATATT AATTACTATTTATCGTCGCTCACT
INS-C-Sall	<u>GTCGACA</u> AGTGAATAAAGCGCCTGTC
INS-D-BamHI	<u>GGATCC</u> ATGCAGTGCACAGGTAATG

Continuación en la siguiente página

Tabla 3. Continuación

Oligonucleótidos	Secuencia
INS-E	GACTTGTGCGTGTGGAAG
INS-F	AGACCTAATGACGAAGCAATC
<b>Clonaje de MW1733-3xFLAG en el plásmido pCN40</b>	
MW1733-Flag-pCN-BamHI	<u>GGATCCAATTACTATCGTTGGAGGC</u>
MW1733-Flag-pCN-EcoRI	<u>GAATCCTTACTATTTATCGTCGCATCTTTGTAG</u>
<b>Delección de <i>menEC</i></b>	
$\Delta$ menEC-A-BamHI	<u>GGATCCAATTACTATCGTTGGAGGC</u>
$\Delta$ menEC-B-Sall-EcoRI	<u>GAATTCACGCGTCGACTTAATGGTTATGTTTATGTAATG</u>
$\Delta$ menEC-C-Sall	<u>GTCGACC</u> ATGATCTATTTTCAGCAATG
$\Delta$ menEC-D-EcoRI	<u>GAATTCGATAAATTC</u> AATGCCGAACA
$\Delta$ menEC-E	TGATTGCACCCCTCTCTAC
$\Delta$ menEC-F	AGTGTACTTTTAAGAGCTGT

Subrayado, sitio de la enzima de restricción incluido en el oligonucleótido

Gris, secuencia promotora del fago T7 para la RNA polimerasa

*Cursiva*, secuencia 3XFLAG

**Negrita**, secuencias del promotor *PblaZ*



# RESULTADOS

---





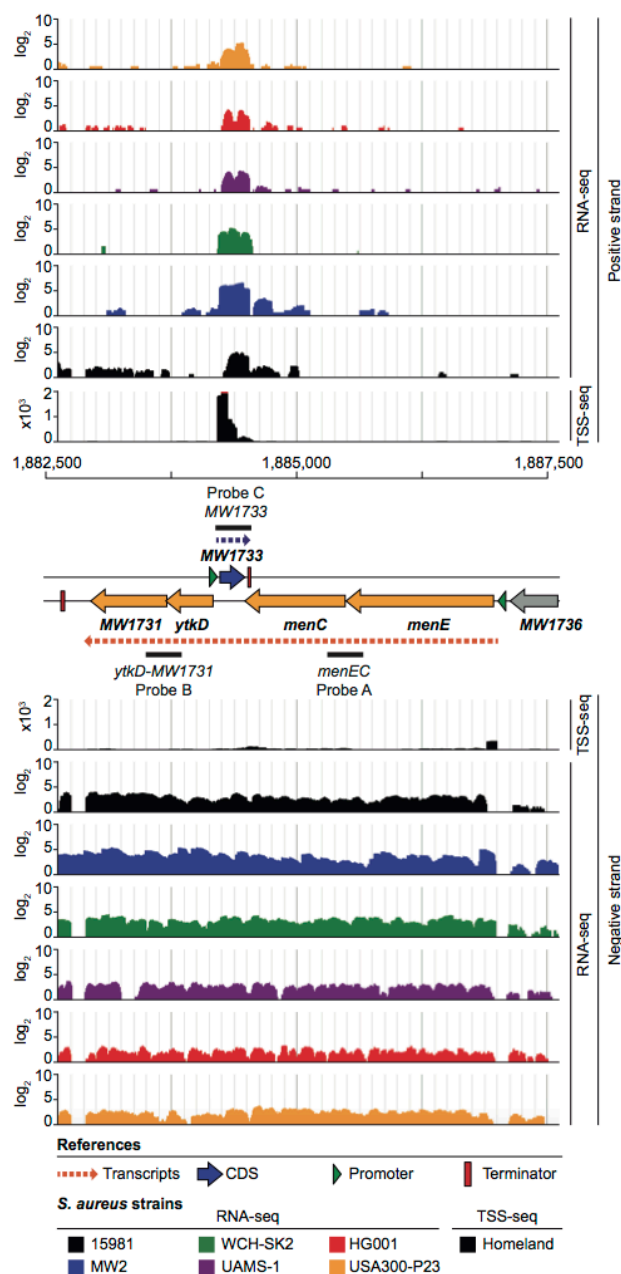
## RESULTADOS

### 1. Identificación de potenciales “operones no-contiguos” en el genoma de *S. aureus*

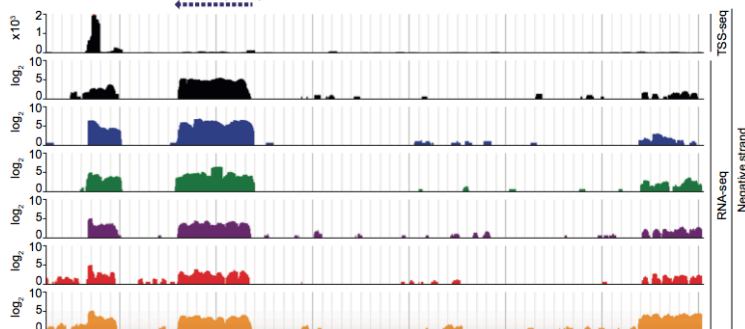
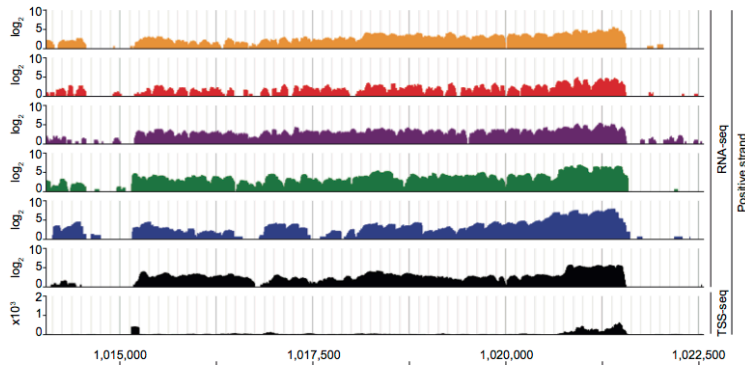
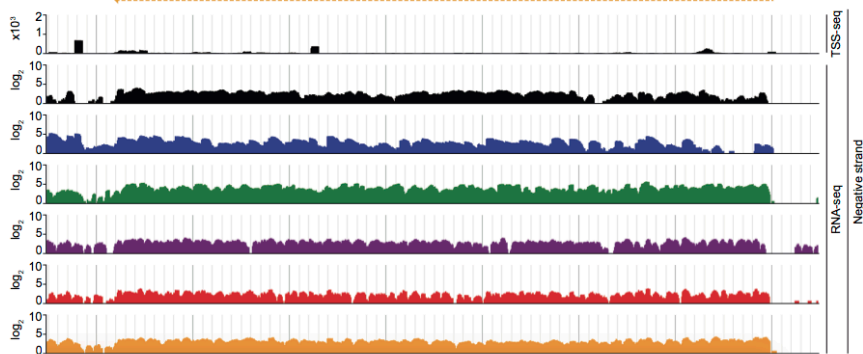
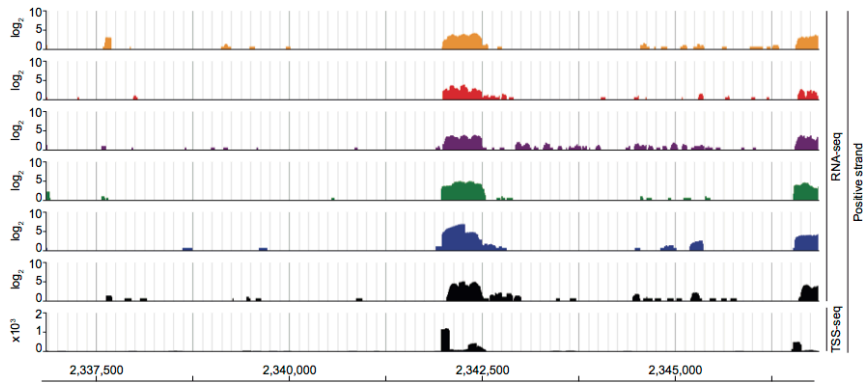
Con el objetivo de identificar transcritos policistrónicos que incluyeran en su interior un RNA intercistrónico realizamos un análisis exhaustivo de los datos transcriptómicos obtenidos a partir de las cepas clínicas de *S. aureus* 15981 y MW2 (Lasa *et al.*, 2011). Encontramos seis ejemplos que se correspondían con el modelo predicho (**Figuras 8, 9 y 10**). Para confirmar que estos resultados no eran exclusivos de nuestro análisis transcriptómico, analizamos los datos de secuenciación de RNA publicados por otros laboratorios (<http://rnamaps.unavarra.es/>) en cinco cepas de *S. aureus* que no estaban relacionadas genéticamente con las cepas 15981 y MW2. Los resultados confirmaron la presencia de este tipo de organización transcripcional en las regiones seleccionadas (**Figura 8, 9 y 10**). La función de la mayoría proteínas codificadas por los genes de los operones seleccionados no es conocida, aunque existen excepciones como: CoaD, que interviene en la vía de síntesis de coenzima A, MenADB y MenEC que son indispensables en la síntesis de menaquinona y MoaABCED que participa en el transporte de molibdato.

Para estudiar en detalle como este tipo de arquitectura condiciona la transcripción de ambos transcritos, elegimos la región que incluye los genes *menE*, *menC*, *MW1733*, *ytkD* y *MW1731*. La elección de este grupo de genes la hicimos basándonos en el tamaño de los transcritos y en la relevancia que la síntesis de menaquinona tiene durante el proceso de infección de *S. aureus* (Dean *et al.*, 2014) (**Figura 8**). Los programas de identificación de operones en los genomas bacterianos han venido utilizando tres criterios para definir que un grupo de genes contiguos se transcriben como operón: distancia pequeña entre genes consecutivos, conservación del orden de los genes en organismos relacionados, y la existencia de una relación biológica funcional entre las proteínas que codifican los genes del operón. Estos criterios, basados en el concepto clásico de operón, han impedido que cualquier otro tipo de organización de genes haya sido considerado como posible operón por los programas de predicción de operones. Así, en la base de datos de operones procariontes DOOR (<http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/>), *menE-menC* e *ytkD-MW1731* estaban anotados como dos operones independientes (Mao *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros datos transcriptómicos mostraban que los cuatro genes se transcriben como una única unidad transcripcional (**Figura 8**). En consonancia con nuestros resultados, un estudio dedicado a identificar los sitios de inicio de la transcripción (TSS) en el genoma de *S.*

*aureus* identificaba la existencia de un único sitio de inicio de la transcripción en la región promotora del gen *menE* (**Figura 8**) y ningún inicio de la transcripción para ytkD-MW1731 (Koch *et al.*, 2014).

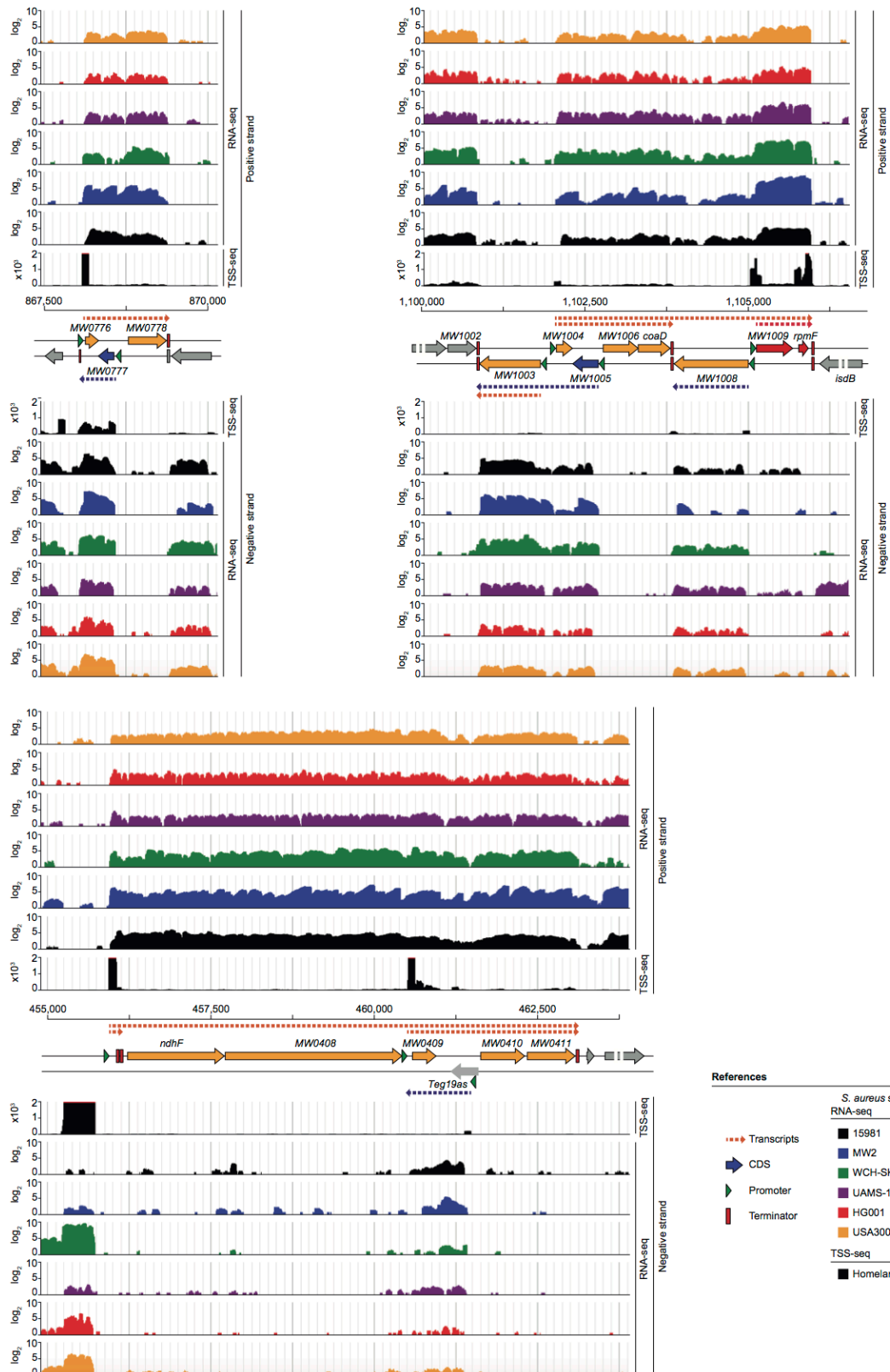


**Figura 8.** Análisis de la arquitectura de “operón no-contiguo”. Imágenes obtenidas con el software JBrowser del mapeo de lecturas de la región *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* en siete cepas de *S. aureus* obtenidas mediante RNA-seq o TSS-seq. El número de lecturas por posición nucleotídica viene indicado en la escala ( $\log_2$  o  $10^3$ ). En el centro de la figura está representada la arquitectura objeto de estudio. Las flechas naranjas representan las ORFs que constituyen el operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y la flecha azul representa el gen *MW1733*. Los triángulos verdes representan promotores y los rectángulos rojos terminadores transcripcionales. La flecha naranja discontinua representa el transcrito generado a partir del operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y la flecha azul discontinua al transcrito generado a partir de *MW1733*. La línea superior indica la posición en pares de bases del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2. Toda la información genética sobre el inicio y el final de la transcripción se obtuvo en un estudio previo (Lasa *et al.*, 2011). Los datos del RNA-seq se obtuvieron a partir de: 15981 (Lasa *et al.*, 2011), MW2 (este estudio), UAMS-1 (King *et al.*, 2018), HG001 (Poupel *et al.*, 2018), WCH-SK2 (Bui *et al.*, 2015), Homeland (Koch *et al.*, 2014), USA300-P23 (Yeo *et al.*, 2018).



References

S. aureus strains	
RNA-seq	
●●● Transcripts	■ 15981
➡ CDS	■ MW2
▶ Promoter	■ WCH-SK2
▬ Terminator	■ UAMS-1
	■ HG001
	■ USA300-P23
TSS-seq	
	■ Homeland



**Figuras 9-10.** Ejemplos de regiones del genoma de *S. aureus* con arquitectura característica de operón no-contiguo. Imágenes obtenidas con el software JBrowser que muestran la distribución de las lecturas en este tipo de regiones obtenidas mediante RNA-seq o TSS-seq en siete cepas de *S. aureus* no relacionadas. El número de lecturas por posición nucleotídica viene indicado en la escala ( $\log_2$  o  $10^3$ ). En el centro de cada panel están representados los distintos ejemplos que presentan esta arquitectura. Las flechas naranjas representan las ORFs que constituyen los operones y las flechas azules representan los genes intercalados. Los triángulos verdes representan promotores y los rectángulos rojos terminadores transcripcionales. Las flechas naranjas discontinuas representan los transcritos generados a partir de los operones no contiguos y las flechas azules discontinuas a los transcritos generados a partir de los genes intercalados que se transcriben desde la hebra contraria en dirección opuesta. La línea superior indica la posición en pares de bases del genoma de la cepa de *S. aureus* MW2. Todas las anotaciones sobre el inicio y el final de la transcripción se obtuvieron en un estudio previo (Lasa *et al.*, 2011). Los datos de RNA-seq pertenecen a 15981 (Lasa *et al.*, 2011), MW2 (this study), UAMS-1 (King *et al.*, 2018), HG001 (Poupel *et al.*, 2018), WCH-SK2 (Bui *et al.*, 2015), Homeland (Koch *et al.*, 2014), USA300-P23 (Yeo *et al.*, 2018).

## 2. Coexpresión de los genes *menE-menC-ytkD-MW1731*

Para demostrar experimentalmente que los genes *menE-menC-ytkD-MW1731* se transcriben conjuntamente, generamos dos cepas a partir de la cepa salvaje. En una de ellas delecionamos la región promotora situada aguas arriba del gen *menE* ( $\Delta Pmen$ ) y en la otra, reemplazamos esta región por la secuencia que contiene el promotor constitutivo *blaZ* (*PblaZ-men*) (**Figura 11**). Para cada una de estas cepas obtuvimos derivados en los que etiquetamos la copia cromosómica de los genes *menC* y *MW1731* con la secuencia 3XFLAG (**Figura 11**). A continuación, realizamos Western blot para estudiar los niveles de proteína MenC y MW1731 en las cepas salvaje,  $\Delta Pmen$  y *PblaZ-men*. En la cepa  $\Delta Pmen$  se observaba una disminución de los niveles de proteína MenC y MW1731 con respecto a la cepa salvaje. Los niveles de expresión de MenC todavía eran detectables, indicando que la delección de la región promotora de *menE* en la cepa  $\Delta Pmen$  no es total. Por otro lado, en la cepa *PblaZ-men*, los niveles de proteína MenC y MW1731 eran notablemente superiores a los de la cepa salvaje (**Figura 12A**). Estos resultados sugieren que la expresión tanto de *menE-menC* como de *ytkD-MW1731* dependen de la región promotora situada aguas arriba de *menE*.

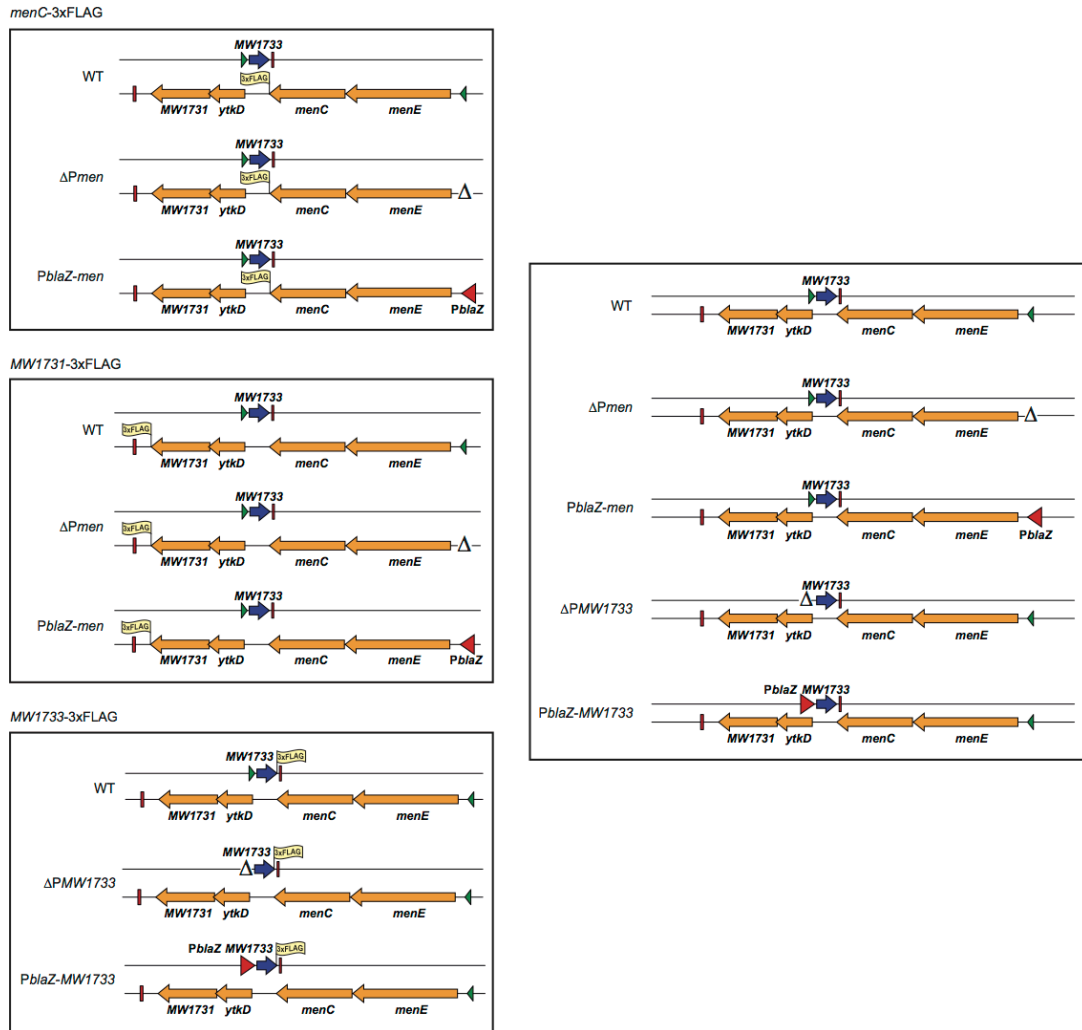
A continuación, decidimos analizar si tal y como indicaban los datos del transcriptoma y los datos genéticos, los genes *menE-menC-ytkD-MW1731* se cotranscribían en un único mRNA. Para ello, purificamos el RNA de la cepa salvaje,  $\Delta Pmen$  y *PblaZ-men* en fase exponencial de crecimiento y lo analizamos mediante la técnica de northern-blot. Para la detección específica del transcrito se diseñaron sondas complementarias a las regiones *menE-menC* (sonda A) e *ytkD-MW1731* (sonda B). Los resultados del Northern-blot mostraban niveles de mRNA muy bajos con ambas sondas (**Figura 12B**). Sólo en la cepa *PblaZ-men*, donde la expresión del operon es constitutiva, era posible observar una tenue banda de aproximadamente 4Kb compatible con la cotranscripción de los genes *menE-menC-ytkD-MW1631* (**Figura 12B**). Por otro lado, la sonda B hibridaba con una banda de aproximadamente 1,2 Kb en la cepa *PblaZ-men*, que indica la existencia de procesamiento del transcrito que se producía desde el promotor *blaZ*. Estos resultados sugieren fuertemente que la expresión de *menE-menC-ytkD-MW1731* dependen del promotor situado aguas arriba de *menE* y apoyan nuestra hipótesis de que los genes *menE-menC-ytkD-MW1731* constituyen una única unidad transcripcional.

### 3. Expresión del gen *MW1733*

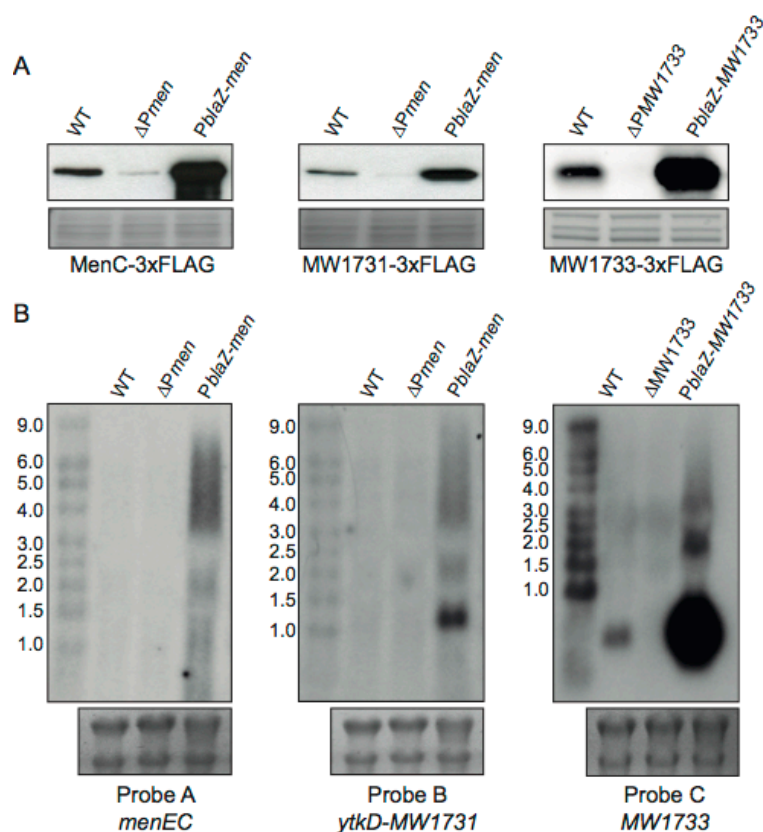
Nuestros resultados transcriptómicos indicaban que el gen *MW1733* (258 pb) tenía una región 5'UTR de 16 nucleótidos y una 3'UTR de 60 nucleótidos que solapa con la región final del gen *menC*. Para confirmar los datos transcriptómicos generamos dos mutantes adicionales, en uno de ellos delecionamos 27 nucleótidos de la región promotora de *MW1733* situada aguas arriba del gen ( $\Delta PMW1733$ ) y en la otra cepa reemplazamos la región promotora por el promotor constitutivo *blaZ* (*PblaZ-MW1733*) (**Figura 11**). Para cada una de estas cepas obtuvimos un derivado en el que marcamos la copia cromosómica del gen *MW1733* con la secuencia 3XFLAG. Los resultados obtenidos en el Western-blot mostraban una disminución de los niveles de proteína *MW1733* para la cepa  $\Delta PMW1733$  y un incremento de la proteína en el mutante *PblaZ-MW1733* con respecto a la cepa salvaje (**Figura 12A**). Para confirmar estos resultados realizamos Northern-blot a partir del RNA obtenido a partir de las cepas wild-type,  $\Delta PMW1733$  y *PblaZ-MW1733*. Para la detección específica del transcrito diseñamos una sonda específica complementaria a la región *MW1733* (sonda C). Los resultados mostraron la presencia de una discreta banda de aproximadamente 350 nucleótidos en la cepa salvaje (**Figura 12B**). La intensidad de esta banda se incrementaba en la cepa *PblaZ-MW1733* y prácticamente desaparecía en la cepa  $\Delta PMW1733$ .

Teniendo en cuenta que el gen *MW1733* se encuentra en medio de *menE-menC-ytkD-MW1731* y que estos 4 genes se transcriben conjuntamente, nuestros resultados describen una nueva organización transcripcional en la que, en medio de dos grupos de genes que se transcriben conjuntamente, tenemos otra unidad de transcripción que se transcribe en dirección contraria. Hemos denominado a esta unidad de transcripción como como "operón no-contiguo". En esta organización transcripcional, la región no codificante del transcrito tetracistrónico solapa con el transcrito monocistrónico.





**Figura 11.** Representación de las cepas utilizadas en los ensayos de la **Figura 12**. Las flechas naranjas representan las ORFs que constituyen el operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y la flecha azul representa el gen *MW1733*. Los triángulos verdes representan promotores y los rectángulos rojos terminadores transcripcionales. El triángulo rojo representa el promotor constitutivo *blaZ*. El símbolo  $\Delta$  indica la delección de un promotor. La etiqueta amarilla representa los marcajes con la secuencia 3XFLAG.



**Figura 12.** Evidencia experimental que demuestra que la región de genes *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* constituye un ejemplo de operón no-contiguo. **(A)** Análisis mediante Western-blot de los niveles de proteína MenC, MW1731 o MW1733 en la cepa salvaje,  $\Delta Pmen$ , PblaZ-men,  $\Delta PMW1733$  y PblaZ-MW1733. Se utilizaron anticuerpos anti-3XFLAG para la detección de las proteínas marcadas con la secuencia 3XFLAG. Los controles de carga se obtuvieron mediante tinción de Coomassie o geles stain-free. **(B)** Análisis mediante Northern-blot del RNA obtenido a partir de las cepas descritas en A. Utilizamos sondas específicas de las regiones *menEC* (sonda A), *ytkD-MW1731* (sonda B) y *MW1733* (sonda C). La posición de los RNAs está indicada. Los controles de carga contienen las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 16S y 23S. Las cepas utilizadas en esta figura están representadas en la **Figura 11**.

4. La expresión del operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y del gen *MW1733* está regulada recíprocamente.

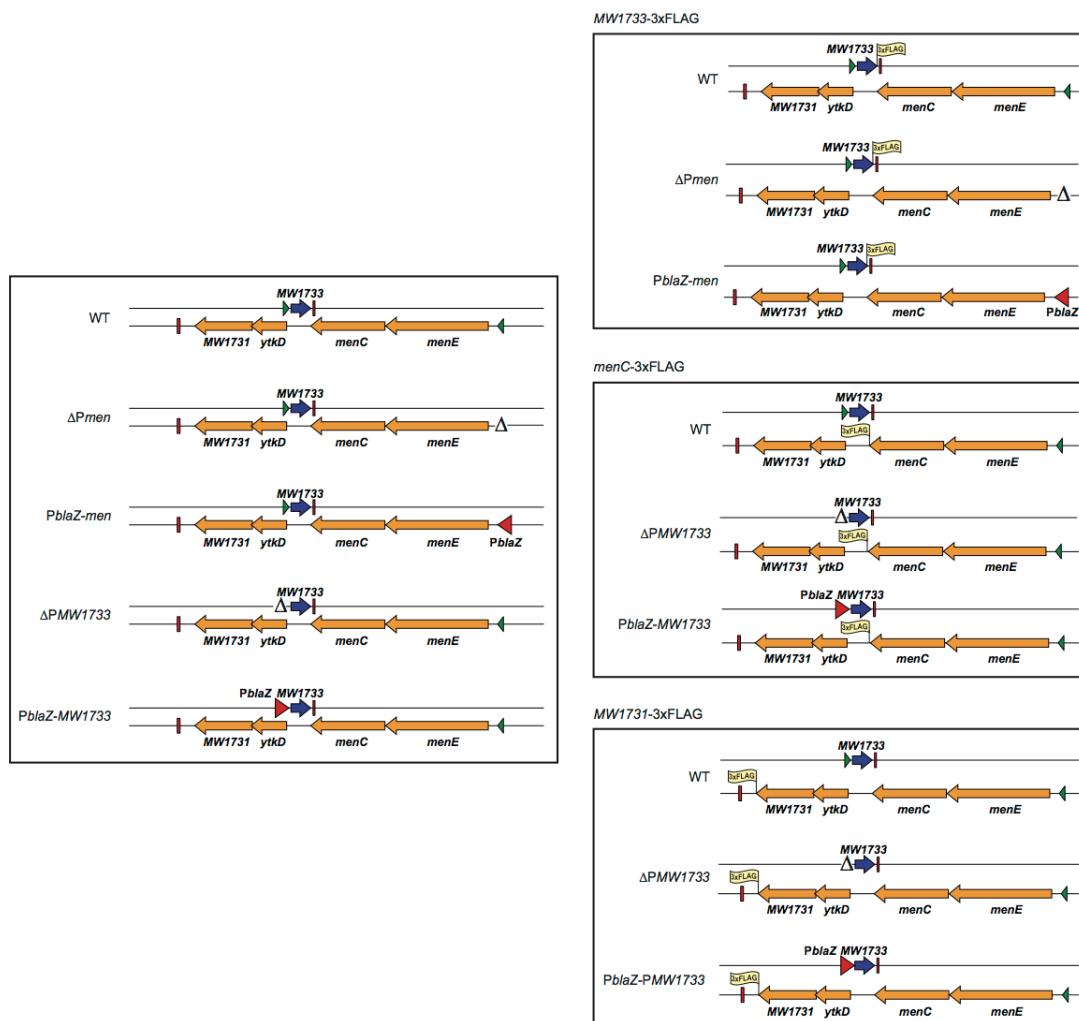
Una consecuencia directa de la co-transcripción de los genes *menE-menC-ytkD-MW1733* es que, el transcrito resultante solapa completamente con el mRNA que se produce a partir del gen *MW1733*. Para investigar si la transcripción de los genes *menE-menC-ytkD-MW1731* tiene algún efecto sobre los niveles de expresión del mRNA del gen *MW1733* comparamos los niveles de transcrito *MW1733* en las cepas salvaje,  $\Delta Pmen$  y *PblaZ-men* con una sonda específica para *MW1733* (sonda C) mediante northern-blot (**Figura 14A**). Los resultados mostraban que cuando la transcripción del operón se inhibe debido a la delección del promotor ( $\Delta Pmen$ ), se produce un ligero incremento de transcrito *MW1733*. Por otro lado, cuando *menE-menC-ytkD-MW1731* se transcribe de forma constitutiva (*PblaZ-men*) provoca una disminución muy significativa de los niveles del transcrito *MW1733* (**Figura 14A**). Para confirmar la regulación de la expresión de *MW1733* a nivel de proteína construimos derivados de las cepas  $\Delta Pmen$  y *PblaZ-men* en las que marcamos la copia cromosómica del gen *MW1733* con la secuencia 3XFLAG en posición C-terminal (**Figura 13**). Coincidiendo con los resultados obtenidos en el Northern-blot, los niveles de proteína *MW1733* disminuyen significativamente en la cepa *PblaZ-men* con respecto a la cepa salvaje (**Figura 14A**).

A continuación, estudiamos la posibilidad de que la expresión del mRNA de *MW1733* tuviese un efecto sobre el transcrito *menE-menC-ytkD-MW1731*. Para analizar esta hipótesis, comparamos los niveles del mRNA de *menE-menC-ytkD-MW1731* en las cepas salvaje,  $\Delta PMW1733$  y *PblaZ-MW1733* mediante Northern-blot (**Figura 8**). Utilizando la sonda A, específica para la región *menE-menC*, los niveles de expresión del mRNA tetracistrónico en la cepa salvaje seguían siendo muy bajos y no permitían detectar diferencias (**Figura 14B**). Cuando utilizamos la sonda B, específica de la región *ytkD-MW1731*, detectamos un transcrito de aproximadamente 1,5 Kb, que se correspondía con el mRNA producto del procesamiento de *menE-menC-ytkD-MW1731* equivalente a la región de *ytkD-MW1731* (**Figura 14C**). El transcrito *ytkD-MW1731* era mucho más visible cuando el gen *MW1733* se expresaba constitutivamente y en cambio, no resultaba detectable en las cepas salvaje y  $\Delta PMW1733$ .

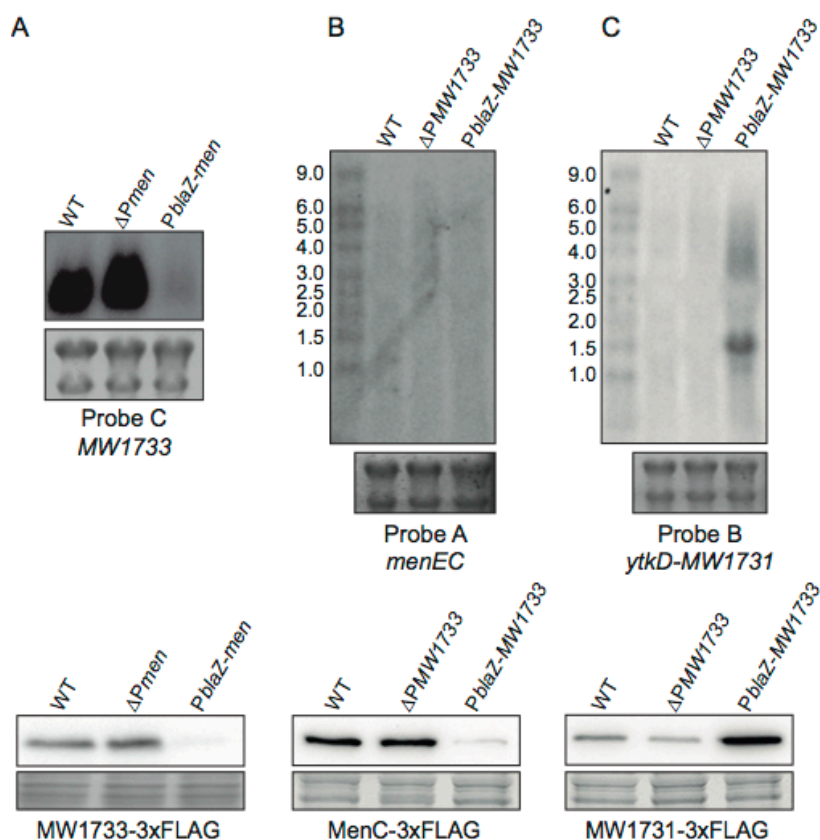
A continuación, construimos derivados de las cepas  $\Delta PMW1733$  y *PblaZ-MW1733* en las que marcamos la copia cromosómica de *menC* y *MW1731* con la secuencia 3XFLAG en su extremo C-terminal (**Figura 13**). La expresión constitutiva de *MW1733* (*PblaZ-MW1733*) provocaba una reducción considerable en los niveles de proteína

MenC (**Figura 14B**) y, a su vez, una acumulación de la proteína MW1731, en ambos casos, con respecto a la cepa salvaje (**Figura 14C**).

Todos estos resultados apoyan la idea de que en los operones no contiguos los transcritos que se generan desde hebras opuestas pueden modificar recíprocamente su expresión. Esto añade un nuevo nivel de expresión porque permite coordinar la expresión de genes contiguos que se expresan con direcciones opuestas. Un aumento en la transcripción de transcrito tetracistrónico regula negativamente la expresión del gen *MW1733*. Por otro lado, un incremento en el mRNA de *MW1733* provoca una asimetría en los niveles de expresión de *menE-menC-ytkD-MW1731*, ya que los niveles de transcrito *ytkD-MW1731* se elevaban significativamente mientras que la expresión de *menE-menC* se reduce.



**Figura 13.** Representación de las cepas utilizadas en los ensayos de la **Figura 14**. Las flechas naranjas representan las ORFs que constituyen el operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y la flecha azul representa el gen *MW1733*. Los triángulos verdes representan promotores y los rectángulos rojos terminadores transcripcionales. El triángulo rojo representa el promotor constitutivo *blaZ*. El símbolo  $\Delta$  indica la delección de un promotor. La etiqueta amarilla representa los marcajes con la secuencia 3XFLAG.



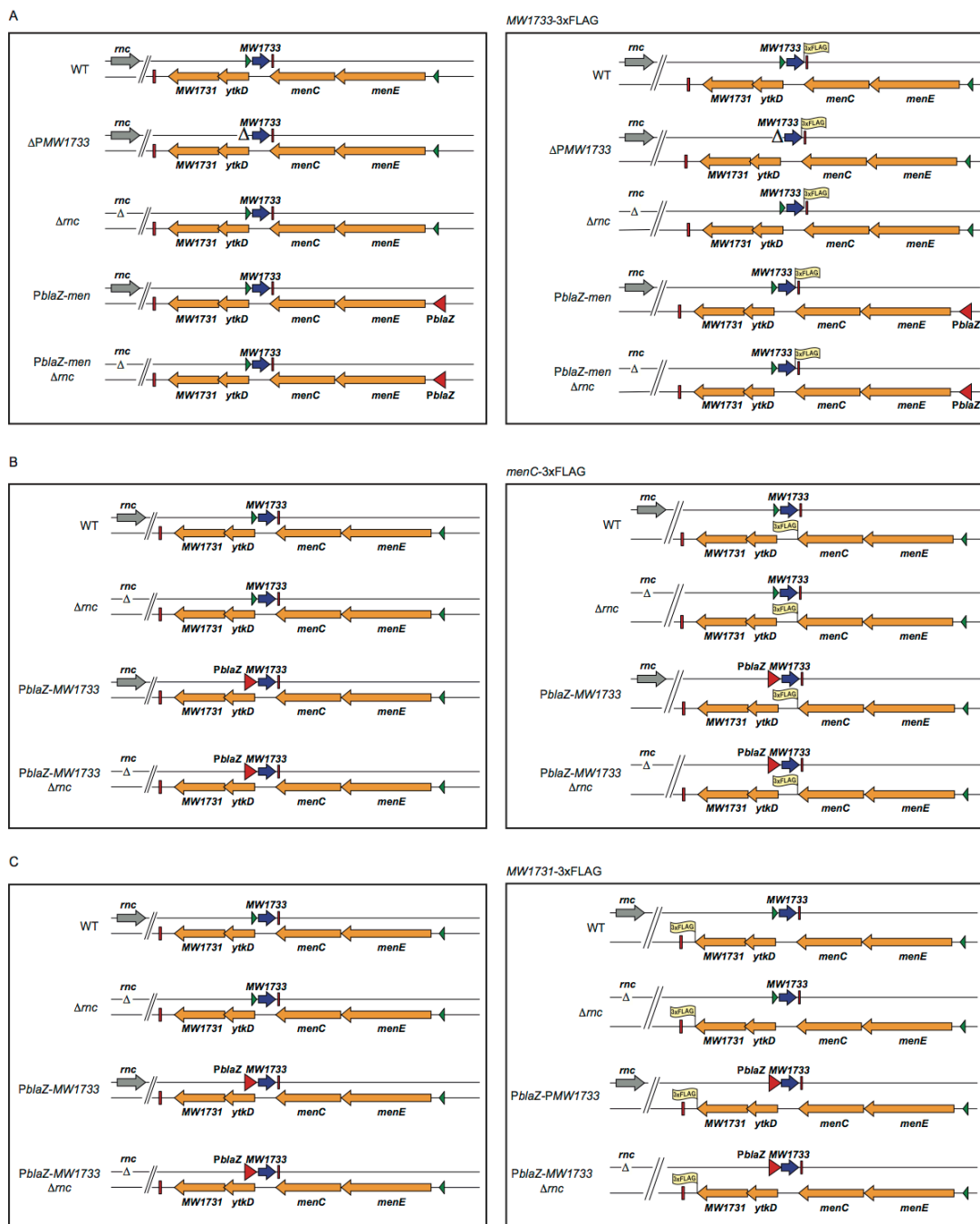
**Figura 14.** Regulación recíproca dentro del operon no contiguo entre los transcritos solapantes. **(A)** Panel superior: Northern blot que muestra los niveles del mRNA de *MW1733* en las cepas salvaje,  $\Delta Pmen$  y *PblaZ-men*. Detectamos el mRNA de *MW1733* con la sonda C. Panel inferior: Western blot de los niveles de proteína *MW1733* en las cepas salvaje,  $\Delta Pmen$  y *PblaZ-men* con la copia cromosómica del gen *MW1733* marcada con la secuencia 3XFLAG. **(B)** Panel superior: Northern blot que muestra los niveles del mRNA de *menE-menC* en las cepas salvaje,  $\Delta PMW1733$  y *PblaZ-MW1733*. Detectamos el mRNA de *menEC* con la sonda A. Panel inferior: Western blot de los niveles de proteína *MenC* en las cepas salvaje,  $\Delta PMW1733$  y *PblaZ-MW1733* con la copia cromosómica del gen *menC* marcada con la secuencia 3XFLAG. **(C)** Panel superior: Northern blot que muestra los niveles del mRNA de *ytkD-MW1731* en las cepas salvaje,  $\Delta PMW1733$  y *PblaZ-MW1733*. Detectamos el mRNA de *ytkD-MW1731* con la sonda B. Panel inferior: Western blot de los niveles de proteína *MW1731* en las cepas salvaje,  $\Delta PMW1733$  y *PblaZ-MW1733* con la copia cromosómica del gen *MW1731* marcada con la secuencia 3XFLAG. La posición de los RNAs está indicada. Los controles de carga contienen las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 16S y 23S. Se utilizaron anticuerpos anti-3XFLAG para la detección de las proteínas marcadas con la secuencia 3XFLAG. Los controles de carga se obtuvieron mediante tinción de Coomassie o geles stain-free. Las cepas utilizadas en esta figura están representadas en la **Figura 13**.

## 5. Análisis de la función de RNasa III en la regulación de los operones no-contiguos.

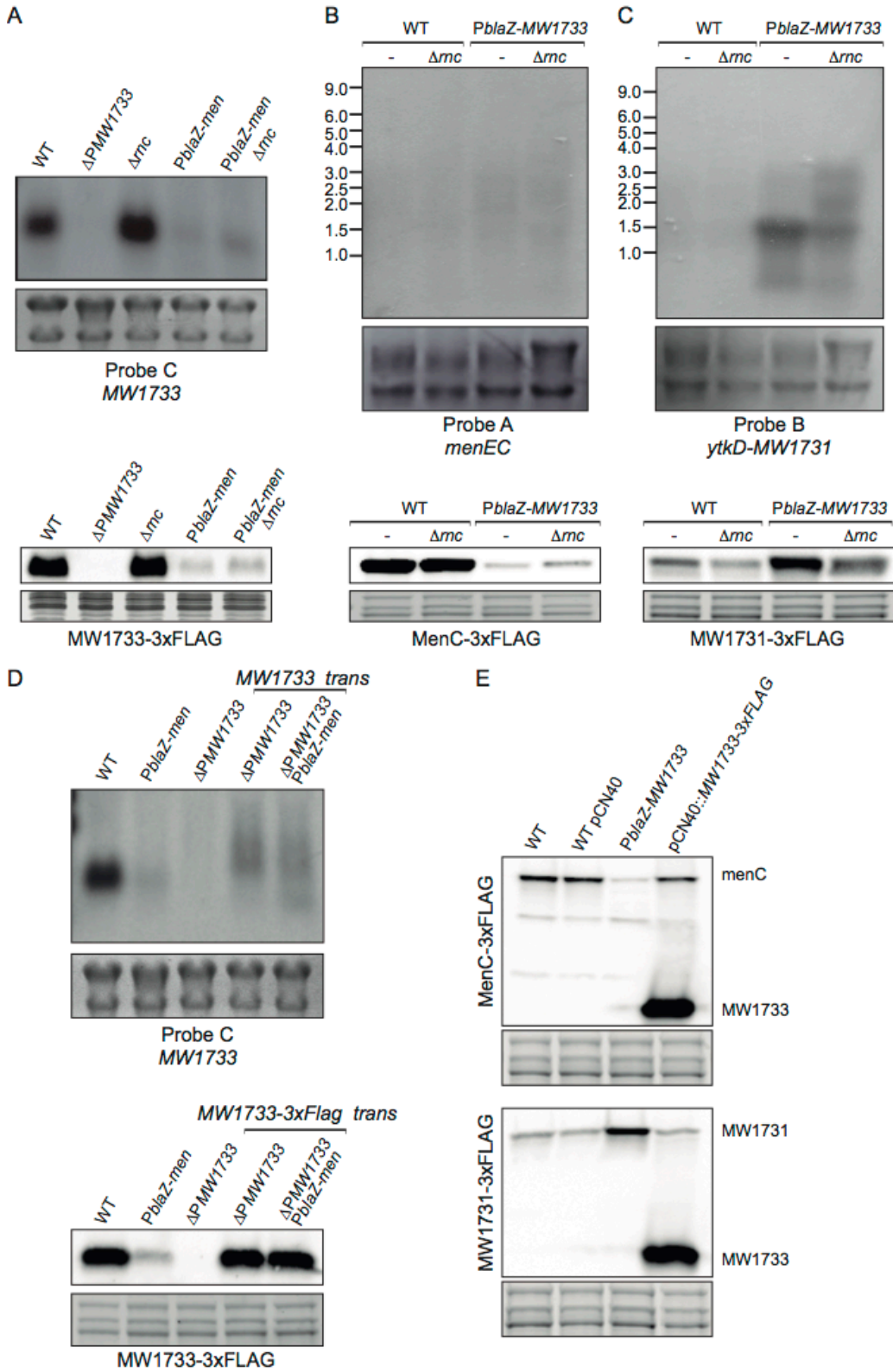
RNasa III es la endorribonucleasa responsable del procesamiento de RNAs de cadena doble en *S. aureus* y por tanto esta implicada en la regulación mediada por transcritos solapantes antisentido (Lasa *et al.*, 2011) (Lioliou *et al.*, 2012) (Lybecker *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que el transcrito *menE-menC-ytkD-MW1731* es antisentido para el transcrito *MW1733*, nos planteamos si RNasa III podría estar implicada en la regulación que habíamos observado cuando modificamos la expresión de uno de los transcritos. Para averiguar si la reducción de los niveles de transcrito *MW1733* cuando el transcrito *menE-menC-ytkD-MW1731* se encuentra en exceso (*PblaZ-men*) esta relacionada con RNasa III, delecionamos el gen que codifica para RNasa III (*rnc*) en las cepas salvaje y *PblaZ-men* (**Figura 15**). Con estas cepas realizamos Northern-blot utilizando la sonda C (**Figura 8**) para la detección específica del transcrito *MW1733*. Los resultados indicaban un ligero incremento del mRNA de *MW1733* en las cepas mutantes en RNasa III al compararlo con el RNA de las cepas que producen RNasa III (**Figura 16A**). A continuación, realizamos Western-blot para analizar los niveles de proteína *MW1733* de las mismas cepas. Los resultados mostraban un incremento moderado en los niveles de proteína en los mutantes en RNasa III al compararlos con las cepas salvaje y *PblaZ-men* (**Figura 16A**). Por otro lado, evaluamos el papel de RNasa III cuando el transcrito que se producía constitutivamente era *MW1733* (*PblaZ-MW1733*). Para ello delecionamos RNasa III en la cepa *PblaZ-MW1733* y realizamos Northern-blot a partir del RNA obtenido de las cepas salvaje y *PblaZ-MW1733* en presencia y ausencia de RNasa III. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión del transcrito *menE-menC-ytkD-MW1731* con la sonda A que detecta de forma específica la region que corresponde a *menE-menC* (**Figura 16B**). Con la sonda B, los resultados mostraban que en presencia de un exceso de mRNA de *MW1733* aparecía una banda de procesamiento de 1,5 kb incluso en ausencia de RNasa III, lo que indica que RNasa III no es necesaria para este procesamiento se produzca. Sin embargo, en este caso, el patrón de procesamiento cambiaba ya que se observaba una disminución en la cantidad de transcrito de 1,5 Kb y la aparición de dos transcritos de mayor tamaño (**Figura 16C**). El resultado de este northern es importante porque demuestra que efectivamente la expresión de *MW1733* tiene un efecto sobre el transcrito tetracistrónico *menE-menC-ytkD-MW1731* y que dicho efecto es en parte dependiente de la presencia de la actividad de una endorribonucleasa de cadena doble.

A continuación, estudiamos mediante Western-blot los niveles de proteína MW1731 en las cepas salvaje, *PblaZ-MW1733* y sus respectivos mutantes en RNasa III. Observamos que la cantidad de proteína MW1731 producida por las cepas mutantes en *rnc* era menor que en sus respectivas cepas productoras de RNasa III (**Figura 16C y 15**). El conjunto de resultados indica que la actividad de RNasa III puede explicar solo parcialmente el procesamiento que el mRNA de *MW1733* induce sobre el mRNA de *menE-menC-ytkD-MW1731*, sugiriendo que otras ribonucleasas deben estar implicadas en este procesamiento.





**Figura 15.** Representación de las cepas utilizadas en los ensayos de la **Figura 16**, apartados A, B y C. Las flechas naranjas representan las ORFs que constituyen el operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y la flecha azul representa el gen *MW1733*. Los triángulos verdes representan promotores y los rectángulos rojos terminadores transcripcionales. El triángulo rojo representa el promotor constitutivo *blaZ*. El símbolo  $\Delta$  indica la delección de un promotor. La etiqueta amarilla representa los marcajes con la secuencia 3XFLAG.  $\Delta rnc$ , mutante en la endorribonucleasa RNasa III.



**Figura 16.** El procesamiento de la región solapante mediado por RNasa III y la interferencia transcripcional están involucrados en la regulación recíproca de los transcritos solapantes generados a partir del operon no-contiguo. **(A)** Panel superior: Northern blot que muestra los niveles del mRNA de *MW1733* en las cepas salvaje,  $\Delta PMW1733$ ,  $\Delta rnc$ , *PblaZ-men*, *PblaZ-men*  $\Delta rnc$ . Detectamos el mRNA de *MW1733* con la sonda C. Panel inferior: Western blot de los niveles de proteína *MW1733* de las mismas cepas con la copia cromosómica de *MW1733* marcada con la secuencia 3XFLAG. **(B)** Panel superior: Northern blot que muestra los niveles del mRNA de *menE-menC* en las cepas salvaje,  $\Delta rnc$ , *PblaZ-MW1733*, *PblaZ-MW1733*  $\Delta rnc$ . Detectamos el mRNA de *menEC* con la sonda A. Panel inferior: Western blot de los niveles de proteína *MenC* de las mismas cepas con la copia cromosómica del gen *menC* marcada con la secuencia 3XFLAG. **(C)** Panel superior: Northern blot que muestra los niveles del mRNA de *ytkD-MW1731* de las cepas descritas en B. Detectamos el mRNA de *ytkD-MW1731* con la sonda B. Panel inferior: Western blot de los niveles de proteína *MW1731* de las mismas cepas con la copia cromosómica del gen *MW1731* marcada con la secuencia 3XFLAG. **(D)** Panel superior: Northern blot que muestra los niveles del mRNA de *MW1733* en las cepas salvaje, *PblaZ-men*,  $\Delta PMW1733$ ,  $\Delta PMW1733$  *MW1733 trans*, y  $\Delta PMW1733$  *PblaZ-men MW1733 trans*. Detectamos el mRNA de *MW1733* con la sonda C. Panel inferior: Western blot de los niveles de proteína *MW1733* de las mismas cepas con la copia cromosómica del gen *MW1733* marcada con la secuencia 3XFLAG. **(E)** Western blots con los niveles de proteína *MenC* (Panel superior) y *MW1731* (Panel inferior) en las cepas salvaje, salvaje pCN40, *PblaZ-MW1733* y salvaje pCN40::*MW1733-3XFLAG*. Las cepas tienen la copia cromosómica de *menC* y *MW1731* marcadas con la secuencia 3XFLAG. La posición de los RNAs está indicada. Los controles de carga contienen las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 16S y 23S. Se utilizaron anticuerpos anti-3XFLAG para la detección de las proteínas marcadas con la secuencia 3XFLAG. Los controles de carga se obtuvieron mediante tinción de Coomassie o geles stain-free. En la **Figura 15** están representadas las cepas de los apartados A, B y C. En la **Figura 17** las de los apartados D y E.

## 6. Efecto de la interferencia transcripcional en la regulación de la expresión de los transcritos de un operón no-contiguo

La interferencia transcripcional se define como la influencia supresora que la maquinaria de síntesis de RNA en una de las hebras de DNA puede producir, en *cis*, sobre la transcripción de genes vecinos (Shearwin *et al.*, 2005). Para confirmar si la regulación antisentido de *menE-menC-ytkD-MW1731* sobre *MW1733* podía estar afectada por un mecanismo de interferencia transcripcional, decidimos crear una cepa en la que apagábamos la expresión del gen *MW1733* en su localización normal y al mismo tiempo introducíamos otra copia de dicho gen con su promotor en otra localización del cromosoma. Para llevarlo a cabo, insertamos el gen *MW1733* con la secuencia 3XFLAG expresándose bajo su propio promotor cerca del sitio inocuo *attB* del gen de la lipasa en las cepas  $\Delta PMW1733$  y  $\Delta PMW1733 PblaZ-men$  (**Figura 17**). Con estas cepas realizamos Northern-blot utilizando la sonda C específica para *MW1733*. Los resultados mostraban que los niveles de mRNA *MW1733* sólo disminuían ligeramente en presencia de un exceso de mRNA de *menE-menC-ytkD-MW1731* cuando el mRNA de *MW1733* se expresaba en *trans*. Este resultado era contrario a lo que ocurre cuando el mRNA de *MW1733* se produce en *cis* (**Figura 16D**). Por otro lado, es importante indicar que la banda de mRNA de *MW1733* cuando se producía ectópicamente desde la localización cromosómica *attB* era mucho más difusa y de diferente tamaño. Nuestra explicación a estos resultados es que en su nueva localización, a pesar de que el *MW1733* se expresa desde su propio promotor, no incluye el terminador de transcripción y esto afecta a la terminación de la transcripción y al tamaño del mRNA producido.

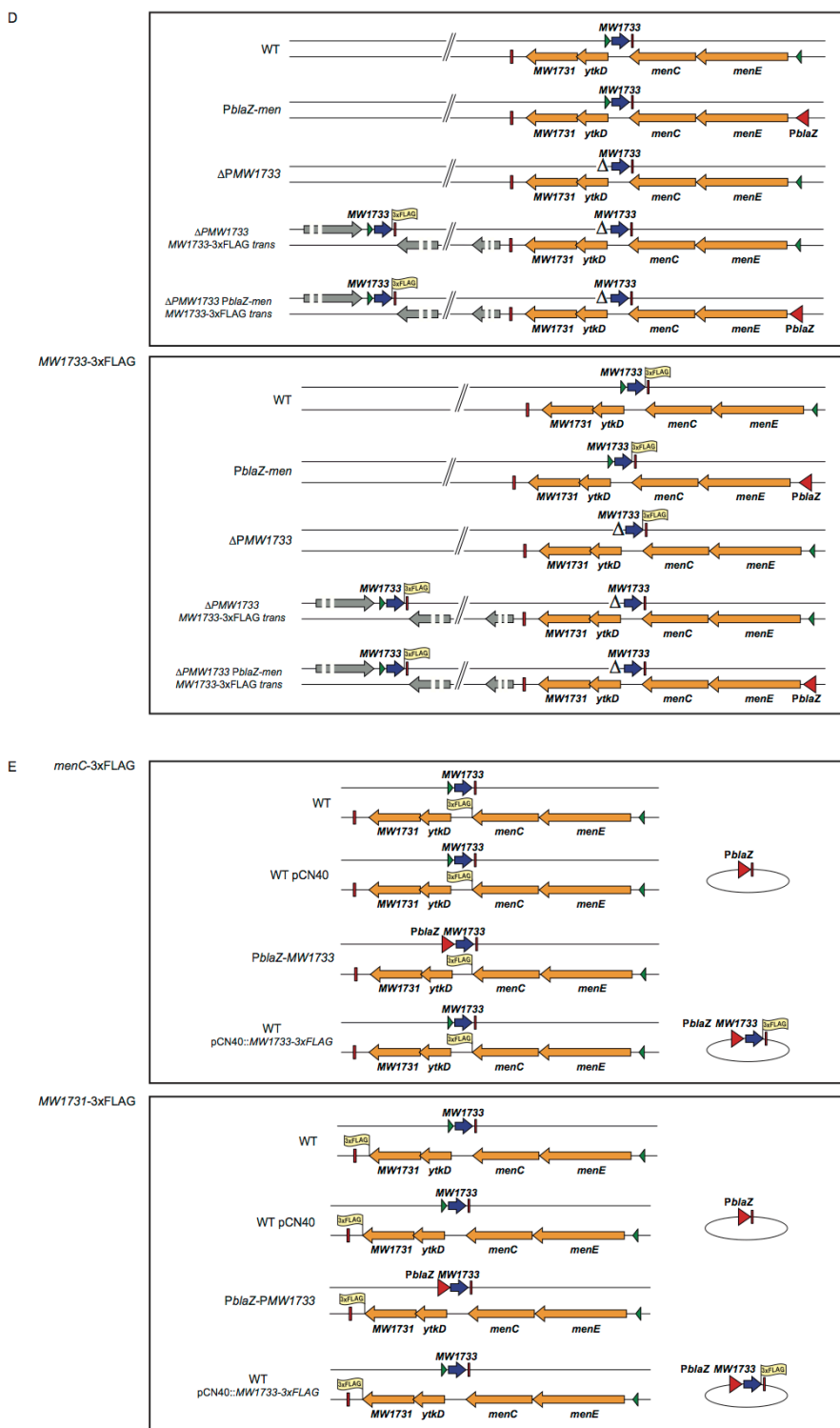
A continuación, realizamos Western-blot para contrastar los resultados obtenidos en el Northern-blot. Los resultados mostraban que los niveles de proteína *MW1733* en la cepa  $\Delta PMW1733 PblaZ-men MW1733 trans$  eran similares a los detectados en su cepa salvaje ( $\Delta PMW1733 MW1733 trans$ ) (**Figura 16D**). Estos resultados indicaban que para que *menE-menC-ytkD-MW1731* tenga una influencia supresora en la expresión de *MW1733* es necesario que ambos transcritos se localicen en *cis*. Es importante señalar que los niveles de expresión de la proteína *MW1733* era similar cuando se expresaba desde su localización dentro del operon *menE-menC-ytkD-MW1731* a cuando se expresaba desde el sitio *attB* del gen de la lipasa (gen de la lipasa).

Finalmente, decidimos evaluar la expresión en *trans* de *MW1733* utilizando otra estrategia que consistía en la expresión del gen *MW1733* desde un plásmido. Para ello,

---

sobreexpresamos el gen *MW1733* con la secuencia 3XFLAG desde el plásmido pCN40 en cepas que contenían la copia cromosómica de *menC* o *MW1731* marcadas con la secuencia 3XFLAG (**Figura 17**), y estudiamos como afectaba la expresión de *MW1733* en la expresión de las proteínas MenC y *MW1731* mediante Western-blot. Observamos que la sobreexpresión de *MW1733* en *trans* no tenía ningún efecto sobre la producción de MenC y *MW1731*. Este resultado evidencia que se requiere la localización en *cis* de ambos transcritos para que *MW1733* coordine su expresión con la del operon *menE-menC-ytkD-MW1731* (**Figura 16E**).

El conjunto de resultados demuestra que existe un mecanismo de interferencia transcripcional de regulación de genes entre la maquinaria que sintetiza el mRNA de *menE-menC-ytkD-MW1731* y la que produce el transcrito *MW1733*.



**Figura 17.** Representación de las cepas utilizadas en los ensayos de la **Figura 15**, apartados D y E. Las flechas naranjas representan las ORFs que constituyen el operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y la flecha azul representa el gen *MW1733*. Los triángulos verdes representan promotores y los rectángulos rojos terminadores transcripcionales. El triángulo rojo representa el promotor constitutivo *blaZ*. El símbolo  $\Delta$  indica la delección de un promotor. La etiqueta amarilla representa los marcajes con la secuencia 3XFLAG. Los plásmidos pCN40 vacío y pCN40::MW1733-3XFLAG están representados a la derecha de las cepas correspondientes.

## 7. La descoordinación en la expresión de transcripción del operón no-contiguo *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* produce colonias con fenotipo SCV

En los experimentos realizados anteriormente se demostraba que la expresión constitutiva del gen *MW1733* conlleva una reducción en los niveles de proteína MenC (**Figura 14B**). En *S. aureus*, la inhibición de la síntesis de menaquinona esta asociada con un fenotipo de crecimiento lento denominado small colony variants (SCVs) (Proctor *et al.*, 2006). Las SCVs se aíslan frecuentemente de muestras clínicas procedentes de pacientes que padecen infecciones crónicas producidas por *S. aureus*.

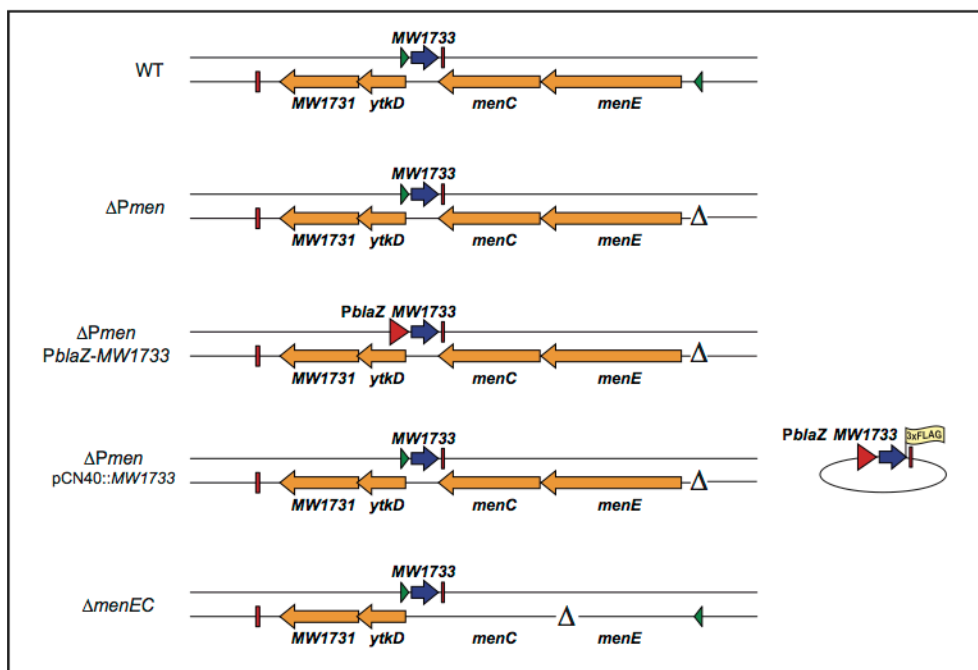
Nos planteamos si la inhibición en la expresión del operon *menE-menC-ytkD-MW1731* que causa la sobreexpresión del gen *MW1733* podría ser suficiente para generar una deficiencia en los niveles de menaquinona y la consiguiente ralentización del crecimiento de la bacteria. Para estudiar esta hipótesis, reemplazamos el promotor de *MW1733* con un promotor constitutivo *blaZ* en la cepa salvaje y  $\Delta Pmen$  (**Figura 18**). En la cepa salvaje la sobreexpresión de *MW1733* no tenía ningún efecto en el tamaño de las colonias resultantes. Sin embargo, en la cepa  $\Delta Pmen$ , la sobreexpresión de *MW1733* ralentizaba la velocidad de crecimiento y la bacteria producía colonias de tamaño significativamente menor al que producían las cepas salvaje y  $\Delta Pmen$  (la cepa  $\Delta Pmen$  produce colonias de un tamaño menor al que produce la cepa salvaje) (**Figura 18, 19A, 20A**). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *MW1733* puede provocar una disminución de la expresión de los genes *menE-menC*, suficiente como para disminuir la síntesis de menaquinona y dar lugar a fenotipo SCV. Para confirmar que el fenotipo de ralentización del crecimiento era debido a una carencia de menaquinona, añadimos menadiona que actúa como precursor de menaquinona a las cepas  $\Delta Pmen$  y  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$ , (**Figura 18, 20A**). Los resultados mostraron que la cepa  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  en presencia de menadiona recuperaba de forma significativa el ritmo de crecimiento (**Figura 20A**). Para descartar que la ralentización del crecimiento no era debida a un exceso en los niveles de *MW1733*, sobreexpresamos desde plásmido el gen *MW1733* en la cepa  $\Delta Pmen$  y posteriormente analizamos el tamaño de las colonias obtenidas en placas de TSA. La cepa resultante,  $\Delta Pmen pCN40::MW1733$  (**Figura 18 y 19A**) presentaba el mismo fenotipo que la cepa  $\Delta Pmen$ .

Así, concluimos que esta organización transcripcional puede constituir un mecanismo de regulación de la expresión de genes que de lugar al fenotipo de SCV en determinadas condiciones ambientales donde la expresión del operon *menE-menC-ytkD-MW1731* es baja y la expresión de *MW1733* es elevada.

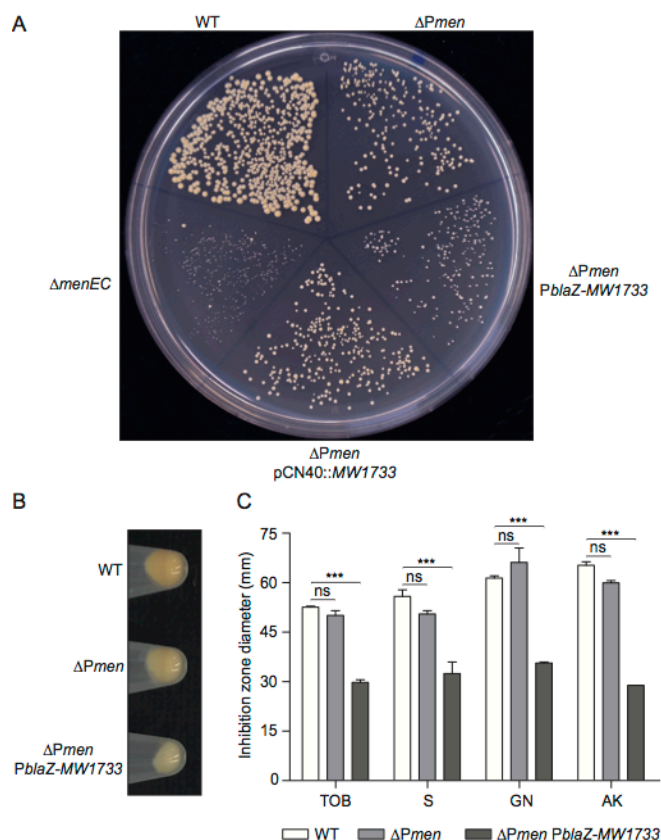
## 8. Caracterización del fenotipo SCV que causa la sobreexpresión de *MW1733*

Los resultados previos indicando que la sobreexpresión de *MW1733* era capaz de provocar una ralentización del crecimiento en la cepa  $\Delta Pmen$ , nos llevo a plantearnos si estas cepas muestran el resto de características que han sido asociadas a las SCVs. La cepa  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  presentaba una menor producción del pigmento staphyloxantina, y un incremento en la resistencia a los aminoglucósidos (tobramicina, estreptomicina, gentamicina y amikacina) característico de las SCV (Sendi and Proctor, 2009) (**Figura 19B, C**). Otra característica de las SCVs es la disminución del poder reductor. Para medir el poder reductor analizamos la capacidad que presentaban estas células para reducir un reactivo denominado Alarmer blue. La cepa  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  emitía niveles de fluorescencia significativamente inferiores a los producidos por la cepa  $\Delta Pmen$ . La adición de menadiona igualaba la capacidad de reducción del compuesto de la cepa  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  al de la cepa salvaje indicando que la reducción del poder reductor estaba motivada por la reducción en los niveles de menaquinona (**Figura 20B**). Otra forma de medir la capacidad de una cepa de reducir el oxígeno, consiste en medir la capacidad de reducir el colorante azul de metileno. Los resultados mostraban que en ausencia de menadiona la cepa  $\Delta Pmen$  presenta una capacidad muy pequeña para reducir el colorante mientras que la cepa  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  no es capaz de reducir el colorante (**Figura 20C**). Por último, medimos la producción de D y L lactato para averiguar si la afectación de la cadena transportadora de electrones provocaba la activación de procesos de fermentación. Los resultados mostraban que las cepas  $\Delta Pmen$  y  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  producían más lactato que la cepa salvaje, mayoritariamente del isómero L-lactato, en ausencia de menadiona. Los niveles de lactato disminuían al añadir menadiona, pero sin llegar a alcanzar los observados en la cepa salvaje (**Figura 20D**). En su conjunto estos resultados indican que las SCVs que se producen cuando la expresión del operon *menE-menC-ytkD-MW1731* se inhibe debido a la sobreexpresión del gen *MW1733* tienen todas las características fenotípicas que se han asociado a estas bacterias.

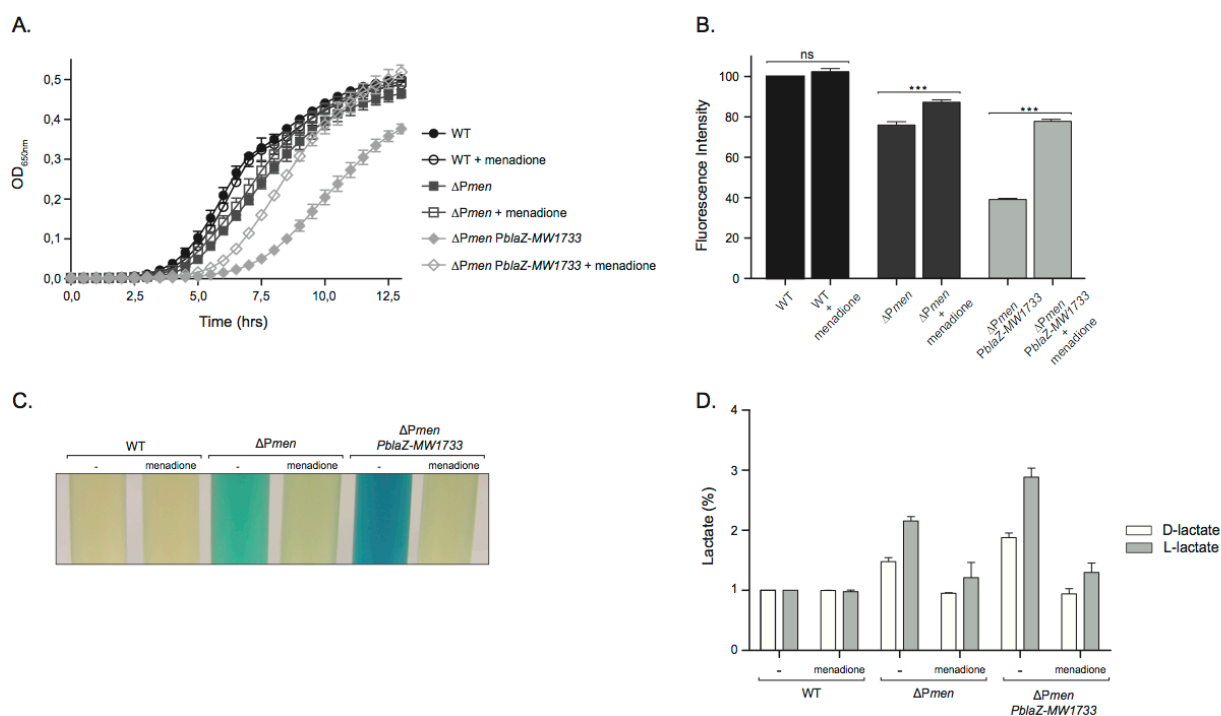




**Figura 18.** Representación de las cepas utilizadas en los ensayos de la **Figuras 19, 20 y 21**. Las flechas naranjas representan las ORFs que constituyen el operón *menE-menC-ytkD-MW1731* y la flecha azul representa el gen *MW1733*. Los triángulos verdes representan promotores y los rectángulos rojos terminadores transcripcionales. El triángulo rojo representa el promotor constitutivo *blaZ*. El símbolo  $\Delta$  indica la deleción de un promotor o un gen. La etiqueta amarilla representa los marcajes con la secuencia 3XFLAG.  $\Delta menEC$  es la cepa con los genes *menE-menC*, necesarios para la síntesis de menaquinona, delecionados. A la derecha de la cepa correspondiente se encuentra representado el plásmido pCN40 a través del cual se expresa constitutivamente la proteína *MW1733* con la etiqueta 3XFLAG.



**Figura 19.** La sobreexpresión de *MW1733* en una cepa que contiene una delección en la región promotora de *menE* conduce a la formación de cepas con fenotipo small colony variant (SCV). **(A)** Tamaño de las colonias pertenecientes a las cepas WT,  $\Delta Pmen$ ,  $\Delta Pmen$  *PblaZ-MW1733*,  $\Delta Pmen$  *pCN40::MW1733* junto a la cepa control en la que los genes *menE-menC* están delecionados ( $\Delta menEC$ ). El tamaño de colonia se evaluó sembrando en placas de TSA 25  $\mu$ l de una dilución  $10^{-4}$  obtenida a partir de cultivos overnight (ON). Las cepas utilizadas en el ensayo están representadas en la **Figura 21**. **(B)** Imágenes correspondientes a los pellets obtenidos tras crecer las cepas de *S. aureus* hasta fase estacionaria en las que se aprecian diferencias en la pigmentación. Las cepas analizadas se describen en A. Las imágenes representan tres ensayos independientes. **(C)** Suceptibilidad a antibióticos medida con la zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de discos impregnados en tobramicina (TOB), 30  $\mu$ g; estreptomycin (S), 25  $\mu$ g; gentamicina (GN), 120  $\mu$ g y amikacina (AK), 30  $\mu$ g. Las cepas analizadas se describen en A. Los valores representados se corresponden con las medias de tres experimentos independientes y las barras de error muestran las desviaciones estándar de esas medias. La significancia estadística se calculó a través del análisis ANOVA de dos factores y Bonferroni (Graphpad Prism, versión 5). ns = no existen diferencias significativas; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

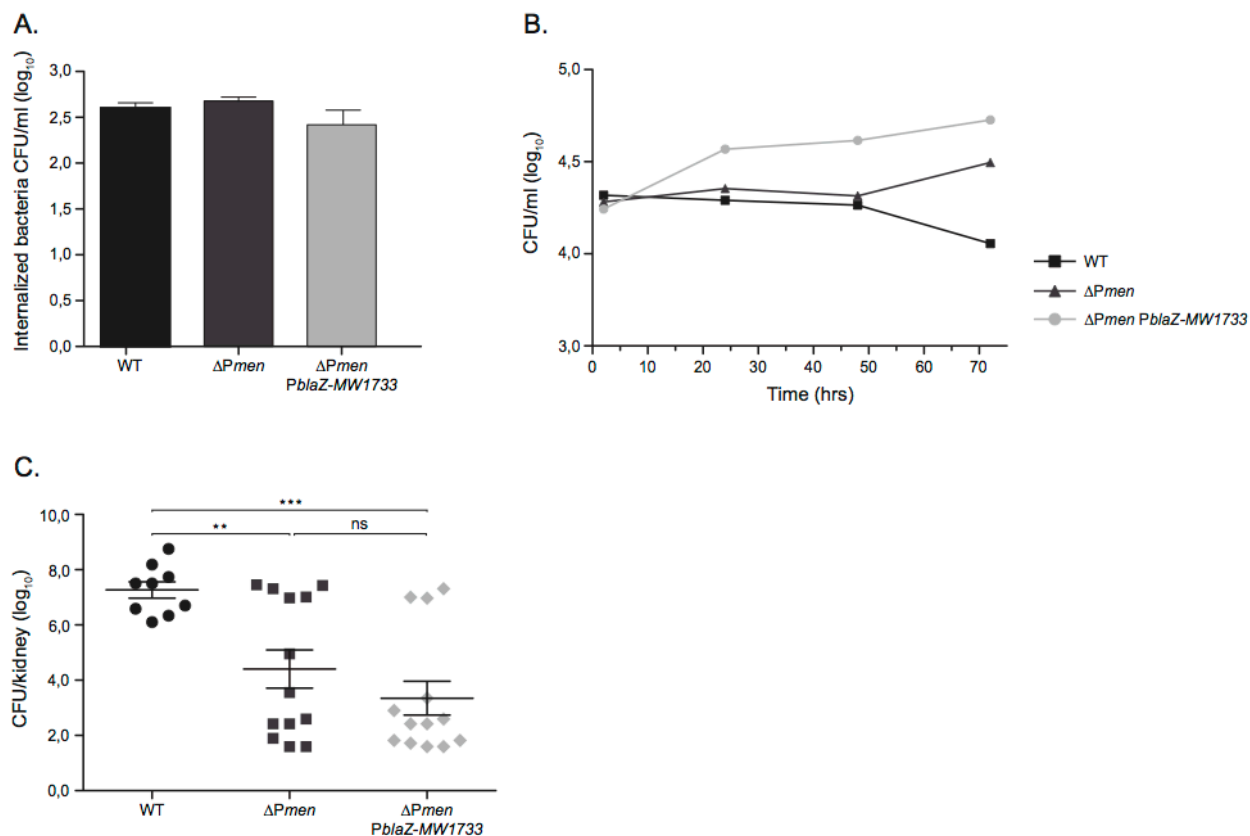


**Figura 20.** Análisis de la reversión fenotípica en mutantes que presentan fenotipo SCVs. **(A)** Curva de crecimiento para estudiar los efectos de la menadiona sobre el crecimiento. **(B)** Ensayo de reducción Alamar blue para analizar la reversión de la actividad metabólica de las cepas que presentan fenotipo SCVs. La significancia estadística se calculó a través del análisis ANOVA de dos factores y Bonferroni (Graphpad Prism, versión 5). ns = no existen diferencias significativas; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001. **(C)** Ensayo de consumo de oxígeno. **(D)** Medida de producción de L y D-lactato. Para estudiar los efectos de la menadiona se suplementaron los medios de cultivo con 10 ng/ml de menadiona disuelta en DMSO. Las cepas utilizadas en los ensayos están representadas en la **Figura 18**.

## 9. Caracterización de los mutantes con fenotipo SCV durante el proceso de infección

Se ha descrito que la aparición de SCVs en muestras de pacientes se produce cuando hay procesos de infección persistentes en los que *S. aureus* sobrevive de forma intracelular (Tuchscherer *et al.*, 2010). Estos estudios son difíciles de replicar con SCVs naturales porque el fenotipo desaparece cuando la bacteria se crece en condiciones de laboratorio. Decidimos analizar si el fenotipo SCV de la cepa  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  afectaba la invasión y persistencia de la bacteria en células en cultivo (**Figura 21A, B**). Con respecto a la capacidad de invasión de células, no encontramos diferencias significativas entre las cepas  $\Delta Pmen$  y  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  y la cepa salvaje (**Figura 21A**). Sin embargo, y de acuerdo con lo que se había descrito previamente la cepa  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  persistía mejor en el interior celular (**Figura 21B**). Finalmente, comparamos la virulencia de estas cepas mediante ensayos de sepsis en ratón. Los resultados indican que las cepas  $\Delta Pmen$  y  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  tienen reducida su capacidad para colonizar el riñón (**Figura 21C**).

Nuestros resultados confirman que el fenotipo SCV proporciona una estrategia de supervivencia muy importante para *S. aureus* ya que las bacterias con fenotipo SCV sobreviven mejor en condiciones intracelulares y tienen mayor capacidad de colonizar y sobrevivir en los órganos del huésped (**Figura 21C**).



**Figura 21.** Determinados mutantes muestran fenotipo SCV *in vivo*. **(A)** Invasión de las cepas de *S. aureus* MW2 salvaje,  $\Delta Pmen$  y  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  en células epiteliales MAC-T. La invasión bacteriana se midió por el recuento en UFC tras 2 horas de tratamiento con gentamicina. Los experimentos se realizaron por triplicado en cada línea celular. La significancia estadística se calculó a través del análisis ANOVA de dos factores y Bonferroni (Graphpad Prism, versión 5) y no se encontraron diferencias significativas entre cepas. **(B)** Persistencia de las cepas de *S. aureus* MW2 salvaje,  $\Delta Pmen$  y  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  en células epiteliales MAC-T. La persistencia bacteriana se midió por recuento en UFC tras 2, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con gentamicina. Los experimentos se realizaron por triplicado en cada línea celular. **(C)** Virulencia de las cepas de *S. aureus* MW2 salvaje,  $\Delta Pmen$  y  $\Delta Pmen PblaZ-MW1733$  en ratones inoculados vía retro-orbital. Los ratones fueron infectados con  $10^7$  UFC de las cepas indicadas y sacrificados tras 5 días de infección. Se analizó la carga bacteriana en el riñón. La significancia estadística se calculó a través del análisis ANOVA de dos factores y Tukey (Graphpad Prism, versión 5). ns = no existen diferencias significativas; ns: no existen diferencias significativas \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .



## *DISCUSIÓN*

---





---

## DISCUSIÓN

La implementación de las técnicas masivas de secuenciación de RNA para la identificación de la colección completa de moléculas de RNA que una bacteria produce (transcriptoma) ha mostrado que en un porcentaje importante del genoma se transcribe desde ambas hebras, generando RNAs sentido y antisentido desde la misma región del genoma. En general, este proceso se ha denominado como transcripción solapante. Lógicamente, estos transcritos muestran una complementariedad perfecta en al menos una región del RNA. De los 4 mecanismos de transcripción solapante descritos hasta el momento: RNA antisentidos, regiones 5' UTRs solapantes, regiones 3' UTRs solapantes y los operones no-contiguos, es esta última la que resulta mas intrigante. El concepto de operon como mecanismo de expresión de genes adyacentes que se transcriben en una misma molécula de RNA y cuya expresión se regula conjuntamente esta fuertemente establecido. Lo novedoso del concepto "operón no-contiguo" es que los genes que constituyen el operón no tienen porque estar seguidos y pueden estar intercalados con genes cuya transcripción ocurre en dirección contraria y, en consecuencia, generando un transcrito que es complementario al transcrito del operon en cuyo interior esta incluido.

Esta organización transcripcional no encaja con el paradigma clásico de operón, lo cual explicaría porqué ha pasado desapercibido anteriormente. La identificación de operones en los genomas bacterianos se ha considerado una información relevante porque la expresión conjunta de los genes adyacentes anticipa que existe una relación funcional entre las proteínas que codifican estos genes, y esta información puede ser importante para conocer la función de genes que codifican para proteínas de función desconocida. Esta es la razón por la cual existen varias aplicaciones informáticas dedicadas a la búsqueda automatizada de los operones presentes en el genoma de una bacteria. Estos programas utilizan como criterio para definir los operones que los genes estuviesen seguidos, a una distancia corta, y que su organización este conservada en otras especies. Lógicamente, con estos criterios de búsqueda, los operones no-contiguos, quedaban por definición descartados, porque no se entendía que genes que estuviesen separados por otro gen que se transcribe en dirección contraria pudiesen transcribirse conjuntamente y formar un operon. Un detalle importante en relación con los ejemplos de operones no-contiguos que hemos encontrado en el genoma de *S. aureus* es que las regiones codificantes que constituyen el operón no solapan con la región codificante del gen intercalado o divergente. Por tanto, el solapamiento solo se

produce a nivel de los mRNA pero no entre las regiones codificantes. La arquitectura transcripcional de los operones no-contiguos podría ser el resultado de una presión evolutiva para minimizar el tamaño del genoma y proporcionar una estrategia alternativa de coordinación de la expresión de las proteínas que codifican.

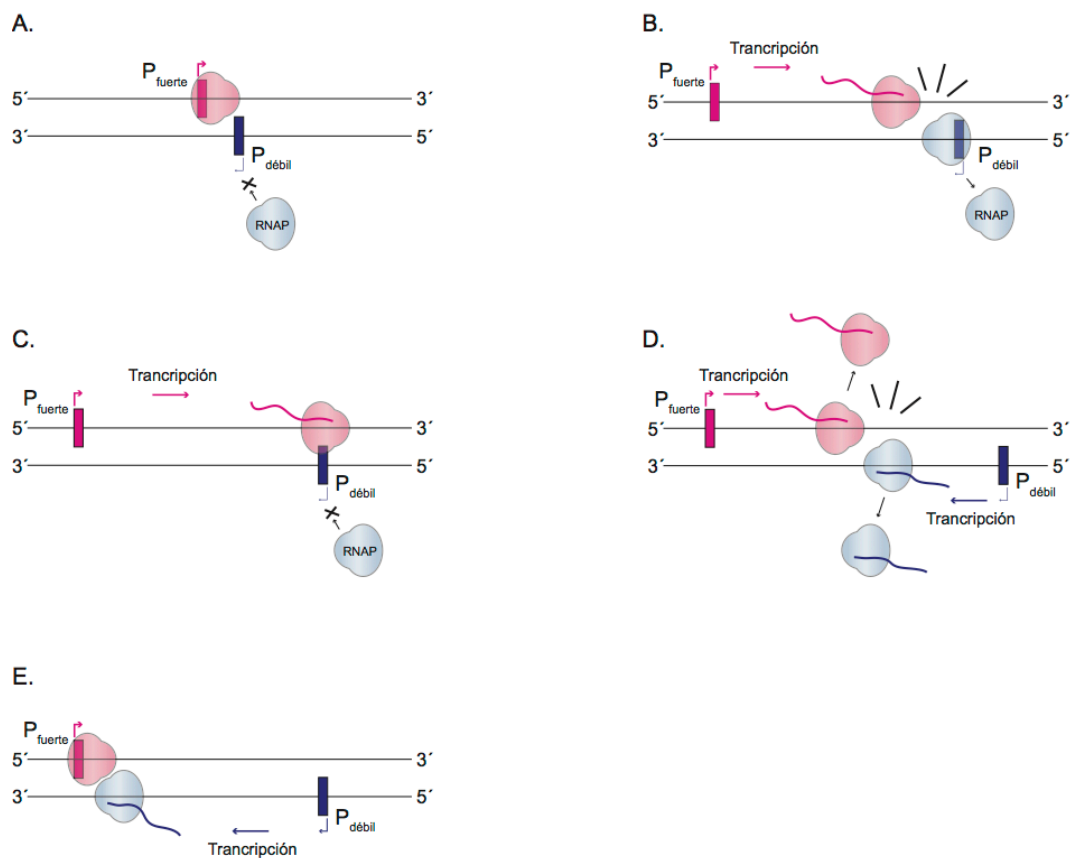
Nuestros resultados proporcionan evidencias de que existen, al menos, dos mecanismos de regulación a través de los cuales los operones no contiguos pueden coordinar la expresión de genes. El primero de los mecanismos está relacionado con la formación de moldes de doble cadena a través del solapamiento entre RNAs, esta complementariedad puede modificar la estabilidad o la traducción de los mRNAs (Brantl, 2007; Lasa *et al.*, 2012 ). Nuestros resultados indican que la digestión de los mRNAs solapantes mediada por RNasa III reprime la expresión del gen *MW1733* y al mismo tiempo provoca la digestión del mRNA tetracistrónico generando dos transcritos independientes. Los fragmentos resultantes pueden traducirse en proteínas a una velocidad similar o diferente a la que lo hacían antes del corte. Nuestros resultados indican que la inducción transcripcional del gen *MW1733* produce, por un lado, una reducción en los niveles de proteína MenC y, por el otro, la estabilización del transcrito *ytkD-MW1731* acumulándose así niveles más altos de proteína MW1731 que en la cepa salvaje. La digestión específica de regiones intergénicas mediada por RNasa III se ha estudiado anteriormente en *Escherichia coli* (Opdyke *et al.*, 2011). Opdyke *et al.* observaron que la unión del *cis*-RNA no codificante *gadY* a la región intercistrónica del mRNA *gadXW* era procesada por RNasa III dando lugar a una acumulación de transcritos monocistrónicos, probablemente debida a la estabilidad de los transcritos. De manera similar, se observó que la unión de un *cis*-RNA no codificante al mRNA *cII-O* del fago  $\lambda$  era procesada por RNasa III. Este procesamiento provocaba una degradación del fragmento situado aguas arriba de *cII* mientras el mRNA *O* situado aguas abajo permanecía estable. Como el sRNA solapa parcialmente con la región codificante de *cII* en su extremo 3' se concluyó que la degradación del transcrito *cII* se debía a un procesamiento mediado por RNasa III en esa región (Krinke and Wulff, 1990). Con respecto a los mecanismos que provocaban la estabilización del transcrito situado aguas abajo, es posible que la escisión pueda alterar la estructura secundaria de los transcritos para que sean menos susceptibles a la degradación. RNasa III no es la única endonucleasa implicada en el procesamiento del operón *ytkD-MW1731-menE-menC* dependiente de *MW1733* ya que se detectaron discretos fragmentos de RNA pertenecientes al operón tetracistrónico al sobreexpresar *MW1733* en ausencia de

---

RNasa III. Una línea de investigación futura debería dedicarse a la identificación de otras nucleasas que estén implicadas en el procesamiento.

El segundo mecanismo que contribuye a coordinar la expresión de los mRNA dentro del operon no-contiguo es la interferencia transcripcional. La interferencia transcripcional es un proceso mediante el cual un evento transcripcional tiene influencia “supresora”, directa y en *cis*, sobre otro evento transcripcional. La interferencia transcripcional resulta de la existencia de dos promotores, un promotor débil (o sensitivo) y un promotor fuerte (o agresivo) que reduce la expresión del anterior. Estos promotores pueden ser: **convergentes**, lo que provoca que los transcritos se solapen en una región; **en tándem**, un promotor se encuentra aguas arriba del otro, pero transcribiendo en igual dirección; y **solapantes**, en los cuales el sitio de unión de la RNA polimerasa (RNAP) tiene al menos una secuencia de DNA común. Se han descrito distintos mecanismos a través de los cuales puede tener lugar la interferencia transcripcional, uno de ellos es la denominada *competición de promotores* en el que la unión de la RNAP a una de las regiones promotoras impide la unión de otra RNAP en la otra región promotora (**Figura 22A**). En *E. coli*, el gen *aroP* codifica para una proteína de membrana cuya función es transportar aminoácidos aromáticos al interior de la bacteria. En la región promotora de *aroP* se encuentran los promotores P1, P2 y P3. P1 y P2 transcriben el mRNA de *aroP* mientras que P3 es un promotor divergente que además solapa con P1. TyrR es una proteína que reprime la transcripción de *aroP* en presencia de cualquier aminoácido. En ausencia de la proteína TyrR, la RNAP se une a P1 produciéndose el mRNA de *aroP*. Sin embargo, en presencia de TyrR u otros aminoácidos, la RNAP se une a P3 evitando su unión a P1 y por tanto la producción de más mRNA a partir de *aroP* (Wang *et al.*, 1998). Otro de los mecanismos de interferencia transcripcional es el denominado *pato sentado* en el que el complejo de elongación que avanza desde una región promotora fuerte puede golpear al complejo de elongación de la zona promotora débil si este ha sido demasiado lento en dar comienzo al proceso de transcripción (**Figura 22B**). Existen distintos estudios que proponen este mecanismo como el más fuerte cuando las regiones promotoras no están demasiado alejadas (Sneppen *et al.*, 2005; Callen *et al.*, 2004). La *oclusión* tiene lugar mediante la ocupación momentánea de una región promotora por una RNAP en proceso de elongación que viene desde otra región promotora (**Figura 22C**). Existen modelos matemáticos que predicen que este mecanismo de interferencia transcripcional solo puede ser eficiente si la región promotora a partir de la cual se produce el complejo de elongación es extremadamente fuerte produciéndose una rápida ocupación de la otra

región promotora (Sneppen *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2009). En la *colisión*, el choque de dos complejos de elongación convergentes da lugar a la terminación prematura del progreso de la transcripción de uno o ambos complejos (**Figura 22D**). Pequeñas diferencias en la fuerza de las regiones promotoras pueden dar lugar a una fuerte interferencia de la región promotora fuerte sobre la débil siendo esto mucho más frecuente en regiones largas de solapamiento (Sneppen *et al.*, 2005). El operón *ubiG-mccBA* de *Clostridium acetobutylicum* produce cisteína a partir de metionina, por ello, su expresión esta regulada positivamente en presencia de metionina y negativamente en presencia de cisteína. El mediador principal en la regulación de este proceso es un asRNA que se regula en función a la disponibilidad de azufre y muestra una regulación inversamente proporcional a la observada en el operón *ubiG-mccBA*. Este asRNA de 1000 nucleótidos no posee una estructura típica de terminador, lo que indica que la terminación de su transcripción tiene que llevarse a cabo mediante un mecanismo alternativo. Si se deleta el promotor del asRNA se rompe la regulación por azufre y esta regulación no se recupera si se expresa el asRNA en *trans*, lo que demuestra que existe un fenómeno de interferencia del asRNA con el operón *ubiG-mccBA*. La transcripción completa del asRNA depende de un riboswitch S-Box, en el cual la unión de S-adenosilmetionina provoca que el RNA adopte la conformación de terminador. Si no hay metionina no se da la terminación y el asRNA se transcribe en su totalidad controlando de esta manera la expresión del operón *ubiG-mccBA* (André *et al.*, 2008; Georg *et al.*, 2009; Stazic *et al.*, 2011; Georg and Hess, 2011). El último mecanismo posible de interferencia transcripcional es el *bloqueo* en el que una RNAP unida a una zona promotora podría bloquear el progreso de un complejo de elongación que venga desde la otra zona promotora (**Figura 22E**) (Epshtein *et al.*, 2003; Shearwin *et al.*, 2005).



**Figura 22.** Mecanismos de interferencia transcripcional (A) Competición de promotores (B) Mecanismo de pato sentado (C) Oclusión (D) Colisión (E) Bloqueo (Shearwin et al., 2005).

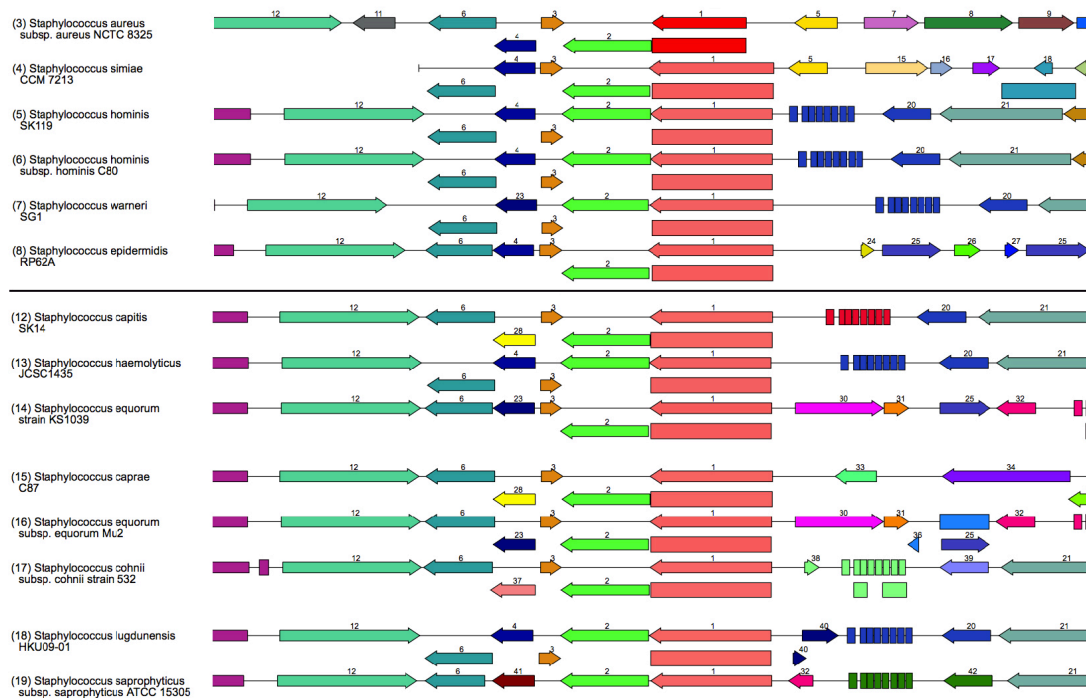
En el caso del operon *menE-menC-MW1733-ytkD-MW173*, como la distancia entre los promotores del operón tetracistrónico y el gen *MW1733* es mayor de 200 nucleótidos, el mecanismo más sencillo para provocar la interferencia transcripcional es la colisión entre la maquinaria de síntesis de RNA de una de las hebras de DNA con la maquinaria de transcripción de la otra hebra (Prescott and Proudfoot, 2002; Crampton *et al.*, 2006). El mayor hallazgo que apoya la existencia de interferencia transcripcional es que cuando la expresión de *MW1733* se produce desde una localización diferente del genoma, la sobreexpresión del operón tetracistrónico realizada deja de tener efecto en los niveles de expresión del mRNA de *MW733*. De manera similar, la expresión de *menC* y *MW1731* no se veía afectada cuando *MW1733* se expresaba en *trans* desde un plásmido. Este resultado es sorprendente porque uno esperaría que el apareamiento de los mRNA de *MW1733* y de *menE-menC-ytkD-MW1731* debería tener lugar independientemente de si estos transcritos se expresan en *cis* o en *trans*. Por lo tanto, la digestión de dichos transcritos mediada por RNasa III y otras endoribonucleasas debería tener lugar cuando *MW1733* se produce en *cis* o en *trans*. Sin embargo, la sobreexpresión de *MW1733* en *trans* no afecta a la expresión de *menC* y *MW1731*. Una posibilidad es que el emparejamiento y el procesamiento de los transcritos complementarios ocurra de forma menos eficiente cuando ambos transcritos se producen desde localizaciones genómicas diferentes. En este sentido, en un trabajo reciente del grupo de Amster-Choder (Kannaiah *et al.*, 2019) han analizado la organización espacio temporal del transcriptoma de *Escherichia coli*. Para ello utilizan una técnica que les permite fraccionar el RNA de la célula. De esta forma detectan que hay una localización del mRNA que es independiente de la traducción y que correlaciona con el destino final de las proteínas que codifica el gen. En base a estos resultados, no podemos descartar que los transcritos de *MW1733* y de *menE-menC-ytkD-MW1731* una vez desplazados a su localización final, no sean tan eficientemente degradados por RNasa III.

Una pregunta que plantea la existencia de los operones no-contiguos es para que existen, cual es la ventaja que proporcionan con respecto a la arquitectura clásica de transcripción de los operones convencionales. Las funciones exactas de la transcripción solapante son todavía objeto de debate y de echo, muchos autores cuestionan su función biológica y consideran que su presencia no obedece a ningún proceso regulado, sino que se genera lo que se ha venido denominando ruido transcripcional. El ruido transcripcional hace referencia a un proceso de transcripción que se produce a partir de secuencias que son reconocidas equivocadamente como promotoras por la RNA

polimerasa, de forma que se genera un transcrito en una región del genoma donde no debería haber transcripción (Lloréns-Rico *et al.*, 2016). Es cierto que problemas técnicos de los primeros procedimientos de generación de librerías de RNA para secuenciación masiva generaban falsos transcritos antisentido que procedían de la actividad DNA polimerasa DNA dependiente de las transcriptasas reversas (Perocchi *et al.*, 2007). La existencia y mantenimiento de la arquitectura transcripcional de los operones no-contiguos es una fuerte evidencia de que la transcripción solapante representa una estrategia específica de la regulación de genes basada en la transcripción solapante, porque en este caso los genes están situados de forma que los transcritos van a ser forzosamente solapantes. Es posible imaginar distintas razones por las que los operones no-contiguos pueden conferir un nivel superior de organización con respecto a los operones regulares. En primer lugar, permiten una expresión coordinada de los genes situados aguas arriba en el operón con respecto a los genes situados aguas abajo del gen superpuesto, de este modo se disminuye el ruido de la expresión génica y se asegura una estequiometría más precisa. En segundo lugar, permite la eliminación dependiente de endorribonucleasa de transcritos que escapan a los procesos regulares de represión de la transcripción. En tercer lugar, permite la regulación negativa (exclusión) de la expresión de genes solapantes mediante interferencia transcripcional independiente de la transcripción. En último lugar, ahorra espacio y disminuye la carga genética asociada con la selección de un motivo regulador determinado. Todos estos beneficios teóricos necesitan ser estudiados en profundidad para confirmar que esta organización transcripcional proporciona ventajas a las bacterias.

La disposición genética de *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* se conserva en todo el género *Staphylococcus* lo que sugiere que tiene una elevada relevancia funcional (**Figura 23**).

## Discusión



**Figura 23.** Conservación de la región menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731 en los genomas depositados en la base de datos PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>). El gen menE se utilizó como referencia para buscar genomas anotados en la base de datos. Los números se corresponden con los genes: 1, menE; 2, menC; 3, MW1733; 4, ytkD y 6, MW1731.



La disposición conservada de los genes sugiere fuertemente que obedece a una función biológica que esta fuertemente conservada en este género bacteriano. Lo único que conocemos de los genes del operon *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* es que MenE y MenC participan la síntesis de la menaquinona la cual resulta tremendamente importante como aceptor de electrones en la cadena respiratoria. Los otros genes codifican para proteínas cuya función se desconoce. *YtkD* codifica para, una nucleósido trifosfatasa, *MW1731* codifica para una dipeptidilaminopeptidasa implicada en el metabolismo y transporte de aminoácidos y *MW1733* codifica para un supuesto factor de inserción de proteínas integrales de membrana a la misma. Hemos realizado distintos experimentos para averiguar si la modificación de la arquitectura del operon *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* tenía algún efecto biológico sobre la bacteria al estudiar características asociadas al fenotipo SCV. Hemos observado que la cepa  $\Delta Pmen$  *PblaZ-MW1733* presentaba un tamaño de colonia significativamente menor al observado en la cepa salvaje y  $\Delta Pmen$ , además de un ritmo de crecimiento más lento. Esta ralentización del crecimiento se debía a un déficit en la síntesis de menaquinona ya que al añadir menadiona, precursor de la menaquinona, la cepa  $\Delta Pmen$  *PblaZ-MW1733* recuperaba su ritmo de crecimiento. La cepa  $\Delta Pmen$  *PblaZ-MW1733* también presentaba características de fenotipo SCV como son la reducción de la producción de pigmento staphyloxantina, un incremento en la resistencia a aminoglucósidos, una disminución en la capacidad de reducción de determinados compuestos y una activación de los procesos fermentativos. Por último, con respecto a los experimentos realizados *in vivo*, hemos confirmado que las bacterias con fenotipo SCV presentan mayor capacidad de persistencia intracelular y una mayor capacidad de supervivencia en el huésped al igual que ocurre con las SCV aisladas de pacientes con infecciones crónicas producidas por *S. aureus*.

Los resultados de estos experimentos no nos han permitido obtener conclusiones relevantes de cual es el impacto que esta arquitectura de transcripción tiene en la bacteria. Sin embargo, hemos observado que la inhibición en la expresión del operón *menE-menC-ytkD-MW1731* que provoca la sobreexpresión de *MW1733* supone un ejemplo de las posibilidades de regulación de esta disposición transcripcional con la aparición de un fenotipo SCVs asociado a la deficiencia en la síntesis de menaquinona en *S. aureus* (Proctor, 2018). Se han invertido muchos esfuerzos para identificar mutaciones auxotróficas derivadas de la formación de SCVs (Proctor et al., 2006; (Johns et al., 2015). Sin embargo, al examinar *S. aureus* aislados de pacientes o cultivos de

tejidos infectados con SCVs solo a el 20% se le atribuye una auxotrofia, lo que implica que probablemente existan otras vías de formación de SCVs (Proctor, 2018). En esta tesis, hemos observado que un incremento en la transcripción de *MW1733* y bajos niveles de transcripción del operón tetracistrónico inducen la formación de SCVs sin necesidad de generar una mutación. La generación de SCVs a través de este mecanismo proporciona la ventaja de producir variantes capaces de cambiar rápidamente y revertir el fenotipo salvaje de rápido crecimiento en el mismo momento en el que el microorganismo produce la infección, sin coste en el *fitness* de la bacteria relacionados con la generación de mutaciones que se tengan que revertir. De esta manera, la formación y estabilidad de las SCVs se regularían por condiciones ambientales que afectarían a los niveles transcripcionales del operón *menE-menC-MW1731-ytkD* y al gen *MW1733* y también por factores que afectarían a la unión entre transcritos solapantes y el posterior procesamiento mediado por RNasa III. Se necesita más trabajo para identificar los estímulos ambientales que podrían producir SCVs a través de esta arquitectura de transcripción.

Los resultados recogidos en esta tesis añaden mayor grado de complejidad al modelo inicial de regulación de los genes dentro de un operón descrito por F. Jacob y J. Monod incluyendo la transcripción solapante como una estrategia adicional que facilita la coordinación de los niveles de expresión de genes vecinos en bacterias.

# CONCLUSIONES

---



---

## CONCLUSIONES

1. El análisis del transcriptoma y los resultados experimentales con mutantes en los que se deleciona o sustituye el promotor situado aguas arriba del gen *menE* indica que los genes *menE-menC-ytkD-MW1731* constituyen una única unidad transcripcional.

2. El gen *MW1733*, situado entre los genes *menC* e *ytkD*, se transcribe en dirección contraria a la unidad transcripcional *menE-menC-ytkD-MW1731*. La arquitectura de transcripción *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* en la que un operon contiene en su interior un gen que se transcribe en dirección contraria ha sido denominada “operón no-contiguo”.

3. En el operón no-contiguo, la expresión de *menE-menC-ytkD-MW1731* y *MW1733* se regula de forma recíproca. El aumento en la expresión de *menE-menC-ytkD-MW1731* produce una disminución en la expresión *MW1733* y el aumento en la expresión de *MW1733* produce una disminución en la expresión de *menE-menC* y un incremento de *ytkD-MW1731*.

4. El mRNA de los operones *menE-menC-ytkD-MW1731* y *MW1733* es por definición antisentido y la endorribonucleasa RNasa III realiza la digestión de los RNA solapantes, afectando al procesamiento y la estabilidad de los transcritos.

5. La coordinación en la regulación de los transcritos de *menE-menC-ytkD-MW1731* y de *MW1733* ocurre cuando la transcripción tiene lugar en cis, pero desaparece cuando la transcripción tiene lugar en trans, sugiriendo que la interferencia transcripcional juega un papel muy importante en el proceso de regulación de la expresión de un operon no-contiguo.

6. La arquitectura de operon no-contiguo permite modificar la expresión del operon *menE-menC-ytkD-MW1731* de forma transitoria y facilitar la formación de colonias con fenotipo SCVs.



## CONCLUSIONS

---





---

## CONCLUSIONS

1. Transcriptome analysis and experimental data obtained with mutant strains in which the promoter upstream of the *menE* gene is either deleted or replaced indicates that the set of genes *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* constitute a single transcriptional unit.

2. The *MW1733* gene, located between the *menC* and *ytkD* genes, is transcribed in the opposite direction to the *menE-menC-ytkD-MW1731* transcriptional unit. The *menE-menC-MW1733-ytkD-MW1731* transcription architecture in which an operon contains a gene transcribed in the opposite direction has been named as “non-contiguous operon”.

3. In the non-contiguous operon transcriptional organization, the expression of *menE-menC-ytkD-MW1731* and *MW1733* is reciprocally regulated. An increase in *menE-menC-ytkD-MW1731* levels caused a reduction in *MW1733* expression levels whereas overexpression of the *MW1733* gene caused a decrease in *menE-menC* and an increase in *ytkD-MW1731* expression levels.

4. The mRNA of *menE-menC-ytkD-MW1731* and *MW1733* are antisense to each other and the double stranded endoribonuclease, RNase III, digest the overlapping RNAs affecting the processing and stability of the transcripts.

5. Reciprocal regulation between *menE-menC-ytkD-MW1731* and *MW1733* transcripts occurs when both transcripts are expressed in *cis* and disappears when they are expressed in *trans*, strongly suggesting that transcription interference plays an important role in the regulation of non-contiguous operon expression.

6. The non-contiguous operon architecture allows the transient modification of the *menE-menC-ytkD-MW1731* expression and thus facilitate the formation of colonies showing small colony variant (SCV) phenotype.

## REFERENCIAS

---

## REFERENCIAS

- Albrecht, M., Sharma, C. M., Reinhardt, R., Vogel, J., and Rudel, T. (2010) Deep sequencing-based discovery of the *Chlamydia trachomatis* transcriptome. *Nucleic Acids Res* **38**: 868–877.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5350–5354.
- Anderson, K. L., and Dunman, P. M. (2009) Messenger RNA turnover processes in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and emerging studies in *Staphylococcus aureus*. *Int J Microbiol* **2009**: 1–15.
- André, G., Even, S., Putzer, H., Burguière, P., Croux, C., Danchin, A., et al. (2008) S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*. *Nucleic Acids Res* **36**: 5955–5969.
- Archer, G. L. (1998) *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* **26**: 1179–1181.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Débarbouillé, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887–6891.
- Barber, M., and Rozwadowska-dowzenko, M. (1948). Infection by penicillin resistant staphylococci. *The Lancet* **2**: 641–644.
- Bohn, C., Bohn, C., Rigoulay, C., Rigoulay, C., Chabelskaya, S., Chabelskaya, S., et al. (2010) Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. *Nucleic Acids Res* **38**: 6620–6636.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., et al. (2007) *Staphylococcus aureus* RNAlII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* **21**: 1353–1366.
- Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**: 102–109.
- Bui, L. M. G., Hoffmann, P., Turnidge, J. D., Zilm, P. S., and Kidd, S. P. (2015) Prolonged growth of a clinical *Staphylococcus aureus* strain selects for a stable small colony variant cell type. *Infect Immun* **83**: 470–481.
- Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169–193.
- Callen, B. P., Shearwin, K. E., and Egan, J. B. (2004) Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Mol Cell* **14**: 647–656.

- Chambers, H. F. (1988) Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **1**: 173–186.
- Chambers, H. F., and DeLeo, F. R. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**: 629–641.
- Chao, Y., and Vogel, J. (2016) A 3'UTR-derived small RNA provides the regulatory noncoding arm of the inner membrane stress response. *Mol Cell* **61**: 352–363.
- Charpentier, E., Anton, A. I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R. P. (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6076–6085.
- Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H., and Xiong, Y-Q. (2004) Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **40**: 1–9.
- Crampton, N., Bonass, W. A., Kirkham, J., Rivetti, C., and Thomson, N. H. (2006) Collision events between RNA polymerases in convergent transcription studied by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* **34**: 5416–5425.
- Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingehayde, C., Dus, M., et al. (2008) An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* **453**: 798–802.
- Dean, M. A., Olsen, R. J., Long, S. W., Rosato, A. E., and Musser, J. M. (2014) Identification of point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* strains that produce small colony variants auxotrophic for menadione. *Infect Immun* **82**: 1600–1605.
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prévost, K., and Massé, E. (2009) Small RNA induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *The EMBO Journal* **28**: 1551–1561.
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167–193.
- Dornenburg, J. E., Devita, A. M., Palumbo, M. J., and Wade, J. T. (2010) Widespread antisense transcription in *Escherichia coli*. *mBio* **1**: 1-4.
- Epshtein, V., Toulmé, F., Rahmouni, A. R., Borukhov, S., and Nudler, E. (2003) Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *The EMBO Journal* **22**: 4719–4727.
- Felden, B., Vandenesch, F., Bouloc, P., and Romby, P. (2011) The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog* **7**: 1-10.
- Foster, T. J. (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 948–958.
- Foster, T. J., and Höök, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**: 484–488.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., and Höök, M. (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* **12**: 49–62.

- Fouquier d'Hérouel, A., Wessner, F., Halpern, D., Ly-Vu, J., Kennedy, S. P., Serror, P., et al. (2011) A simple and efficient method to search for selected primary transcripts: non-coding and antisense RNAs in the human pathogen *Enterococcus faecalis*. *Nucleic Acids Res* **39**: 1-14.
- Geisinger, E., Adhikari, R. P., Jin, R., Ross, H. F., and Novick, R. P. (2006) Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function. *Mol Microbiol* **61**: 1038-1048.
- Geissmann, T., Chevalier, C., Cros, M.-J., Boisset, S., Fechter, P., Noirot, C., et al. (2009) A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. *Nucleic Acids Res* **37**: 7239-7257.
- Georg, J., and Hess, W. R. (2011) Cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 286-300.
- Georg, J., Voß, B., Scholz, I., Mitschke, J., Wilde, A., and Hess, W. R. (2009) Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol* **5**: 1-17.
- Gladstone, G. P., and Van Heyningen, W. E. (1957) Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol* **38**: 123-137.
- Gordon, R. J., and Lowy, F. D. (2008) Pathogenesis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46**: S350-S359.
- Gottesman, S. (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**: 399-404.
- Gottesman, S., and Storz, G. (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: 1-16.
- Güell, M., van Noort, V., Yus, E., Chen, W.-H., Leigh-Bell, J., Michalodimitrakis, K., et al. (2009) Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**: 1268-1271.
- Hartleib, J., Köhler, N., Dickinson, R. B., Chhatwal, G. S., Sixma, J. J., Hartford, O. M., et al. (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* **96**: 2149-2156.
- Hinton, J. C. D., Hautefort, I., Eriksson, S., Thompson, A., and Rhen, M. (2004) Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr Opin Microbiol* **7**: 277-282.
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., et al. (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J* **24**: 824-835.
- Jensen, T. H., Jacquier, A., and Libri, D. (2013) Dealing with pervasive transcription. *Mol Cell* **52**: 473-484.

- Johns, B. E., Purdy, K. J., Tucker, N. P., and Maddocks, S. E. (2015) Phenotypic and genotypic characteristics of small colony variants and their role in chronic infection. *Microbiol Insights* **8**: 15–23.
- Kahl, B., Herrmann, M., Everding, A. S., Koch, H. G., Becker, K., Harms, E., et al. (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **177**: 1023–1029.
- Kannaiah, S., Livny, J., and Amster-Choder, O. (2019) Spatiotemporal organization of the *E. coli* transcriptome: translation independence and engagement in regulation. *Molecular Cell* **76**: 1–16.
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Dutttagupta, R., Willingham, A. T., et al. (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* **316**: 1484–1488.
- Kawano, M., Aravind, L., and Storz, G. (2007) An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol Microbiol* **64**: 738–754.
- King, A. N., Borkar, S. A., Samuels, D. J., Batz, Z., Bulock, L. L., Sadykov, M. R., et al. (2018) Guanine limitation results in CodY-dependent and -independent alteration of *Staphylococcus aureus* physiology and gene expression. *J Bacteriol* **200**: 1–19.
- Klinkert, B., and Narberhaus, F. (2009) Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2661–2676.
- Kluytmans, J., van Belkum, A., and Verbrugh, H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* **10**: 505–520.
- Koch, G., Yepes, A., Förstner, K. U., Wermser, C., Stengel, S. T., Modamio, J., et al. (2014) Evolution of resistance to a last resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via bacterial competition. *Cell* **158**: 1060–1071.
- Koide, T., Reiss, D. J., Bare, J. C., Pang, W. L., Facciotti, M. T., Schmid, A. K., et al. (2009) Prevalence of transcription promoters within archaeal operons and coding sequences. *Mol Syst Biol* **5**: 1–16.
- Krinke, L., and Wulff, D. L. (1990) RNase III-dependent hydrolysis of lambda cII-O gene mRNA mediated by lambda OOP antisense RNA. *Genes Dev* **4**: 2223–2233.
- Kröger, C., Dillon, S. C., Cameron, A. D. S., Papenfort, K., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., et al. (2012) The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 1277–1286.
- Lannergård, J., Eiff, von, C., Sander, G., Cordes, T., Seggewiß, J., Peters, G., et al. (2008) Identification of the genetic basis for clinical menadione auxotrophic small colony variant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4017–4022.
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., and Gingeras, T. R. (2012) An effort to make sense of antisense transcription in bacteria. *RNA Biol* **9**: 1039–1044.

- 
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., Dobin, A., Villanueva, M., de los Mozos, I. R., Vergara-Irigaray, M., et al. (2011) Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 20172–20177.
- Lee, E.-J., and Groisman, E. A. (2010) An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. *Mol Microbiol* **76**: 1020–1033.
- Lioliou, E., Romilly, C., Romby, P., and Fechter, P. (2010) RNA-mediated regulation in bacteria: from natural to artificial systems. *N Biotechnol* **27**: 222–235.
- Lioliou, E., Sharma, C. M., Caldelari, I., Helfer, A. C., Fechter, P., Vandenesch, F., et al. (2012) Global regulatory functions of the *Staphylococcus aureus* endoribonuclease III in gene expression *PLoS Genet* **8**: 1-21.
- Lloréns-Rico, V., Cano, J., Kamminga, T., Gil, R., Latorre, A., Chen, W.-H., et al. (2016) Bacterial antisense RNAs are mainly the product of transcriptional noise *Sci Adv* **2**: 1-9.
- López-Garrido, J., Puerta-Fernández, E., and Casadesús, J. (2014) A eukaryotic like-3' untranslated region in *Salmonella enterica* *hilD* mRNA. *Nucleic Acids Res* **42**: 5894–5906.
- Lu, X., Zhou, R., Sharma, I., Li, X., Kumar, G., Swaminathan, S., et al. (2012) Stable analogues of OSB-AMP: potent inhibitors of MenE, the o-succinylbenzoate-CoA synthetase from bacterial menaquinone biosynthesis. *ChemBioChem* **13**: 129–136.
- Lybecker, M., Zimmermann, B., Bilusic, I., Tukhtubaeva, N., and Schroeder, R. (2014) The double stranded transcriptome of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 3134–3139.
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J. E., Winkler, W. C., and Breaker, R. R. (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**: 577–586.
- Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V., and Xu, Y. (2009) DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res* **37**: 459–463.
- McGrath, P. T., Lee, H., Zhang, L., Iniesta, A. A., Hottes, A. K., Tan, M. H., et al. (2007) High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. *N Biotechnol* **25**: 584–592.
- McNamara, P. J., and Proctor, R. A. (2000) *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents* **14**: 117–122.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* **3**: 1-10.
- Miyakoshi, M., Chao, Y., and Vogel, J. (2015) Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. *Curr Opin Microbiol* **24**: 132–139.
-

- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**: 2176–2186.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T., and Chowdhury, S. (2006) RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 3–16.
- Novick, R. P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429–1449.
- Novick, R. P., and Geisinger, E. (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* **42**: 541–564.
- Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**: 3967–3975.
- Opdyke, J. A., Fozo, E. M., Hemm, M. R., and Storz, G. (2011) RNase III participates in GadY dependent cleavage of the *gadX gadW* mRNA. *J Mol Biol* **406**: 29–43.
- Opdyke, J. A., Kang, J.-G., and Storz, G. (2004) GadY, a small RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 6698–6705.
- Palmer, A. C., Ahlgren-Berg, A., Egan, J. B., Dodd, I. B., and Shearwin, K. E. (2009) Potent transcriptional interference by pausing of RNA polymerases over a downstream promoter. *Mol Cell* **34**: 545–555.
- Papenfort, K., Sun, Y., Miyakoshi, M., Vanderpool, C. K., and Vogel, J. (2013) Small RNA-Mediated Activation of Sugar Phosphatase mRNA Regulates Glucose Homeostasis. *Cell* **153**: 426–437.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., and Höök, M. (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**: 585–617.
- Peacock, S. J., and Paterson, G. K. (2015) Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem* **84**: 577–601.
- Perkins, T. T., Kingsley, R. A., Fookes, M. C., Gardner, P. P., James, K. D., Yu, L., et al. (2009) A strand-specific RNA-Seq analysis of the transcriptome of the typhoid bacillus *Salmonella typhi*. *PLoS Genet* **5**: 1-13.
- Perocchi, F., Xu, Z., Clauder-Münster, S., and Steinmetz, L. M. (2007) Antisense artifacts in transcriptome microarray experiments are resolved by actinomycin D. *Nucleic Acids Res* **35**: 1-7.
- Poupel, O., Proux, C., Jagla, B., Msadek, T., and Dubrac, S. (2018) SpdC, a novel virulence factor, controls histidine kinase activity in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **14**: 1-32.
- Prescott, E. M., and Proudfoot, N. J. (2002) Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8796–8801.



- Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J.-F., Phaneuf, É., and Massé, E. (2007) The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* **64**: 1260–1273.
- Proctor, R. A. (2018) *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 1-8.
- Proctor, R. A., Eiff, von, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., and Peters, G. (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* **4**: 295–305.
- Proctor, R. A., Kahl, B., Eiff, von, C., Vaudaux, P. E., Lew, D. P., and Peters, G. (1998) Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* **27**: 68–74.
- Proctor, R. A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J. N., and Arbeit, R. D. (1995) Persistent and relapsing infections associated with small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **20**: 95–102.
- Rasmussen, S., Nielsen, H. B., and Jarmer, H. (2009) The transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **73**: 1043–1057.
- Remmele, C. W., Xian, Y., Albrecht, M., Faulstich, M., Fraunholz, M., Heinrichs, E., et al. (2014) Transcriptional landscape and essential genes of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nucleic Acids Res* **42**: 10579–10595.
- Romilly, C., Caldelari, I., Parmentier, D., Lioliou, E., Romby, P., and Fechter, P. (2012) Current knowledge on regulatory RNAs and their machineries in *Staphylococcus aureus*. *RNA Biol* **9**: 402–413.
- Roth, A., and Breaker, R. R. (2009) The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu Rev Biochem* **78**: 305–334.
- Ruiz de Los Mozos, I., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Villanueva, M., Bitarte, N., Saramago, M., et al. (2013) Base pairing interaction between 5′- and 3′-UTRs controls *icaR* mRNA translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet* **9**: 1-18.
- Schenk, S., and Laddaga, R. A. (1992) Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **73**: 133–138.
- Selinger, D. W., Cheung, K. J., Mei, R., Johansson, E. M., Richmond, C. S., Blattner, F. R., et al. (2000) RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *N Biotechnol* **18**: 1262–1268.
- Sendi, P., and Proctor, R. A. (2009) *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol* **17**: 54–58.
- Sesto, N., Wurtzel, O., Archambaud, C., Sorek, R., and Cossart, P. (2013) The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat Rev Microbiol* **11**: 75–82.

- Sharma, C. M., Darfeuille, F., Plantinga, T. H., and Vogel, J. (2007) A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* **21**: 2804–2817.
- Sharma, C. M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiß, S., Sittka, A., et al. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **464**: 250–255.
- Shearwin, K. E., Callen, B. P., and Egan, J. B. (2005) Transcriptional interference—a crash course. *Trends Genet* **21**: 339–345.
- Shopsin, B., Eaton, C., Wasserman, G. A., Mathema, B., Adhikari, R. P., Agolory, S., et al. (2010) Mutations in *agr* do not persist in natural populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Infect Dis* **202**: 1593–1599.
- Siezen, R. J., Wilson, G., and Todt, T. (2010) Prokaryotic whole transcriptome analysis: deep sequencing and tiling arrays. *Microb Biotechnol* **3**: 125–130.
- Simons, R. W., and Kleckner, N. (1983) Translational control of IS10 transposition. *Cell*, **34**: 683–691.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., et al. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* **68**: 6871–6878.
- Smyth, G. K., and Speed, T. (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**: 265–273.
- Sneppen, K., Dodd, I. B., Shearwin, K. E., Palmer, A. C., Schubert, R. A., Callen, B. P., and Egan, J. B. (2005) A mathematical model for transcriptional interference by RNA polymerase traffic in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **346**: 399–409.
- Somerville, G. A., and Proctor, R. A. (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 233–248.
- Sorek, R., and Cossart, P. (2010) Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet* **11**: 9–16.
- Soutourina, O. A., Monot, M., Boudry, P., Saujet, L., Pichon, C., Sismeiro, O., et al. (2013) Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet* **9**: 1–18.
- Srinivasan, K., Shiue, L., Hayes, J. D., Centers, R., Fitzwater, S., Loewen, R., et al. (2005) Detection and measurement of alternative splicing using splicing sensitive microarrays. *Methods* **37**: 345–359.
- Stazic, D., Lindell, D., and Steglich, C. (2011) Antisense RNA protects mRNA from RNase E degradation by RNA-RNA duplex formation during phage infection. *Nucleic Acids Res* **39**: 4890–4899.
- Thomason, M. K., and Storz, G. (2010) Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing?. *Annu Rev Genet* **44**: 167–188.

- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., et al. (2009) The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**: 950–956.
- Tomasini, A., Francois, P., Howden, B. P., Fechter, P., Romby, P., and Caldelari, I. (2014) The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* **21**: 616–626.
- Traber, K. E., Lee, E., Benson, S., Corrigan, R., Cantera, M., Shopsin, B., and Novick, R. P. (2008) *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* **154**: 2265–2274.
- Tuchscher, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., Eiff, von, C., et al. (2010) *Staphylococcus aureus* small colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *Int J of Infect Dis* **202**: 1031–1040.
- Uhlén, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., and Lindberg, M. (1984) Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A *J Biol Chem* **259**: 1695–1702.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15264–15269.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Amorena, B., Penadés, J. R., and Lasa, I. (2003) SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **48**: 1075–1087.
- Van der Meulen, S. B., de Jong, A., and Kok, J. (2016) Transcriptome landscape of *Lactococcus lactis* reveals many novel RNAs including a small regulatory RNA involved in carbon uptake and metabolism. *RNA Biol* **13**: 353–366.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E., et al. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**: 243–251.
- Villanueva, M., García, B., Valle, J., Rapún, B., Ruiz de Los Mozos, I., Solano, C., et al. (2018) Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun* **9**: 1–12.
- Vogel, J., Bartels, V., Tang, T. H., Churakov, G., Slagter-Jäger, J. G., Hüttenhofer, A., and Wagner, E. G. H. (2003) RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res* **31**: 6435–6443.
- Wade, J. T., and Grainger, D. C. (2014) Pervasive transcription: illuminating the dark matter of bacterial transcriptomes. *Nat Rev Microbiol* **12**: 647–653.
- Wagner, E. G. H., and Romby, P. (2015) Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet* **90**: 133–208.
- Wakeman, C. A., Hammer, N. D., Stauff, D. L., Attia, A. S., Anzaldi, L. L., Dikalov, S. I., et al. (2012) Menaquinone biosynthesis potentiates haem toxicity in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **86**: 1376–1392.

- Wang, P., Yang, J., Ishihama, A., and Pittard, A. J. (1998) Demonstration that the TyrR protein and RNA polymerase complex formed at the divergent P3 promoter inhibits binding of RNA polymerase to the major promoter, P1, of the *aroP* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 5466–5472.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57–63.
- Waters, L. S., and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615–628.
- Xue, T., Zhang, X., Sun, H., and Sun, B. (2014) ArtR, a novel sRNA of *Staphylococcus aureus*, regulates  $\alpha$ -toxin expression by targeting the 5' UTR of *sarT* mRNA. *Med Microbiol Immunol* **203**: 1–12.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T. P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: 1–10.
- Yeo, W.-S., Arya, R., Kim, K. K., Jeong, H., Cho, K. H., and Bae, T. (2018) The FDA-approved anti-cancer drugs, streptozotocin and floxuridine, reduce the virulence of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* **8**: 1–10.
- Yoder-Himes, D. R., Chain, P. S. G., Zhu, Y., Wurtzel, O., Rubin, E. M., Tiedje, J. M., and Sorek, R. (2009) Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response via high throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 3976–3981.
- Zamboni, N., and Sauer, U. (2003) Knockout of the high-coupling cytochrome *aa<sub>3</sub>* oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 121–126.
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G., and Gottesman, S. (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**: 1111–1124.