

Regulación de la expresión genética por sRNA en bacterias

Getzabeth González y Katy Juárez*

*Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos*

**katy@ibt.unam.mx*

Resumen

Los sRNA son RNAs no codificantes presentes en los transcriptomas bacterianos que participan en la regulación de diversos procesos celulares tales como la respuesta detectora de quórum, formación de biopelícula, regulación de la asimilación de hierro, virulencia y metabolismo del carbono. Debido al creciente interés en su estudio, la identificación y caracterización de sRNAs se ha expandido a diversos grupos bacterianos. Actualmente, las tecnologías de secuenciación masiva están siendo ampliamente utilizadas tanto para su identificación *de novo* así como para la identificación de sus genes blanco y proteínas con las cuales interactúan. Recientemente, la biología sintética se ha encargado de diseñar RNAs sintéticos basados en los modelos de regulación de los sRNAs bacterianos para el control de la expresión genética. Estos sRNAs están siendo utilizados exitosamente en la ingeniería de vías metabólicas para la síntesis de productos de interés biotecnológico.

Palabras clave: sRNA, regulación genética, bacterias, secuenciación masiva

Abstract

sRNAs are non-coding RNAs present in bacterial transcriptomes that act in regulatory circuits in various cellular processes such as *quorum sensing*, biofilm formation, iron sequestration and scavenging, virulence and carbon metabolism. Due to growing interest in their study, the identification and characterization of sRNAs have expanded to various bacterial groups. Currently, high-throughput sequencing technologies are the most used for their identification and characterization, as well as for the discovery of target genes regulated by sRNA and the determination of their interaction with proteins. Recently, synthetic biology has been in charge of designing synthetic RNAs based on regulatory models of bacterial sRNAs for the control of gene expression. These sRNAs are being successfully used in the engineering of metabolic pathways for the synthesis of products of biotechnological interest.

Key words: sRNA, genetic regulation, bacteria, high-throughput sequencing

Introducción

Recientemente se ha demostrado que los sRNAs (*small RNAs* por su siglas en inglés) juegan un papel clave en los circuitos de regulación en los tres dominios de la vida (Michaux et al., 2014). Aunque este tipo de RNA reguladores fueron descubiertos inicialmente en bacterias y, posteriormente, en eucariontes, no fue sino hasta varios años después que el interés en su estudio incrementó exponencialmente.

Los primeros trabajos relacionados con la identificación de sRNAs en bacterias y su rol en la regulación de la expresión comenzaron en los años 80 con el descubrimiento del primer sRNA en *E. coli*: MicF, el cual inhibe la traducción del mRNA que codifica para la porina OmpF (Mizuno et al. 1984). En los años subsiguientes a este hallazgo el avance en el descubrimiento y caracterización de sRNA en bacterias fue muy lento, para el año 2001 habían sido identificados aproximadamente 35 sRNAs en *E. coli* (Wagner & Romby, 2015). Gracias al desarrollo de metodologías que emplean secuenciación masiva, actualmente se tienen identificados y caracterizados 123 sRNAs en el genoma de *E. coli* K-12 (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>) y la búsqueda, identificación y caracterización de sRNAs en otros grupos bacterianos se encuentra en constante aumento.

Definición y clasificación de los sRNAs en bacterias

Los sRNAs son un grupo de RNAs no codificantes, con un tamaño que va de 50 a 500 nucleótidos que actúan en respuesta a señales ambientales y su mecanismo de acción se da a nivel transcripcional o post-transcripcional, ya sea incrementando o reprimiendo la expresión de su gen blanco (Waters & Storz 2009). Generalmente, los sRNA bacterianos son clasificados en tres grupos: codificados en *cis*, codificados en *trans* y *antisentido* (Zorgani et al. 2016).

Dentro del grupo de sRNA codificados en *cis* se encuentran los "riboswitches", los cuales se localizan en las regiones sin traducir (UTR) 5' de los RNAs mensajeros y se encargan de regular la expresión del gen que se encuentra río abajo (Mellin & Cossart 2015). Los RNAs de este grupo forman estructuras que al interactuar con un ligando (metabolito o algún ión) es inducido un cambio conformacional en su estructura, lo que ocasiona la activación o inhibición de la traducción del gen río abajo (Mandal & Breaker, 2004). La estructura básica de un "riboswitch" consiste en dos dominios: un aptámero que se une al ligando y una plataforma de expresión que cambia su estructura en respuesta a esta unión (Figura 1).

Los "riboswitches" que detectan purinas son los más ampliamente estudiados debido a su tamaño relativamente pequeño, lo cual los convierte en buenos candidatos para su estudio a nivel bioquímico y biofísico.

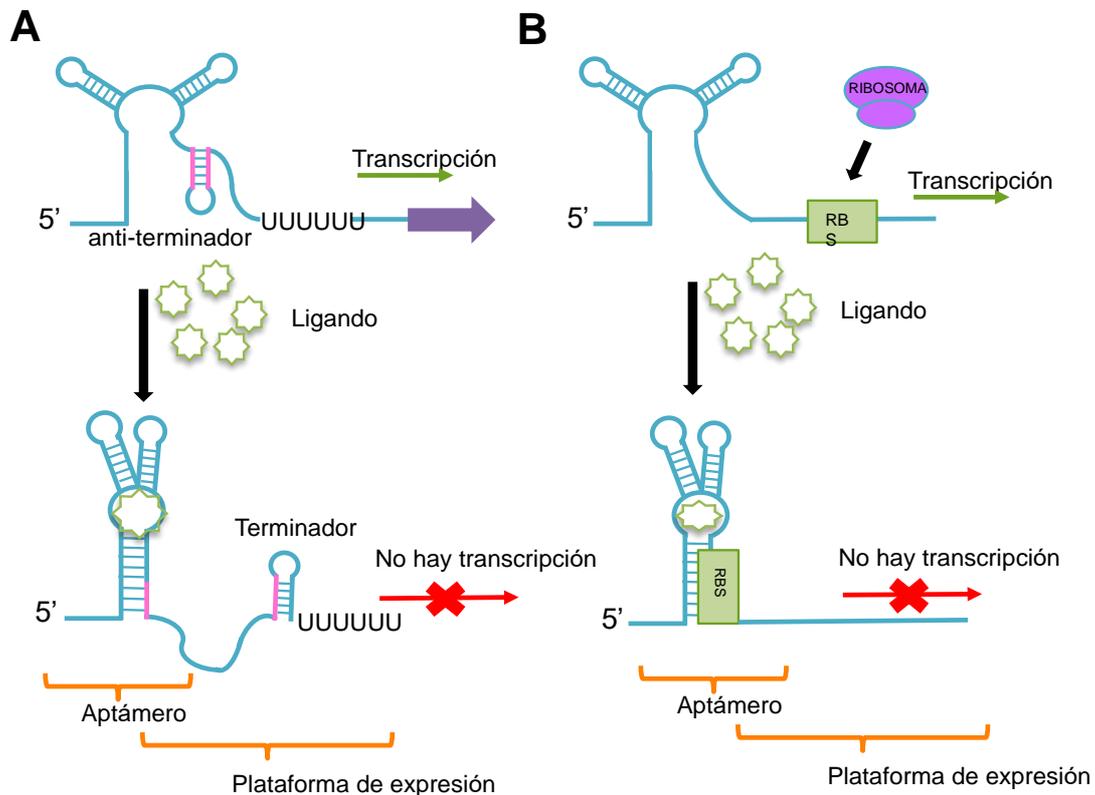


Figura 1. Mecanismos de regulación de un Riboswitch. A) Terminación de la transcripción: un ligando se une a la región del aptámero y forma una estructura de horquilla que abre el bucle anti-terminación y ayuda en la formación del bucle de terminación. B) Bloqueo del inicio de la traducción: la unión al ligando conduce a la formación de una horquilla que bloquea el RBS (sitio de unión a ribosoma), el cual no está disponible para iniciar la traducción.

Además, son capaces de detectar adenina, guanina, di-GMP cíclico (di-guanilato cíclico) (Barrick & Breaker, 2007) y son el único grupo de "riboswitches" que pueden afectar positiva y negativamente la expresión de genes (Vineetha et al. 2012).

El segundo grupo corresponde a los codificados en *trans* (Figura 2), los cuales se encuentran ubicados en sitios alejados de su mRNA blanco por lo que solo son parcialmente complementarios (Bobrovskyy & Vanderpool, 2013), con una región de unión típicamente de 10 a 25 nucleótidos (Peer & Margalit, 2011). Se ha reportado

que este tipo de sRNA requieren de la interacción con proteínas chaperonas (por ejemplo Hfq en *E. coli* y bacterias relacionadas) para promover la unión con su mRNA blanco (Vogel & Luisi, 2011).

Debido a su complementariedad parcial pueden tener múltiples blancos, lo cual deja abierta la hipótesis de que este tipo de sRNAs son capaces de modular globalmente, una respuesta fisiológica particular de una manera muy parecida a la de un factor de transcripción, pero a un nivel post-transcripcional (Gottesman & Storz, 2010).

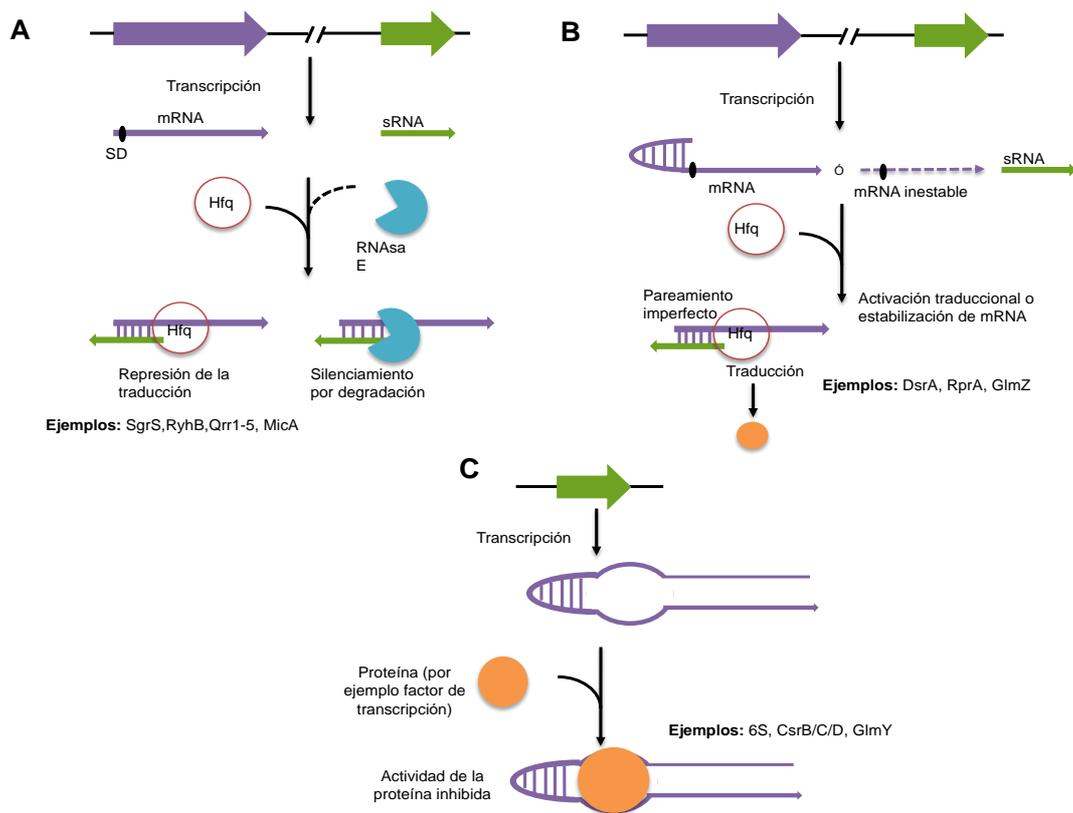


Figura 2. Diferentes tipos de sRNAs basados en su mecanismo de acción. Los sRNAs codificados en *trans* pueden unirse a su blanco por complementariedad parcial y A) reprimir, B) activar la traducción o C) interactuar con proteínas como factores de transcripción e inhibir su actividad. Imagen modificada de (Liu & Camilli 2010).

Generalmente, este tipo de sRNA es producido en respuesta a estrés metabólico o ambiental como la limitación de hierro (Massé et al. 2007), sobrecarga de azúcares-fosfatos (Vanderpool & Gottesman, 2007) y estrés oxidativo (Altuvia et al. 1997).

Por último, los RNAs *antisentido* (asRNA) son aquellos que se transcriben en la hebra opuesta de su gen blanco, lo cual le confiere una complementariedad total (Figura 3). Su longitud varía entre los 100 y 700 nucleótidos y pueden regular la expresión de su blanco a nivel transcripcional, traduccional o tener efectos en la estabilidad del mRNA blanco

(Thomason & Storz, 2010). En la interacción de los asRNA con su blanco, se altera la estructura secundaria de ambos RNAs y se forma un RNA dúplex que influye en la estabilidad y vida media del RNA ya que, en algunos casos, la formación de dicha estructura conlleva a una degradación de ambos RNAs (Georg & Hess, 2011).

En años recientes, se ha reportado que la transcripción antisentido está ampliamente distribuida en los genomas bacterianos (Lasa & Toledo-Arana, 2011; Thomason et al. 2014). En *Helicobacter pylori* se reportó que el 27% de su

transcriptoma corresponde a transcritos

antisentido (Sharma et al. 2010).

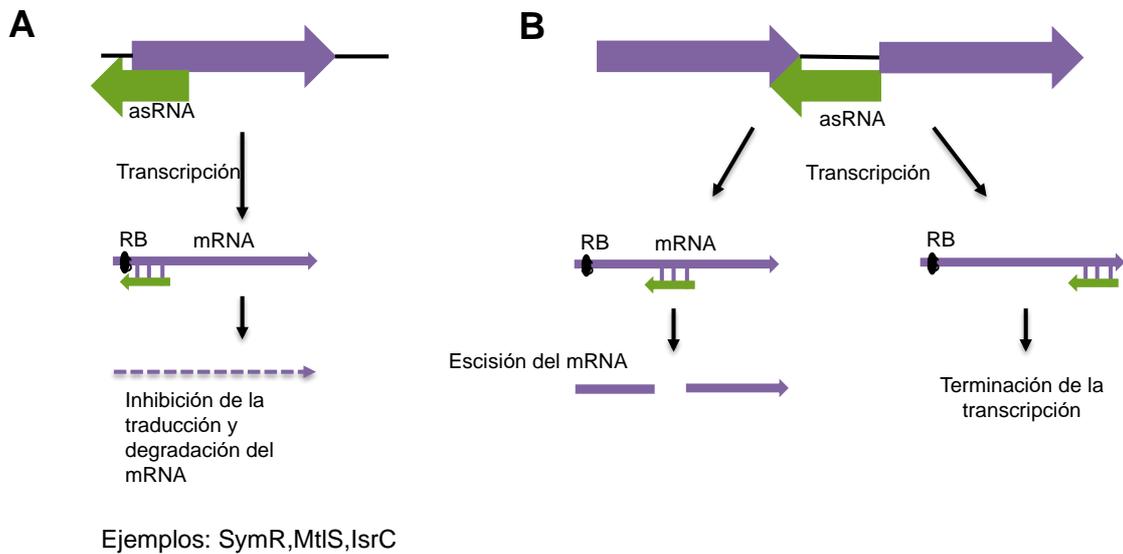


Figura 3. Mecanismos de regulación de un RNA anti-sentido. A) asRNA codificado en la hebra opuesta a la región 5' UTR de su mRNA blanco que inhibe el sitio de unión a ribosoma (RBS). B) El asRNA se une a su mRNA separando dos genes de un operón o propiciando la terminación de la transcripción. Imagen modificada de (Waters & Storz 2009).

Sin embargo, solo un número reducido de asRNAs han sido caracterizados funcionalmente y su relevancia biológica aún es poco clara (Raghavan et al. 2012), por lo que algunos autores proponen que este tipo de transcritos son en gran medida producidos por ruido transcripcional (Lloréns-Rico et al. 2016).

Avances recientes en la identificación y caracterización de sRNAs en bacterias

Inicialmente, la identificación de sRNAs se realizó mediante la detección de su abundancia en geles de acrilamida, como fragmentos genómicos clonados que modulaban ciertas actividades o inclusive por serendipia (Wassarman et al. 1999). Posteriormente, se emplearon técnicas de clonación para su detección, así como el diseño de microarreglos con sondas en regiones intergénicas (Altuvia, 2007).

Paralelamente, se comenzaron a utilizar herramientas bioinformáticas para la búsqueda masiva de estos reguladores en los genomas bacterianos; sin embargo, estas herramientas se basan en la búsqueda de homólogos y patrones de conservación por lo que estas aproximaciones tienen una alta tasa de falsos positivos (Richter & Backofen, 2012).

Actualmente, las técnicas de RNA-seq han demostrado ser herramientas poderosas para la identificación *de novo* de sRNAs (Sorek & Cossart, 2010; Sharma & Vogel, 2014). En los últimos años, ha habido un incremento en el desarrollo de metodologías para la identificación más precisa de este tipo de transcritos, que van desde métodos para la selección de mRNA sin procesar (Sharma et al. 2010), hasta el

mapeo de los sRNA unidos a su blanco

(Melamed et al. 2016) (Figura 4).

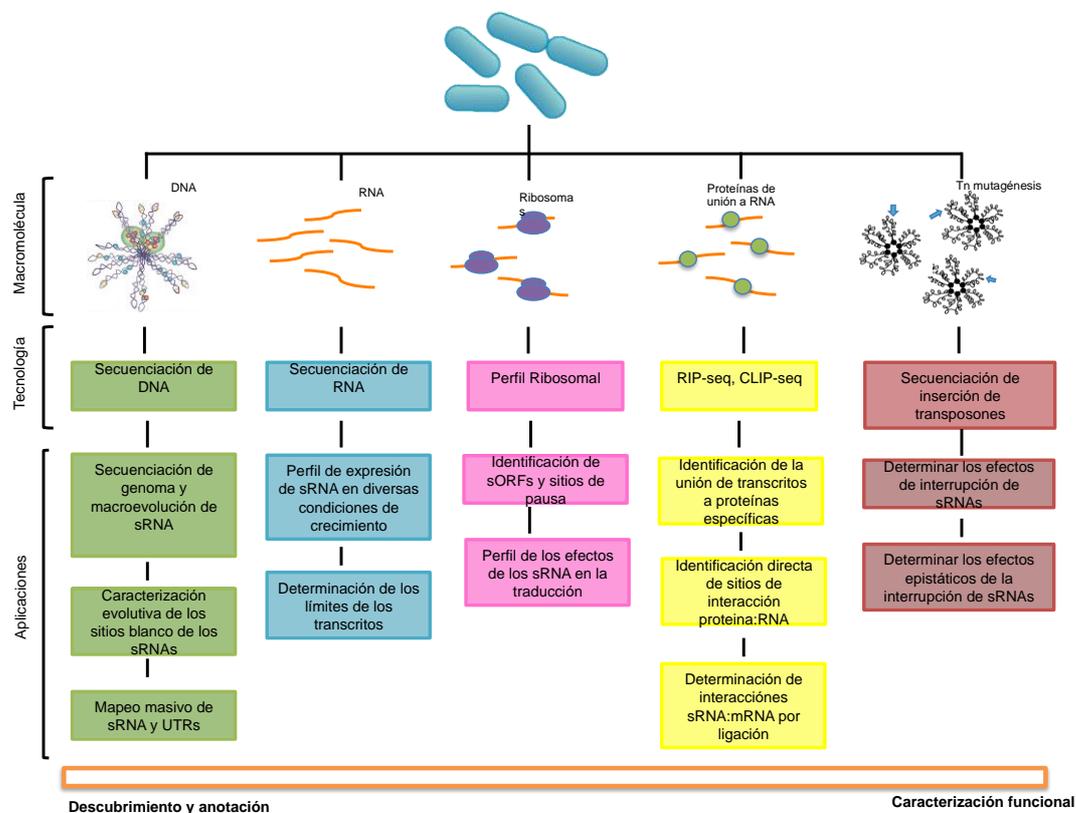


Figura 4. Resumen de los métodos de secuenciación masiva utilizados para la identificación y caracterización de sRNA bacterianos. El uso de cada uno de los métodos depende de la macromolécula a estudiar: DNA, RNA, ribosomas o proteínas de unión a RNA. Abreviaciones: CLIP (*cross-linking and immunoprecipitation*), sORF (*short open reading frame*), RIP (*RNA immunoprecipitation*). Imagen modificada (Barquist & Vogel 2015).

Todas las metodologías anteriormente mencionadas han servido para el descubrimiento de nuevos sRNA, su anotación, inferir acerca de su funcionalidad, así como para la identificación de sus posibles blancos; sin embargo, los hallazgos obtenidos por estas metodologías deben ser comprobados experimentalmente por métodos tradicionales de biología molecular.

¿Cuál es el papel de los sRNA en los circuitos de regulación bacterianos?

Aunque se ha demostrado que los sRNA están involucrados en la regulación genética de diversos procesos fisiológicos y metabólicos (Bobrovskyy & Vanderpool, 2013), en las siguientes secciones nos centraremos en la regulación de la homeostasis del hierro (Fe) y en el metabolismo del carbono.

Regulación de la adquisición de Fe

El Fe es esencial para los organismos; sin embargo, en altas concentraciones es potencialmente tóxico, por lo que son

necesarios mecanismos que controlen de manera precisa su incorporación a las células. En las bacterias, la expresión de los genes implicados en el metabolismo de Fe usualmente se encuentran regulados por una proteína represora llamada Fur (Fe uptake repressor por sus siglas en inglés) que actúa en función de las concentraciones de Fe en el ambiente (Andrews et al. 2003).

En el año 2002 Masse y Gottesman reportaron en *E. coli* la identificación de RyhB, un sRNA de 90 nucleótidos de longitud involucrado en la regulación de algunos genes del metabolismo de hierro (Massé & Gottesman, 2002). Cuando en el medio existen altas concentraciones de Fe, Fur se une a RyhB permitiendo la expresión de los genes que reprime, mientras que a bajas concentraciones de Fe, Fur libera a RyhB y éste se une a sus genes blanco bloqueando su expresión (Figura 5).

En *E. coli* los genes que se encuentran regulados por RyhB incluyen genes que codifican para proteínas de almacenamiento de Fe (*Ftn* y *Bfr*), enzimas

del ciclo de Krebs (*acnA*, *fumA* y operón *sdh*) y la superóxido dismutasa (*sodB*) (Masse et al. 2005). Este mecanismo de regulación asegura la producción de proteínas de almacenamiento y transporte en condiciones de abundancia de Fe, mientras que cuando hay poco Fe en el medio RyhB impide la producción de dichas proteínas (Oglesby-Sherrouse & Murphy, 2013).

Cuando se reportó la identificación de *RyhB* en *E. coli*, se observó que este sRNA se encontraba conservado en otros géneros bacterianos Gram negativos como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia* y *Vibrio* (Massé & Gottesman, 2002). Estudios posteriores han detectado la presencia de sRNAs en diferentes géneros bacterianos, que aunque no poseen homología con *RyhB*, presentan funciones similares, como el caso de los sRNAs *PrrF1* y *PrrF2* en *P. aeruginosa* (Wilderman et al. 2004). Este tipo de sRNAs que poseen funciones similares, pero sin compartir homología, se conocen como homólogos funcionales.

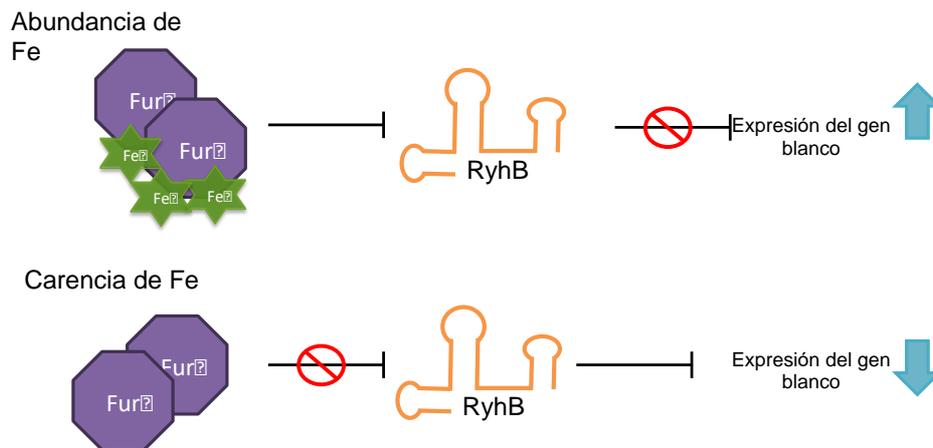


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de regulación de RyhB. A) Cuando existe abundancia de Fe en el medio, la expresión de RyhB es reprimida por la unión a la proteína reguladora Fur permitiendo que los genes blanco de RyhB se expresen. B) En ausencia del Fe, la unión a Fur es interrumpida permitiendo la unión de RyhB a sus mRNA blanco bloqueando su expresión. Imagen modificada (Oglesby-Sherrouse & Murphy, 2013).

Regulación del metabolismo del carbono

Los microorganismos se encuentran expuestos a fluctuaciones en los niveles de nutrientes, las cuales determinan cambios en la expresión de genes necesarios para metabolizarlos. En este sentido, se ha reportado que los sRNA participan en la respuesta a dichos cambios mediante la interacción con reguladores transcripcionales específicos (Michaux et al. 2014).

Aunque existen otros sRNAs involucrados en la regulación del metabolismo de los azúcares, uno de los sRNAs mejor caracterizados es *SgrS*, el cual lleva a cabo mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional. Los sistemas bacterianos de fosfoenolpiruvato carbohidrato fosfotransferasa (PTS por sus siglas en inglés) regulan la captación de azúcares y su fosforilación (Deutscher et al. 2006). En *E. coli*, el sistema PTS incluye al transportador PtsG, el cual genera glucosa

6-fosfato que al acumularse causa toxicidad en la célula, dando lugar al fenómeno conocido como "estrés por fosfoazúcar" (Morita et al. 2004). Esto conduce a la activación de *SgrR*, un activador transcripcional que coordina la respuesta al estrés de glucosa-fosfato y a la síntesis del sRNA *SgrS* (227 nucleótidos de longitud). *SgrS* regula post-transcripcionalmente a *ptsG* y a los genes *manXYZ*, los cuales codifican para las subunidades del sistema de transporte de azúcares PTS. *SgrS* se une a secuencias del mRNA de *ptsG* que bloquean parcialmente su sitio de unión a ribosoma (RBS) inhibiendo la traducción seguido de la degradación del mRNA (Vanderpool & Gottesman, 2004). La regulación del mRNA policistrónico *manXYZ* se lleva a cabo mediante la unión de *SgrS* a la región 5' del mRNA de *manX* y, en *manY* se une a la región río arriba de su RBS. La unión en cualquiera de los dos sitios es suficiente para la represión traduccional; sin

embargo, la degradación requiere de la unión a ambos sitios simultáneamente (Figura 6). Adicionalmente, *SgrS* codifica una proteína de 43 aminoácidos llamada *SgrT*, la cual actúa post-traduccionalmente inhibiendo la incorporación de azúcar a través de los transportadores de azúcar existentes, probablemente mediante la interacción directa con $EIICB^{Glc}$ (Wadler & Vanderpool, 2007).

Aplicaciones biotecnológicas

Debido a la importancia de los sRNA en los circuitos de regulación bacteriana, en

años recientes ha surgido el interés de diseñar y aplicar sRNA sintéticos para el control de la expresión genética. En este sentido, la biología sintética de RNA ha sido la responsable del desarrollo de nuevos reguladores de RNA que controlan la transcripción (Takahashi & Lucks, 2013), traducción (Mutalik et al. 2012), procesamiento y degradación de mRNA (Rodrigo et al. 2012), además del desarrollo de riboswitches que responden a una amplia gama de moléculas (Green et al. 2014).

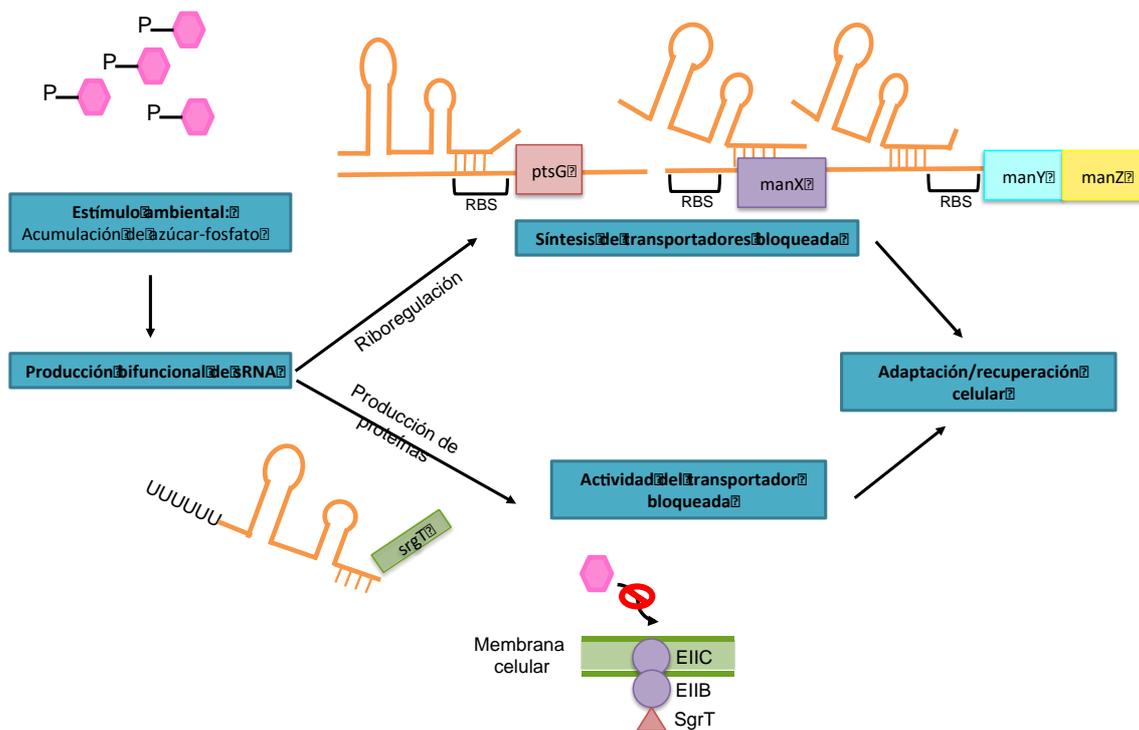


Figura 6. Regulación del transporte de azúcares en bacterias entéricas por el sRNA *SgrS*. *SgrS* actúa mediante dos mecanismos: la síntesis de un nuevo transportador de azúcares es detenida por medio de riboregulación y mediante la síntesis de la proteína *SgrT*, la cual inhibe la actividad de $EIICB^{Glc}$, que bloquea la captación y acumulación de los fosfo-azúcares. Imagen modificada (Wadler & Vanderpool, 2007).

Utilizando este mecanismo como modelo se desarrolló una molécula sintética llamada "ribocil" capaz de unirse a los riboswitches FMN reprimiendo la

expresión del gen *ribB*, ocasionando una inhibición del crecimiento celular bacteriano (Howe et al. 2015). Este descubrimiento ha generado gran interés para el desarrollo de

inhibidores del riboswitch FMN para el tratamiento de la tuberculosis, debido a que a diferencia de muchas bacterias, *M. tuberculosis* carece de transportadores de riboflavina, haciendo que su biosíntesis sea esencial en esta bacteria (Long et al. 2010).

RNAs sintéticos para la regulación de vías metabólicas

Dentro de las células el RNA lleva a cabo diferentes funciones a nivel regulador, enzimático y estructural. Es por ello que la biología sintética ha empezado a desarrollar tecnologías que utilizan el RNA como herramienta para la reprogramación celular.

Utilizando como modelo el bloqueo del RBS de un determinado mRNA por un sRNA para reprimir su expresión, Na y colaboradores (2013) diseñaron sRNAs sintéticos para obtener un aumento en la producción de compuestos de interés biotecnológico. Por una parte, diseñaron sRNA que tuvieran sitios de unión con genes involucrados en la biosíntesis de tirosina en *E. coli*, logrando aumentar significativamente su producción (2 g/L).

Así mismo, evaluaron el efecto de 139 sRNA sintéticos en la producción de cadaverina (un compuesto que se utiliza como intermediario en la producción de poliamidas, poliuretanos y nailon), encontrando que uno de estos sRNA reprimía la expresión del gen *murE*, lo cual daba como resultado un aumento del 55% en la producción de este compuesto.

Consideraciones finales

Desde la identificación del primer sRNA en *E. coli* a la fecha, ha habido un incremento exponencial en el interés por estudiar este tipo de reguladores, por lo que su búsqueda e identificación ha ido mas allá de los organismos modelo. Hoy en día se sabe que son un componente importante de los transcriptomas bacterianos. Aunque la identificación y caracterización de los sRNA va en aumento, es necesario ampliar su búsqueda en aquellos grupos bacterianos menos estudiados. Además, su participación en la regulación de un gran número de procesos los ha convertido en una herramienta con altísimo potencial para su empleo en el desarrollo de sistemas reguladores programables implicados en diversas aplicaciones biotecnológicas.

Referencias

- Altuvia, S. et al., 1997. A Small, StableRNA Induced by Oxidative Stress: Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator. *Cell*, 90(1), pp.43–53.
- Altuvia, S., 2007. Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. *Current Opinion in Microbiology*, 10(3), pp.257–261.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodríguez-Quñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3),

- pp.215–237.
- Barquist, L. & Vogel, J., 2015. Accelerating Discovery and Functional Analysis of Small RNAs with New Technologies. *Annual review of genetics*, 49(1), pp.367–94.
- Barrick, J.E. & Breaker, R.R., 2007. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome biology*, 8(11), p.R239.
- Bobrovskyy, M. & Vanderpool, C.K., 2013. Regulation of bacterial metabolism by small RNAs using diverse mechanisms. *Annual review of genetics*, 47, pp.209–32.
- Chappell, J. et al., 2015. A renaissance in RNA synthetic biology: New mechanisms, applications and tools for the future. *Current Opinion in Chemical Biology*, 28, pp.47–56.
- Colameco, S. & Elliot, M.A., 2016. Non-coding RNAs as Antibiotic Targets. *Biochemical Pharmacology*, 133, pp.29-42.
- Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P.W., 2006. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(4), pp.939–1031.
- Georg, J. & Hess, W.R., 2011. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(2), pp.286–300.
- Green, A.A. et al., 2014. Toehold switches: De-novo-designed regulators of gene expression. *Cell*, 159(4), pp.925–939.
- Howe, J.A. et al., 2015. Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. *Nature*, 526(7575), pp.672–677.
- Kushwaha, M. et al., 2016. Using RNA as Molecular Code for Programming Cellular Function. *ACS Synthetic Biology*, 5(8), pp.795–809.
- Lasa, I. et al., 2011. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science*, 108(50), pp. 20172-20177.
- Lee, E.R., Blount, K.F. & Breaker, R.R., 2009. Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. *RNA biology*, 6(2), pp.187–194.
- Liu, J.M. & Camilli, A., 2010. A broadening world of bacterial small RNAs. *Current opinion in microbiology*, 13(1), pp.18–23.
- Lloréns-Rico, V. et al., 2016. Bacterial antisense RNAs are mainly the product of transcriptional noise. *Science Advances*, 2(3), pp.1–10.

- Long, Q. et al., 2010. Riboflavin biosynthetic and regulatory factors as potential novel anti-infective drug targets: Perspective. *Chemical Biology and Drug Design*, 75(4), pp.339–347.
- Mandal, M. & Breaker, R.R., 2004. Gene regulation by riboswitches. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(6), pp.451–463.
- Massé, E. et al., 2007. Small RNAs controlling iron metabolism. *Current opinion in microbiology*, 10(2), pp.140–5.
- Massé, E. & Gottesman, S., 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), pp.4620–5.
- Massé, E., Vanderpool, C.K. & Gottesman, S., 2005. Effect of RyhB Small RNA on Global Iron Use in *Escherichia coli*. *Pharmacia*, 187(20), pp.6962–6971.
- Melamed, S. et al., 2016. Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. *Molecular Cell*, 63(5), pp.884–897.
- Mellin, J.R. & Cossart, P., 2015. Unexpected versatility in bacterial riboswitches. *Trends in Genetics*, 31(3), pp.150–156.
- Michaux, C. et al., 2014. Physiological roles of small RNA molecules. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 6), pp.1007–19.
- Mizuno, T., Chou, M.Y. & Inouye, M., 1984. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(7), pp.1966–70.
- Morita, T. et al., 2004. Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 54(4), pp.1063–1075.
- Mutalik, V.K. et al., 2012. Rationally designed families of orthogonal RNA regulators of translation. *Nature Chemical Biology*, 8(5), pp.447–454.
- Na, D. et al., 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nature biotechnology*, 31(2), pp.170–4.
- Oglesby-Sherrouse, A.G. & Murphy, E.R., 2013. Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. *Metallomics: integrated biometal science*, 5(4), pp.276–86.
- Raghavan, R., Sloan, D. & Ochman, H., 2012. Antisense transcription is

- pervasive but rarely conserved in enteric bacteria. *MBio*, 3(4), pp.1–7.
- Richter, A.S. & Backofen, R., 2012. General features of bacterial small RNA-mRNA interactions. *RNA Biology*, 9(7), pp.954–965.
- Rodrigo, G., Landrain, T.E. & Jaramillo, A., 2012. De novo automated design of small RNA circuits for engineering synthetic riboregulation in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(38), pp.15271–6.
- Sharma, C.M. et al., 2010. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 464(7286), pp.250–5.
- Sharma, C.M. & Vogel, J., 2014. Differential RNA-seq: the approach behind and the biological insight gained. *Current opinion in microbiology*, 19C, pp.97–105.
- Sorek, R. & Cossart, P., 2010. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nature reviews. Genetics*, 11(1), pp.9–16.
- Takahashi, M.K. & Lucks, J.B., 2013. A modular strategy for engineering orthogonal chimeric RNA transcription regulators. *Nucleic Acids Research*, 41(15), pp.7577–7588.
- Thomason, M.K. et al., 2014. Global transcriptional start site mapping using dRNA-seq reveals novel antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 197(1), pp.18–28.
- Thomason, M.K. & Storz, G., 2010. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annual review of genetics*, 44(August), pp.167–88.
- Vanderpool, C.K. & Gottesman, S., 2004. Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Molecular Microbiology*, 54(4), pp.1076–1089.
- Vanderpool, C.K. & Gottesman, S., 2007. The novel transcription factor SgrR coordinates the response to glucose-phosphate stress. *Journal of Bacteriology*, 189(6), pp.2238–2248.
- Vogel, J. & Luisi, B.F., 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), pp.578–89.
- Wadler, C.S. & Vanderpool, C.K., 2007. A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), pp.20454–20459.

- Wagner, E.G.H. & Romby, P., 2015. Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It. *Advances in Genetics*, 90, pp. 133-208
- Wassarman, K.M., Zhang, A. & Storz, G., 1999. Small RNAs in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 7(1), pp.37–45.
- Waters, L.S. & Storz, G., 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136(4), pp.615–28.
- Wilderman, P.J. et al., 2004. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), pp.9792–7.
- Zorgani, M.A., Quentin, R. & Lartigue, M.F., 2016. Regulatory RNAs in the Less Studied Streptococcal Species: From Nomenclature to Identification. *Frontiers in Microbiology*, 7(July).