



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Facultat de Ciències
Departament de Biologia

TESIS DOCTORAL

Modulación de la estructura del
lípidio A como estrategia de
virulencia en
Yersinia enterocolitica

Tesis doctoral presentada por
Maria del Mar Reinés Bennàssar para optar al título de
Doctora en Biología

Palma de Mallorca, 2012

El Dr. José Antonio Bengoechea Alonso, como director de la Tesis titulada “Modulación de la estructura del lípido A como estrategia de virulencia en *Yersinia enterocolitica*”, realizada en la Fundació d’Investigació Sanitària de les Illes Balears (FISIB) por Maria del Mar Reinés Bennàssar, autoriza la presentación de la mencionada Tesis Doctoral puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Palma de Mallorca, 2012

Dr. José Antonio Bengoechea Alonso

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca predoctoral JAE PreDOC (JAEPRe_07_00250) otorgada por el *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (2008/2011) y con la financiación del proyecto Intramural Program 2008201174 otorgado también por el *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*.

AGRAÏMENTS

Arribat aquest moment, em falten paraules i em sobren sentiments per expressar a tots els que d'una manera o altra heu contribuït a que ara mateix es puguin llegir aquestes línees...unes línees que signifiquen un canvi d'etapa i deixar enrere 4 anys i mig plens de moments bons com no tan bons, però que descriuen una experiència per a mi molt positiva, com a persona i com a científica.

Abans de començar a donar les gràcies, voldria fer una petita menció. Desgraciadament, la Ciència i tots els que hi formam part d'ella i l'alimentam dia a dia, no està passant un moment de plenitud. Les limitacions que sofrim fa que tot i la voluntat, la dedicació i la vocació que tenim els científics molts projectes innovadors i ambiciosos no es puguin duu a terme per les continues retallades que sofreix el nostre "gremi". Dedicar-hi hores i hores a la investigació, sense cap tipus d'horari i amb sous que m'estim més no descriure, es fa molt insostenible actualment, si no tenim el pilar de la vocació que aguanta tot tipus de vendaval. Ja sé que en aquests moments és molt fàcil parlar de "retallades" perquè per la crisi que vivim, es sofreix en molts d'àmbits. Però la Ciència a Espanya, mai ha contat amb el suport incondicional del Govern ni s'ha valorat com cal i ara la situació s'ha agreujat fins a límits que escarrufen. El Govern ha invertit amb jo amb una beca de 4 anys i mig de formació científica...i ara què? Desig des d'aquí que l'exili no sigui la única solució...

En primer lloc, voldria agrair al "Consejo Superior de Investigaciones Científicas" la concessió de la beca predoctoral JAE-predoc que ha fet possible la realització d'aquesta Tesi Doctoral. També agrair a tot el personal de la Fundació Caubet-Cimera per totes les facilitats que m'han donat, des de l'espai per escriure la Tesi fins a tot el material que he necessitat.

Un dels màxims responsables, sinó el principal, de que aquesta Tesis Doctoral s'hagi fet una realitat palpable, és el meu director de Tesi el Dr. José Antonio Bengochea. En primer lloc, gràcies per, sense adonar-te'n, despertar el meu interès per la Microbiologia durant el teu primer any de docència a la Universitat. Gràcies també per donar-me l'oportunitat de col·laborar com alumne i per després permetre'm aquests 4 anys de feina al teu grup d'investigació. Gràcies per estar disposat sempre a ajudar-me, per trobar solucions a tot, per ser pacient i contagiar-me la il·lusió per fer Ciència.

Un dels pilars més importants d'aquesta tesi, l'han format tota la gent del laboratori. Des del començament, m'han fet sentir molt a gust i han creat un context ideal de feina. En primer lloc, li vull agrair de manera molt especial a na Cati, per la

seva rebuda al grup "Yersi" per ensenyar-me tantes i tantes coses i per arribar a formar un gran equip juntes. Has estat sempre el meu exemple a seguir i no te pots imaginar les vegades que t'he trobat a faltar! Gràcies també pels nostres atacs de rialles interminables i converses, per el teu recolzament en tot moment i per cantar i ballar amb jo per dins el labo! Amb tu era tot molt fàcil i m'encantaria tornar a fer feina amb tu. A n'Antonio, per redescobrir-lo com a company i amic i ensenyar-me un altre cop que jutjar abans de conèixer de veres és de covards. T'anim molt durant aquesta darrera etapa de Doctorat en la que estàs immers...creu-me que la satisfacció quan acabes es immensa! Et desig el millor. Als Paus, per aportar dia a dia la bauxa al labo i per ser la parella ideal. Quan pens amb els moments divertits d'aquesta Tesi, sempre apareixeu! A n'en Pau Martí pels seus acudits a partir de les 18:00h (si no hi havia es jefe ja començava a primera hora del matí) i per ser es Crack i jo sa Cata-Crack i a n'en Pau Morell per utilitzar les seves habilitats de pintor i dibuixar-me cada dia un somriure a la cara. A na Junkal per transmetre'm el seu rigor científic i per ajudar-me sempre que li vaig demanar. A na Paloma per ser sempre el meu "àngel de la guarda" i ajudar-me sempre quan ficava la pota. Gràcies per aquell diumenge a Galicia amb la teva família, sou encantadors. A na Silvia, per com diu la capsa de tubs Corning que me vares regalar, ser "la mejor vecina de enfrente", per les confidències durant els cafès i per apostar que Madrid era una bona opció "Lo peligroso es no arriesgarse" deia es sobre de Nescafe... A na Maria Villalonga per la feina realitzada en aquesta tesi. A tota la gent del labo de dalt, per anar creixent com a grup, per interessar-vos per la meva feina i per sempre tenir ganes de festa. A na Magdalena i a na Montse per estar sempre dispostes a ajudar-me de manera immediata i per fer-me companyia aquests darrers mesos. A n'en Christian per tenir aquest carisma especial que el caracteritza, per estar sempre dispost a escoltar-te i a ajudar-te amb tot. Gràcies per ser tan atent, interessar-te sempre per tot el que m'envoltava i per dur a terme "sa performanse". Tu com jo, estàs en un canvi d'etapa, et desig el millor. A n'en David, per convertir-te amb un dels punts de recolzament més importants (tot i que m'eliminassis del Face), per les converses, per les xapates amb formatge que varen arribar a ser imprescindibles i pel concert d'Amaral...A n'en Quique, per ser s'espina que encén es laboratori (mai millor dit), per ser una ajuda continua i incondicional cada uns dels dies d'aquesta Tesi, per la teva interminable paciència i per ensenyar-me tant. Gràcies també per convertir-ho tot en fàcil i per batiar-me com a Murci. Repetiria mil vegades el que et vaig dir dins el torrent. A na Cata per ser la meva companya i amiga durant aquests quatre anys, anar de la mà fins al final i acabar aquesta etapa juntes. Pels capvespres de compres, per Sevilla i per les notes damunt la taula. Ànims a tu també que no queda res! A na Camino, infinites gràcies per haver tornat! He après de

tu moltíssim! Gràcies per mimar-me cada dia, per recolzar-me i per transmetre'm aquesta rialla contagiosa. A n'Anna per sempre preocupar-se per jo, per aconsellar-me i animar-me. A na Vicky per asseure's devora jo a regulació del metabolisme, per ser tan divertida i per sempre tenir curiositat per la meva feina. A na Núria li voldria agrair tota la feina realitzada en aquesta tesi i animar-la en aquest camí del Doctorat dins el grup "Yersi". I, finalment, a na Vero... tenc tantes coses que agrair-li que costar saber per on començar... gràcies per estar al meu costat sempre i d'una manera incondicional. Per les teves abraçades, per la teva paciència, per sa la meva "mamita chula" del labo i per mimar-me i cuidar-me tant. Tens un bon tros del meu coret guanyat!

A les meves amigues, na Llobina, na Bel, na Joana Aina, na Joana Maria, na Rosa, n'Esperança, n'Antònia, na Nena, na Maria i na Xisca per preocupar-vos sempre per la meva feina tot i que no acabéssiu d'entendre perquè havia d'anar al labo un Diumenge vespre... gràcies per acompanyar-me durant aquests quatre anys! Gràcies pels ànims aquests darrers mesos, sense vosaltres i la desconexió hagués estat una autèntica bogeria. Gràcies especialment a na Maria per fer aquest disseny de la portada tan genial i per estar sempre disposta a tot. Gràcies també a n'Andreu, en Colau, en Biel, en Pere i en Guillem. Gràcies especialment a n'en Tià i na Llobina, per visitar-me dia 22 de Març devers les 18:00 en un moment de caos total i transmetre'm una dosi infinita d'ànims a part de la benzina necessària per acabar. Això no s'oblida! Saps que sempre seràs el meu far...

A n'Ubaldo per tot. Per recolzar-me dia a dia durant aquest camí, per la teva paciència en moments de nervis, per aparèixer en el moment i lloc adequats i donar-me ales per aconseguir tot el que em proposi. Gràcies per demostrar-me que puc contar amb tu per qualsevol cosa, per fer les distàncies tan curtes i fer que et sentís ben a prop en tot moment, per estimar-me tant i fer-me feliç.

I finalment gràcies a la meva família. A la meva mare per ser una dona exemplar, per cuidar-me tant i posar tant d'interès amb tot el que faig. Per preocupar-se, per cuidar-me i facilitar-me tant les coses. Gràcies per patir en silenci i per aguantar molts dels meus atacs de nervis. Al meu pare, perquè sé que, sigui on sigui, estarà molt orgullós de mi. A la meva germana per ser-hi sempre, per donar-m'ho tot sense fer falta demanar-ho. Al meu germà, per animar-me a fer el Doctorat, per sempre guiar-me pel bon camí i per ensenyar-me tantes coses (som com dues gotes d'aigua). Als meus cunyats, per formar part de la meva vida i preocupar-vos sempre per la germana petita. Als meus nebots i fiol per fer-me sentir tan orgullosa de

vosaltres, especialment gràcies a na Francesca per haver dibuixat tan bé els bacteris de la portada.

Gràcies a tots per estar al meu costat.

A la meva família, especialment a tu
A n'Ubaldo

ÍNDICE



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
1. La membrana externa y el lipopolisacárido de las bacterias	
Gram negativas	3
1.1. Estructura molecular del lipopolisacárido.....	3
1.2. Síntesis de la cadena O.....	7
1.3 Síntesis del núcleo.....	9
1.4. Síntesis lípido A	12
1.4.1. Modificaciones del lípido A	13
1.4.2. Regulación de las modificaciones del lípido A.....	16
2. El sistema inmune innato y el lipopolisacárido.....	17
2.1 LPS e inflamación.....	18
2.2. LPS y péptidos antimicrobianos.....	22
3. El género <i>Yersinia</i>.....	24
3.1. Características generales	24
3.2. Patogenicidad	25
3.3. Factores de virulencia.....	29
4. Factores de virulencia de <i>Yersinia enterocolítica</i>	29
4.1. Factores de virulencia codificados en el plásmido de virulencia pYV.....	29
4.1.1. El sistema de secreción tipo III Ysc	30

4.1.2. YadA.....	37
4.2. Factores de virulencia codificados en el cromosoma.....	40
4.2.1. El sistema de secreción tipo III del flagelo.....	40
4.2.2. Fosfolipasa A.....	44
4.2.3. El sistema de secreción tipo III Ysa.....	45
4.2.4. El sistema de secreción tipo II.....	46
4.2.5. Ail.....	46
4.2.6. Invasin.....	47
4.2.7. Ureasa.....	51
4.2.8. La isla de patogenicidad.....	52
4.2.9. El sistema Psp.....	53
4.2.10. La enterotoxina Y-Sta.....	54
4.3. LPS: cadena O y lípido A como factores de virulencia.....	56
4.3.1. Cadena O.....	56
4.3.2. Lípido A.....	58
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	63
MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	69
1.1. Medios y condiciones de cultivo.....	69
2. Técnicas de Biología Molecular.....	70
2.1. Caracterización rápida del ADN plasmídico a partir de colonia.....	71
2.2. Métodos de transferencia genética.....	72
2.2.1. Transformación química con cloruro cálcico.....	72
2.2.2. Transformación por electroporación.....	73
2.2.3. Conjugación en medio sólido.....	74

3. Construcción de plásmidos y cepas	75
3.1. Construcción de cepas mutantes de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 8081 $\Delta manCKm$, $\Delta pmrAB$, $\Delta phoPQ$, $\Delta lpxR Km$, $\Delta yopPKm$, $\Delta pmrC$, $\Delta rcsD$, $\Delta hfqKm$, $\Delta pagPGB$, $\Delta pmrF$ por mutagénesis dirigida mediante doble recombinación.....	75
3.1.1. Construcción de los vectores suicida $pKNG101\Delta manCKm$, $pKNG101\Delta pmrAB$, $pKNG101\Delta phoPQ$, $pKNG101\Delta lpxR Km$ y $pKNG101\Delta yopPKm$	75
3.1.2. Construcción de los vectores suicida $pKNG101\Delta pmrC$, $pKNG101\Delta rcsD$ y $pKNG101\Delta hfqKm$	77
3.1.3. Construcción de los vectores suicidas $pKNG\Delta$ $pagPGB$, $pKNG\Delta pmrF$	79
3.1.4 Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga.....	79
3.1.5 Eliminación del cassette de Km	80
3.2. Construcción de plásmidos para complementar las mutaciones en los genes $pagP$, $rovA$, $lpxR$ y $pmrC$	81
3.3. Construcción de $pTM/lpxRFLAG$	83
4. Construcción de las fusiones transcripcionales <i>lucFF</i> y <i>gfp</i>.....	84
5. Mutagénesis dirigida	85
6. Obtención y análisis del lípido A por MALDI-TOFF	85
6.1. Crecimiento y preparación de las bacterias	85
6.2. Extracción del lípido A	86
6.3. Análisis.....	86
7. Ensayos de resistencia frente a péptidos antimicrobianos	87
7.1. Ensayos de supervivencia	87
7.2. Ensayos por difusión radial.....	87
8. Activación celular: secreción de TNF-α	88

9. Ensayo de invasión e adhesión en células epiteliales HeLa.....	89
9.1. Adhesión.....	89
9.2. Invasión	89
10. Medida de la actividad fosfatasa alcalina	10
11. Medida de la actividad β-galactosidasa	91
12. Medida de la actividad luciferasa	92
13. Medida de la fluorescencia.....	92
14. Extracción de proteínas de membrana	93
15. Secreción de Yops	93
16. Análisis de la secreción de Yops mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y tinción con Azul de Coomassie	94
17. Western Blot	95
18. Translocación de la proteína YopE en células A549.....	96
19. Adhesión a colágeno a 37°C	97
20. Expresión de YadA	98
21. Ensayo de motilidad	98
22. Virulencia en el modelo murino	99
23. Estadística	99
RESULTADOS.....	101
1. Estudio de las bases moleculares que determinan la resistencia de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 frente a los péptidos antimicrobianos	103
1.1. Efecto de la temperatura en la resistencia de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 frente a los péptidos antimicrobianos.....	103
1.2. Estructura del lípido A de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:8 crecida a 21°C y a 37°C e identificación de los <i>loci</i> responsables de las modificaciones del lípido A.....	105

1.3. Las variaciones de la estructura del LPS de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 según la temperatura explican la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos.....	109
1.4. La adición de aminoarabinosa y palmitato al lípido A tienen un papel en la virulencia de <i>Y. enterocolitica</i> O:8	112
1.5. Efecto de la temperatura sobre los sistemas <i>phoPQ</i> , <i>pmrAB</i> los cuales regulan las modificaciones del lípido A	113
1.6. RovA y H-NS regulan los <i>loci</i> necesarios para las modificaciones del lípido A	116
2. Identificación del gen <i>pmrC</i> responsable de la adición de fosfoetanolamina al lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8.....	127
2.1. Implicación de la adición de fosfoetanolamina al lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 en a la resistencia frente a los PAs.....	129
2.2. Regulación de la expresión de <i>pmrC</i>	130
3. Análisis del patrón de acilación del lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 a 37°C	139
3.1. Identificación de la 3'-O-deacilasa del lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8.....	139
3.2. La expresión de <i>lpxR</i> está regulada por la temperatura	141
3.3. La presencia de aminoarabinosa en el lípido A impide la deacilación del lípido A dependiente de LpxR	144
3.4. Modelaje la proteína LpxR	146
3.5. Regulación de la expresión de <i>lpxR</i>	149
3.6. Relación entre la acilación del lípido A y la expresión de factores de virulencia de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:8	152
3.6.1. Movilidad y análisis del regulón flagelar	152
3.6.2. Invasin y la acilación del lípido A	154
3.6.3. Factores de virulencia codificados en el plásmido pYV y la acilación del lípido A	156

3.7. Acilación del lípido A y el sistema inmune innato.....	158
4. Papel de Hfq en la regulación de las modificaciones del lípido A de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:8.....	161
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES	187
REFERENCIAS.....	193
ANEXO I.....	229
ANEXO II	233
ANEXO III	259

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del lipopolisacárido	3
Figura 2. Estructura del lípido A de <i>E. coli</i>	5
Figura 3. Translocación de la cadena O y la molécula lípido A-núcleo y ensamblaje del LPS de <i>E.coli</i>	7
Figura 4. Esquema de la polimerización de la cadena O homopolimérica y heteropolimérica.	8
Figura 5. Biosíntesis e incorporación del Kdo en el núcleo interno del LPS de <i>E. coli</i>	10
Figura 6. Biosíntesis e incorporación de las heptosas en el núcleo interno del LPS de <i>E. coli</i>	11
Figura 7. Biosíntesis del lípido A.	12
Figura 8. Biosíntesis del undecaprenil fosfato-L-Ara4N y transferencia del residuo de L-Ara4N al lípido A.	14
Figura 9. Esquema de la regulación por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB en <i>Salmonella</i> y <i>E.coli</i>	16
Figura 10. Cascadas de señalización MyD88-dependientes y MyD88-independiente activadas tras el reconocimiento del LPS por el complejo receptor TLR4-MD2.....	19
Figura 11. Conformaciones adoptadas por distintos tipos de lípidos A ...	20
Figura 12. Representación esquemática de las rutas de entrada y localización final de <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> y <i>Y. pestis</i> en las infecciones humanas.	28
Figura 13. Secreción de Yops por el inyectiosoma Ysc y translocación a través de la membrana de la célula eucariota.	30
Figura 14. Representación esquemática del sistema de secreción tipo III Ysc de <i>Yersinia</i>	33

Figura 15. Acción antifagocítica de las Yops.....	35
Figura 16. Inhibición de la respuesta inflamatoria.	36
Figura 17. Elementos estructurales del sistema de secreción tipo III del flagelo.	41
Figura 18. Modelo de regulación global en <i>Y.enterocolitica</i> incluyendo los reguladores FlhD/FlhC, FliA y YmoA.....	43
Figura 19. Modelo de la regulación por la temperatura de <i>inv</i> y <i>rovA</i>	50
Figura 20. Estructura química de los lípidos A de <i>Y. enterocolitica</i> obtenidos por Rebeil y colaboradores.....	59
Figura 21.. Estructura del lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 crecida a 21°C y crecida a 37°C analizada por MALDI-TOFF.....	60
Figura 22. Esquema de la construcción de los vectores suicidas para la obtención de mutantes por doble recombinación.....	78
Figura 23. Sensibilidad de <i>Y.enterocolitica</i> O:8 dependiente de la temperatura frente a diferentes péptidos antimicrobianos.	104
Figura 24. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 crecida a 21°C y a 37°C.....	106
Figura 25. Estructura del lípido A de <i>YeO8ΔpmrF</i> , <i>YeO8ΔpagP</i> y <i>YeO8ΔpmrF-ΔpagP</i>	107
Figura 26. La expresión del operón <i>pmrH</i> y los genes <i>ugd</i> y <i>pagP</i> está regulada por la temperatura.	108
Figura 27. Papel de la cadena O y la adición de aminoarabinosa al lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 en la resistencia frente a la PxB.	110
Figura 28. Papel de la cadena O y la adición de palmitato al lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 en la resistencia frente a magainina II.	111
Figura 29: Virulencia de los mutantes de lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8.	112
Figura 30. Regulación la expresión de <i>pmrF</i> , <i>ugd</i> y <i>pagP</i> por parte de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB	114

Figura 31. La expresión de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB está regulada por la temperatura.	116
Figura 32. RovA regula los genes necesarios para las modificaciones del lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8.....	117
Figura 33. RovA regula la expresión de los sistemas de regulación PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB.	118
Figura 34. Complementación del mutante <i>rovA</i> con el plásmido pBADYeO8RovA.....	118
Figura 35. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído del mutante <i>rovA</i> crecido a 21°C y a 37°C	120
Figura 36. Los sistemas de regulación PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB regulan la expresión de <i>rovA</i> en <i>Y. enterocolitica</i> .O:8	122
Figura 37. Los niveles altos de <i>rovA</i> en el mutante doble <i>YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB</i> explican la elevada expresión del operón <i>pmrH</i> y los genes <i>ugd</i> y <i>pagP</i> en este mutante.	123
Figura 38. H-NS regula negativamente la expresión de los genes necesarios para las modificaciones del lípido A en <i>Y. enterocolitica</i> O:8.	124
Figura 39. RovA alivia la represión de H-NS a 21°C.	125
Figura 40. Estructura del lípido A de los mutantes <i>YeO8ΔpmrF</i> , <i>YeO8ΔpmrC</i> y <i>YeO8ΔpmrF-ΔpmrC</i>	128
Figura 41. Expresión de <i>pmrC</i> en el mutante <i>YeO8ΔpmrF</i>	129
Figura 42. Papel de la adición de fosfoetanolamina al lípido A de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 en la resistencia frente a la PxB.	130
Figura 43. La expresión del gen <i>pmrC</i> está regulada por la temperatura.	130
Figura 44. Regulación de la expresión de <i>pmrC</i>	132
Figura 45. Expresión de <i>pmrF</i> , <i>ugd</i> y <i>pagP</i> en mutante <i>YeO8ΔrcsD</i> . ..	132

Figura 46. La expresión del sistema RcsCDB está regulada por la temperatura.....	133
Figura 47. Análisis de la expresión de los reguladores en un mutante que no tiene aminoarabinosa en el lípido A.	134
Figura 48. Análisis de la expresión de <i>pmrC</i> en la cepa silvestre y en los mutantes <i>YeO8ΔpmrF</i> , <i>YeO8ΔrcsD</i> , <i>YeO8ΔpmrF-ΔphoPQ</i> , <i>YeO8ΔpmrF-ΔrcsD</i> y <i>YeO8ΔpmrF-ΔrovA</i> crecidos a 21°C.	135
Figura 49. Análisis de la expresión de los reguladores en un mutante <i>YeO8ΔrcsD</i>	136
Figura 50. Análisis de la expresión de <i>rovA</i> en la cepa silvestre y en los mutantes <i>YeO8ΔrcsD</i> <i>YeO8ΔpmrF</i> y <i>YeO8ΔpmrF-ΔrcsD</i> crecidos a 21°C.....	137
Figura 51. Los niveles altos de <i>rovA</i> en el mutante <i>YeO8ΔrcsD</i> explican la elevada expresión del gen <i>pmrC</i> en este mutante.....	138
Figura 52. Esquema de la actividad de la enzima LpxR.....	139
Figura 53. Estructura del lípido A del mutante <i>YeO8ΔlpxR</i> crecido a 21°C y a 37°C.	140
Figura 54. La expresión de <i>lpxR</i> está regulada por la temperatura.....	142
Figura 55. Estructura del lípido A de <i>E. coli</i> MG1655 expresando LpxR.	143
Figura 56. Estructura del lípido A del mutante <i>YeO8ΔpagP</i> del mutante <i>YeO8ΔpmrF</i> y del mutante doble <i>YeO8ΔpmrF-ΔlpxR</i>	145
Figura 57. La expresión de <i>lpxR</i> no está alterada en el mutante <i>YeO8ΔpmrF</i>	146
Figura 58. El mutante <i>YeO8ΔlpxR</i> en el residuo LpxR (D53G) presenta especies deaciladas de lípido A a 21°C.....	149
Figura 59. Regulación de la expresión de <i>lpxR</i>	151
Figura 60. Movilidad de las cepas <i>YeO8</i> y <i>YeO8ΔlpxR</i> crecidas a 21°C.....	152

Figura 61. La expresión de <i>flhDC</i> , el principal complejo de regulación del flagelo, está disminuida en el mutante <i>YeO8ΔlpxR</i>	153
Figura 62. La expresión de <i>ypIA</i> está disminuida en el mutante <i>YeO8ΔlpxR</i>	154
Figura 63. Análisis de la expresión de <i>inv</i> y <i>rovA</i> en el mutante <i>YeO8ΔlpxR</i> y análisis de la invasión en células eucariotas del mutante <i>YeO8ΔlpxR</i>	155
Figura 64. Análisis de la expresión de Yops, la translocación de YopE y el efecto citotóxico del mutante <i>YeO8ΔlpxR</i>	157
Figura 65. Análisis de la expresión de YadA en <i>YeO8</i> y <i>YeO8ΔlpxR</i>	158
Figura 66. Sensibilidad del mutante <i>YeO8ΔlpxR</i> en la resistencia frente a la PxB.	159
Figura 67. Efecto de la acilación del lípido A de <i>YeO8</i> sobre la secreción de citoquinas por parte de macrófagos de ratón RAW 264.7	160
Figura 68. Estructura del lípido A del mutante <i>YeO8Δhfq</i> crecido a 21°C y a 37°C.	162
Figura 69. Estructura del lípido A del mutante <i>YeO8Δhfq-ΔlpxP</i> crecido a 21°C y a 37°C.	163
Figura 70. Análisis de la expresión de <i>pagP</i> y <i>lpxP</i> en el mutante <i>YeO8Δhfq</i>	163
Figura 71. El sistema PhoP/PhoQ y RovA regulan la expresión de <i>lpxP</i>	164
Figura 72. Hfq regula la expresión de <i>phoPQ</i> y <i>rovA</i>	165
Figura 73. Análisis de la expresión de <i>pagP</i> en los mutantes <i>YeO8Δhfq</i> , <i>YeO8ΔphoPQ</i> , <i>YeO8ΔrovA</i> , <i>YeO8ΔphoPQ-Δhfq</i> y <i>YeO8ΔrovA-Δhfq</i> crecidos a 21°C y a 37°C.....	166
Figura 74. Análisis de la expresión de <i>lpxP</i> en los mutantes <i>YeO8Δhfq</i> , <i>YeO8ΔphoPQ</i> , <i>YeO8ΔrovA</i> , <i>YeO8ΔphoPQ-Δhfq</i> y <i>YeO8ΔrovA-Δhfq</i> crecidos a 21°C y a 37°C.....	167

Figura 75. Estructura del lípido A extraído de los mutantes <i>YeO8ΔphoPQ-Δhfq</i> y <i>YeO8ΔrovA-Δhfq</i> .	168
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo y composición	69
Tabla 2. Modificaciones del lípido A en diferentes bacterias	231
Tabla 3. Cepas de <i>Y. enterocolitica</i> y <i>E. coli</i> utilizadas en este estudio	235
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio	241
Tabla 5. Cebadores utilizados en este estudio	250
Tabla 6. Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida de <i>lpxR</i>	256
Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de diferentes péptidos antimicrobianos para <i>Y. enterocolitica</i> O:8	104
Tabla 8. Análisis <i>in silico</i> de la presencia de los genes implicados en modificaciones de lípido A en los genomas de <i>Y. enterocolitica</i> (O:8, O:3, O:9), <i>Y. pseudotuberculosis</i> y <i>Y. pestis</i>	259
Tabla 9. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de PxB	121
Tabla 10. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) magainina II	121
Tabla 11. Efecto de las mutaciones en <i>lpxR</i> sobre la deacilación del lípido A	147

ABREVIATURAS

ABC	del inglés "ATP binding cassette"
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
Agua d.o.i.	Agua desionizada y purificada por ósmosis inversa
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
C ₁₄	Ácido mirístico o miristato
C ₁₂	Ácido laúrico o laureato
C ₁₆	Ácido palmítico o palmitato
C _{16:1}	Ácido palmitoleico
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CCCP	Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona
Células A549	Células epiteliales alveolares humanas de un adenocarcinoma
Cm	Cloranfenicol
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cn	Carbenicilina
CTAB	Hexadecil trimetil bromuro de amonio
°C	Grado Celsius
DL ₅₀	Dosis letal 50
DNTB	Ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzoico
DO	Densidad óptica (nm)
DOC	Deoxicolato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético

ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
Fops	del inglés “flagelar outer proteins”
FRT	del inglés “FLP recognition target”
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
GlcN2N	Glucosamina
GlcN3N	2,3-dideoxi-2,3-diamino-D-glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
Gm	Gentamicina
GFP	Del inglés “green fluorescent protein”
HeLa	Célula epitelial de carcinoma cervical humano “Henrietta Lacks”
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanolsulfónico
Hep	Heptosa
IL	Interleuquina
IRAK-1	“IL-1 receptor associated kinases”
IFN-3	“Interferon regulatory factor 3”
IP-Ysa	Isla de patogenicidad Ysa
kb	Kilobase
Kdo	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico
Km	Kanamicina
L-Ara4N	4-amino-deoxy-L-arabinosa
LB	Medio Luria Bertani
LBP	“Lipopolysaccharide binding protein”
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	“Matrix-assisted laser desorption/ionización time-of-flight mass espectroscopy”

MAPK	“Mitogen-activated protein kinasa”
MASP	“MBP- associated serine protease”
MBP	“Mannose binding protein”
min	minutos
MyD88	“Myeloid differentiation protein”
OH-C14	Hidroximiristato
ONPG	O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
PAs	Péptidos antimicrobianos
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
pb	Par de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase Chain Reaction”)
pEtN	Fosfoetanolamina
Pi	Fosfato
PRR	del inglés “pattern recognition receptors”
Psp	del inglés “phage shock protein”
pYV	Plásmido de virulencia de <i>Yersinia spp.</i>
Rcs	del inglés “ <u>R</u> egulator of <u>c</u> apsule <u>s</u> ynthesis”
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacríamida con SDS
seg	segundos
Str	Estreptomicina
Spc	Espectinomicina
STF	Suero de ternera fetal
STM	del inglés “signature-tagged transposon mutagenesis”

SSTT	Sistema de secreción tipo III
TAE	Tampón Tris Acetato EDTA
TBE	Tampón Tris Borato EDTA
TBS	del inglés “ Tris-buffered saline ”
TCA	Ácido tricloroacético
Tet	Tetraciclina
Tir	“Toll-interleukin 1-receptor”
TLR	Receptores “Toll-like”
TNF α	“Tumor necrosis factor α ”
TRAF6	“TNF-receptor associated factor 6”
TSB	Caldo de triptona y soja
Tp	Trimetropina
TSB	Caldo de triptona y soja
TSBox	Caldo de triptona y soja con el calcio quelado
UDP	Uridina 5'- difosfato
ufc	Unidades formadoras de colonias
UMP	Uridina 5'- monofosfato
und-P	Undecaprenilfosfato
URF	Unidades relativas de fluorescencia
URL	Unidades relativas de luz
YadA	“ <i>Yersinia</i> adhesin A”
Yop	“ <i>Yersinia</i> outer protein”
YpIA	“ <i>Yersinia</i> phospholipase A”
Ysa	“ <i>Yersinia</i> secretion apparatus”
Y-ST	“ <i>Yersinia</i> stable toxin”

INTRODUCCIÓN



1. LA MEMBRANA EXTERNA Y EL LIPOPOLISACÁRIDO DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Las bacterias Gram negativas poseen una envoltura celular compuesta por la membrana plasmática, un espacio periplasmático y la membrana externa. Esta última es la parte que se encuentra en contacto con el medio exterior, por lo que sus características son cruciales para la supervivencia de la bacteria en diferentes ambientes.

La membrana externa está formada por una bicapa lipídica asimétrica en la cual la cara interna está compuesta por fosfolípidos mientras que la cara externa está compuesta por moléculas de lipopolisacárido (LPS)^{189,294}. En la membrana externa también existen proteínas entre las que destacan la lipoproteína de Braun y las porinas. Estas últimas forman canales o poros para el paso de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular.

1.1 Estructura molecular del lipopolisacárido

La molécula de LPS consta de tres partes: el lípido A, el núcleo y la cadena O⁴⁴⁸. (Figura 1)

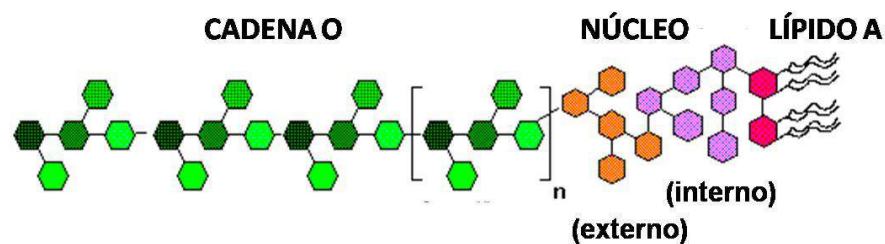


Figura 1. Estructura del lipopolisacárido.

La **cadena O** es la región del LPS más expuesta al medio externo. Es un polisacárido de gran variabilidad en cuanto a la longitud y tipos de azúcar presentes, y contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica del microorganismo. Las cadenas O pueden ser heteropoliméricas u homopoliméricas. Las primeras están formadas por repeticiones, entre 10 y 30, de un oligosacárido que contiene entre 2 y 8 azúcares. Dentro de una misma cepa bacteriana existen moléculas de LPS que

difieren en el número de repeticiones de esa unidad básica, lo cual produce un patrón de migración característico, en “escalera”, al separar las moléculas de LPS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las cadenas homopoliméricas están formadas por repeticiones de un mismo azúcar dando lugar a un patrón de migración característico en forma de mancha.

Unido a la cadena O se encuentra el **núcleo**. Éste es un oligosacárido que típicamente contiene de 8 a 15 azúcares que son hexosas, heptosas [L-glicero-D-mano-heptopiranososa (L,D-Hep) ó D-glicero-D-mano-heptopiranososa (D,D-Hep)] y ácidos octulosónicos que pueden ser ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulopiranosónico (Kdo) o ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulopiranosónico (Ko). El núcleo a su vez, se divide en núcleo interno (anclado al lípido A) y núcleo externo. En la mayoría de los LPSs, el núcleo es una región que presenta numerosas cargas negativas, principalmente debido a la presencia de grupos fosfato que sustituyen a las heptosas. Esta área de cargas negativas constituye un lugar de unión de cationes divalentes y también de poliaminas, como la putrescina, la cadaverina, la espermina y la espermidina³²¹. La unión intermolecular de estos cationes contribuye a la estabilidad de la membrana externa¹⁸⁸.

El núcleo externo, que se sitúa entre el núcleo interno y la cadena O, está formado por hexosas como glucosa (Glc), galactosa (Gal) y N-acetilglucosamina (GlcNAc). La estructura del núcleo está bastante conservada, especialmente dentro de la misma familia de bacterias. A pesar de ello, la adición no estequiométrica de otros azúcares, grupos fosfato y otros componentes como etanolamina, residuos acetil o aminoácidos contribuyen a crear cierta heterogeneidad entre las moléculas de LPS presentes, incluso dentro de un mismo cultivo bacteriano³⁰⁷.

El **lípido A** es la fracción hidrofóbica del LPS anclado en la monocapa externa de la membrana externa. Aunque existen algunas excepciones, el lípido A, junto con el Kdo, es necesario para la viabilidad de las bacterias Gram negativas^{190,41}.

La estructura química del lípido A de *Escherichia coli* (**Figura 2**) consta de un disacárido de glucosamina (GLcN2N) con enlace β (1-6), acilado con

residuos 3-hidroximiristato (3-OH-C14) en las posiciones 2, 3, 2', 3' y fosforilado en 1 y 4'. Además, los ácidos grasos de las posiciones 2' y 3' se encuentran esterificados con otros ácidos grasos, normalmente laureato (C12) y miristato (C14). En la **Figura 2** se muestra el característico espectro de masas del lípido A de *E. coli*. Este espectro presenta una especie mayoritaria de masa/carga [m/z] 1797, correspondiente al lípido A hexaacilado descrito anteriormente.

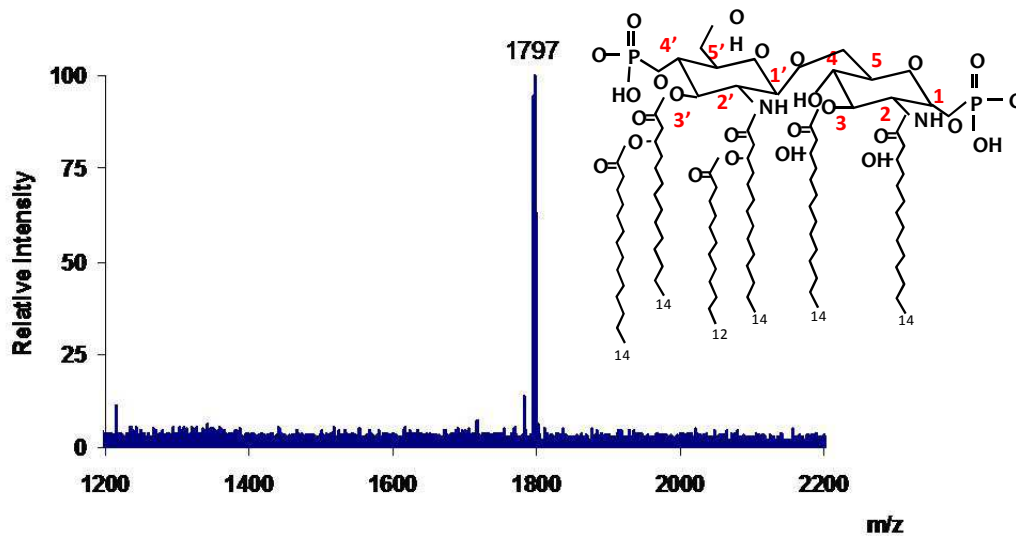


Figura 2. Estructura del lípido A de *E. coli*. A la derecha se muestra la estructura hexaacilada del lípido A de *E.coli* correspondiente al pico mayoritario del espectro (MALDI-TOF).

Algunas bacterias Gram negativas expresan variaciones de la estructura anterior. Estas variaciones se refieren tanto a la longitud, número y posición de los ácidos grasos como a la presencia de fosfatos o grupos polares y la composición del disacárido. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* el disacárido de glucosamina está acilado con ácidos grasos 3-OH-C10 en las posiciones 2 y 2' y con ácidos grasos 3-OH-C12 en las posiciones 3 y 3'¹⁷⁵. *Acinetobacter baumannii* tiene el disacárido acilado con 3-OH-C12 en las posiciones 2', 3' y 2 y un 3-OH-C14 en la posición 3'³³⁸. El lípido A de *Helicobacter pylori* contiene ácidos grasos más largos, 3-OH-C16 y 3-OH-C18, que los que contienen los lípidos A de *E. coli* y *Salmonella*³⁸⁰. Otras bacterias, como *Brucella* y *Bartonella*, poseen un ácido graso inusual: 27-OH-C18⁴⁵¹ mientras que *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli* poseen 27-OH-28:0⁵⁷. En cuanto a la composición del disacárido, algunas bacterias como

Nitrobacter, *Brucella*, *Legionella* y *Campylobacter jejuni* poseen 2,3-dideoxi-2,3-diamino-D-glucosa (GlcN3N) en lugar de GlcN2N⁵⁹⁸, ⁵⁷¹. También existen variaciones en cuanto al grado de fosforilación. Así, *R. etli*, *Francisella* y *H. pylori* expresan un lípido A monofosforilado debido a la acción de fosfatasas²⁸⁴, ⁵⁵⁶, ⁵⁸⁵.

Se ha descrito que algunas bacterias Gram negativas, entre las que se encuentran *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, modifican el lípido A en respuesta a las variaciones del medio de cultivo, como por ejemplo la presencia de péptidos antimicrobianos. Algunas de estas modificaciones consisten en la hidroxilación del miristato, deacilaciones, la adición de fosfoetanolamina (pEtN), aminoarabinosa (LAra-4N) y palmitato (C16) al lípido A^{447,448}. La evidencia disponible indica que todas estas modificaciones modulan la interacción de la bacteria con distintos elementos del sistema inmune innato^{145,364}.

En la **Figura 3** se muestra el ensamblaje de las distintas secciones del LPS. Las moléculas de lípido A-núcleo se translocan a la membrana externa mediante el transportador MsbA perteneciente a la familia de transportadores tipo ABC (del inglés “*ATP binding cassette*”)¹⁹⁸. La cadena O sintetizada sobre el transportador lipídico undecaprenilfosfato, es transportada al espacio periplasmático mediante el transportador Wzx y transferida por la ligasa WaaL a la molécula de lípido A-núcleo. La proteína periplasmática LptA, junto con LptB y YrbK transportan el LPS de la superficie externa de la membrana interna a la superficie interna de la membrana externa. Allí el complejo proteico Imp/RlpB transloca el LPS a la cara externa de la membrana externa^{447,606}.

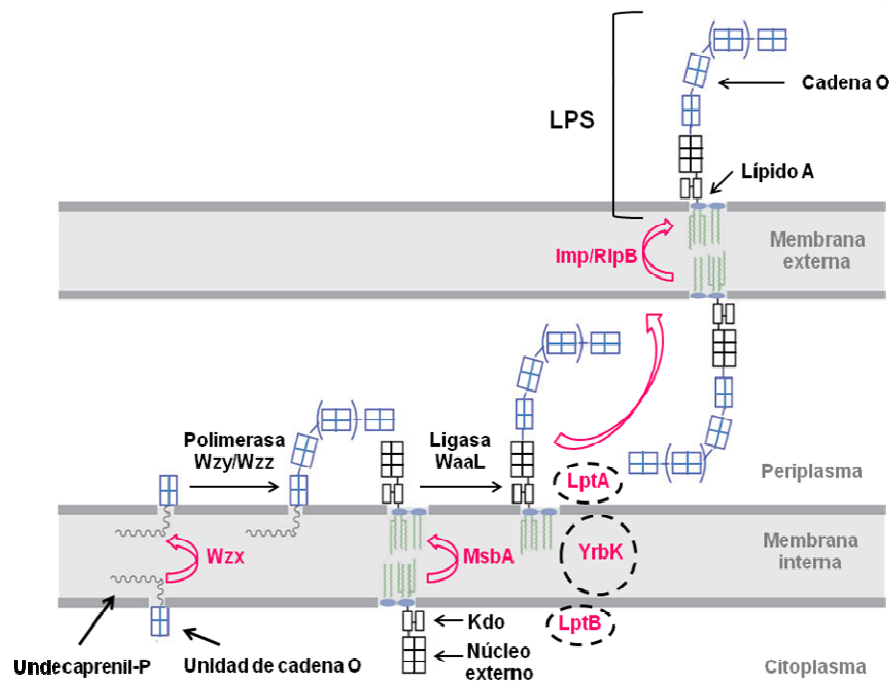


Figura 3. Translocación de la cadena O y la molécula lípido A-núcleo y ensamblaje del LPS de *E. coli*. Figura amablemente cedida por Chris Raetz.⁴⁴⁷

A continuación se resume brevemente la síntesis de las tres secciones del LPS.

1.2 Síntesis de la cadena O

En la biosíntesis de la cadena O de tipo heteropolimérico actúan un conjunto de glicosiltransferasas, situadas en la cara citoplasmática de la membrana interna, que van formando las unidades básicas que se ensamblan sobre un transportador lipídico llamado undecaprenilfosfato (und-P)⁴⁴⁸. La síntesis comienza con la unión de un primer residuo glucosídico al und-P. Este proceso está catalizado por la galactosiltransferasa (WbaP) si el primer azúcar transferido es galactosa o por la N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (WecA) si el primer azúcar es N-acetilglucosamina⁴⁸². El proceso continúa con la adición secuencial de los azúcares que forman cada unidad y el transporte de éstas al espacio periplasmático mediado por una proteína transmembrana llamada Wzx. A continuación, la polimerasa Wzy transfiere las subunidades

und-P al polímero en formación. Por último, la proteína Wzz controla la longitud de la cadena O mediante un mecanismo molecular desconocido (**Figura 4A**).

En el caso de las cadenas O homopoliméricas el proceso de síntesis es diferente (**Figura 4B**)⁴⁴⁸. En primer lugar, se completa el polímero con la incorporación progresiva de residuos glucosídicos al und-P en la cara interna de la membrana citoplasmática. En este proceso no interviene ninguna polimerasa específica. A continuación, se transporta a la cara periplasmática por una proteína transportadora de la familia de transportadores tipo ABC. Los datos sugieren que la longitud de la cadena viene determinada por la acción combinada de las glicosiltransferasas y la proteína Wzm aunque son necesarios más estudios que corroboren esta hipótesis⁵⁹⁷.

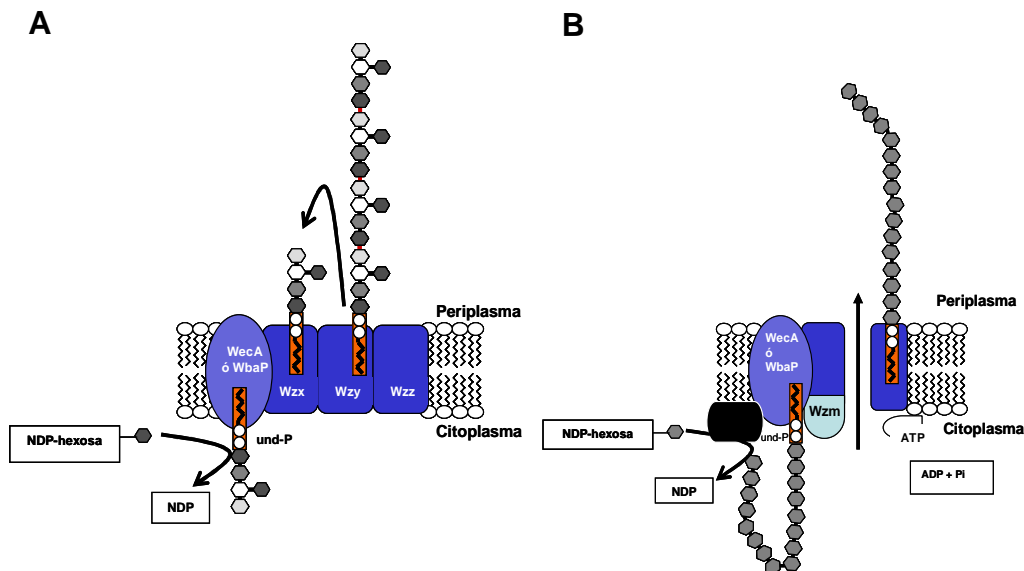


Figura 4. (A) Esquema de la síntesis de la cadena O heteropolimérica. **(B)** Esquema de la polimerización de la cadena O homopolimérica.

A pesar de lo descrito, un transportador de tipo ABC transloca las cadenas O heteropoliméricas de *Klebsiella pneumoniae* serotipo O:12 y *Serratia marcescens* serotipo O:4^{480, 266}.

Tras la síntesis del polisacárido, tanto si es un heteropolisacárido como un homopolisacárido, la ligasa WaaL lo transfiere a la molécula lípido A-núcleo.

1.3 Síntesis del núcleo

La mayor parte de los genes implicados en la síntesis del núcleo en las bacterias Gram negativas se encuentran organizados en el operón *waa*.

El núcleo interno contiene por lo menos un residuo Kdo unido al lípido A (Kdo I) mediante un enlace α (2 \rightarrow 6). En algunos casos, el residuo de Kdo I puede ser substituido por Ko, como en el caso de *Acinetobacter haemolyticus*⁵⁷⁶. La mayoría de las bacterias Gram negativas contienen un disacárido de Kdo unido por un enlace α (2 \rightarrow 4) y el segundo Kdo se une a la posición 4 del Kdo I.

La vía de síntesis y activación del Kdo para ser transferido al lípido A consta de cuatro pasos enzimáticos. En primer lugar, se produce una isomerización reversible 1,2-aldo/keto de la D-ribulosa 5-fosfato, (Ru5P, intermediario de la ruta de las pentosas) a D-arabinosa 5-fosfato (A5P) catalizada por la enzima D-Ara-5P isomerasa (API)^{356,526,549,567}. El segundo paso es la condensación de A5P con fosfoenolpiruvato para la formación de Kdo 8-fosfato (Kdo8P) en un proceso catalizado por la enzima Kdo 8-fosfato sintasa (KdsA)⁴⁴⁵. Seguidamente, la enzima Kdo8P fosfatasa elimina el grupo fosfato liberándose, por tanto, un residuo Kdo y un fosfato inorgánico⁶⁰⁵. Posteriormente, la CMP-Kdo sintetasa (CKS) cataliza la formación de CMP-Kdo lo que permite la unión del Kdo al lípido A⁴⁵⁴ (**Figura 5**).

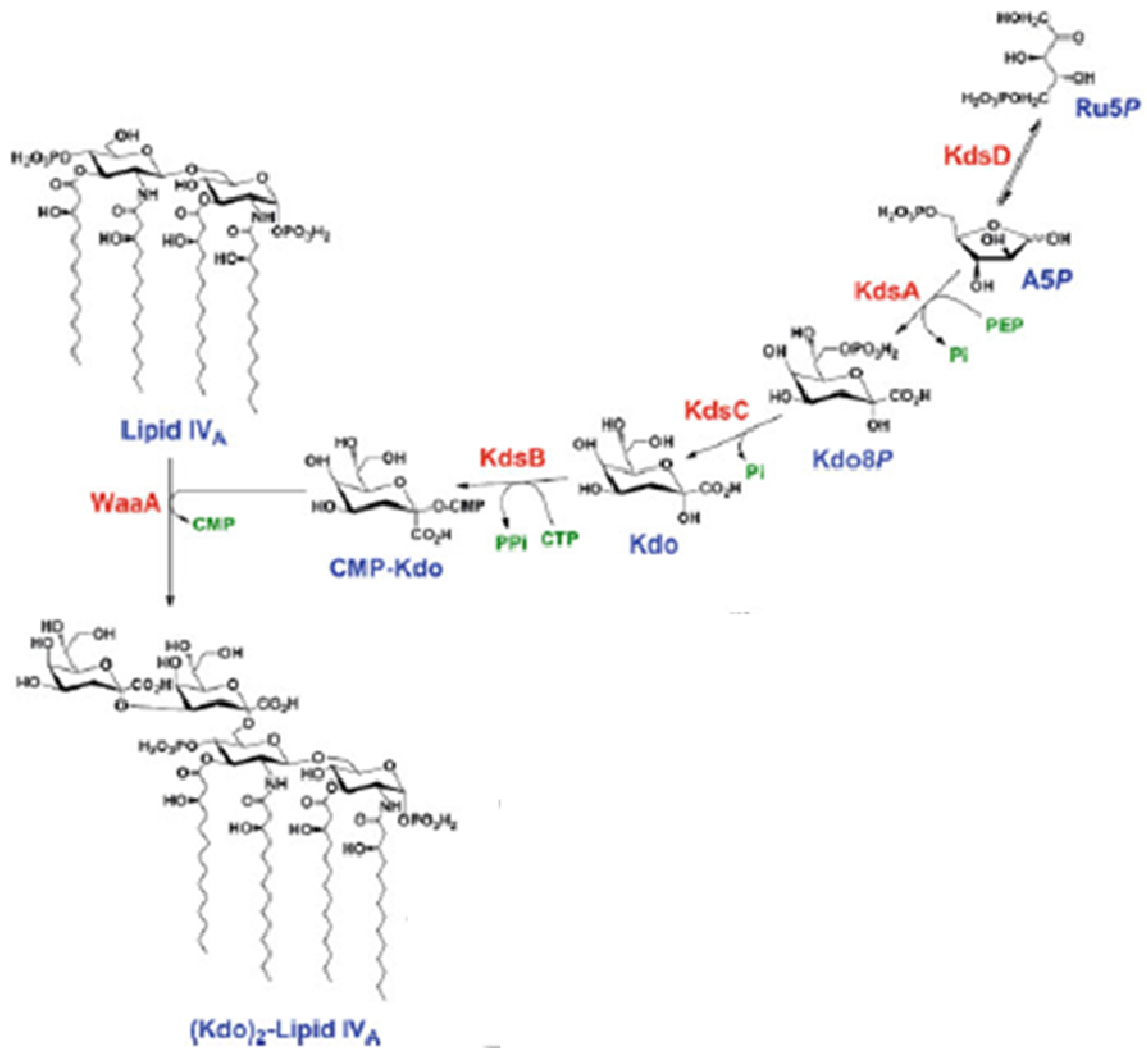


Figura 5. Biosíntesis e incorporación del Kdo en el núcleo interno del LPS de *E. coli*. Tomada de Skurnik M. y colaboradores "Lipopolysaccharide Core Oligosaccharide Biosynthesis and Assembly" 2011³³⁰.

Posteriormente, diversas heptosiltransferasas localizadas en la cara citoplasmática de la membrana interna, añaden heptosas al (Kdo)₂-lípidio IV_A para completar el núcleo. La mayoría de las enterobacterias contienen L,D-Heptosa (Hep I) en la posición 5 del Kdo I²⁴⁷. Una segunda heptosa (Hep II) se une en la posición 3 de la Hep I y una tercera heptosa (Hep III) se une mediante un enlace α (1 \rightarrow 7) a la Hep II formándose la típica estructura de núcleo interno: L,D-Hep-(1 \rightarrow 7)-L,D-Hep-(1 \rightarrow 3)-L,D-Hep-(1 \rightarrow 5)-[Kdo-(2 \rightarrow 4)-Kdo]. Frecuentemente, la posición 4 de la Hep I se encuentra sustituida por un fosfato o fosfoetanolamina, al igual que en la Hep II²⁴⁷. La Hep III sirve de anclaje para el núcleo externo. (**Figura 6**).

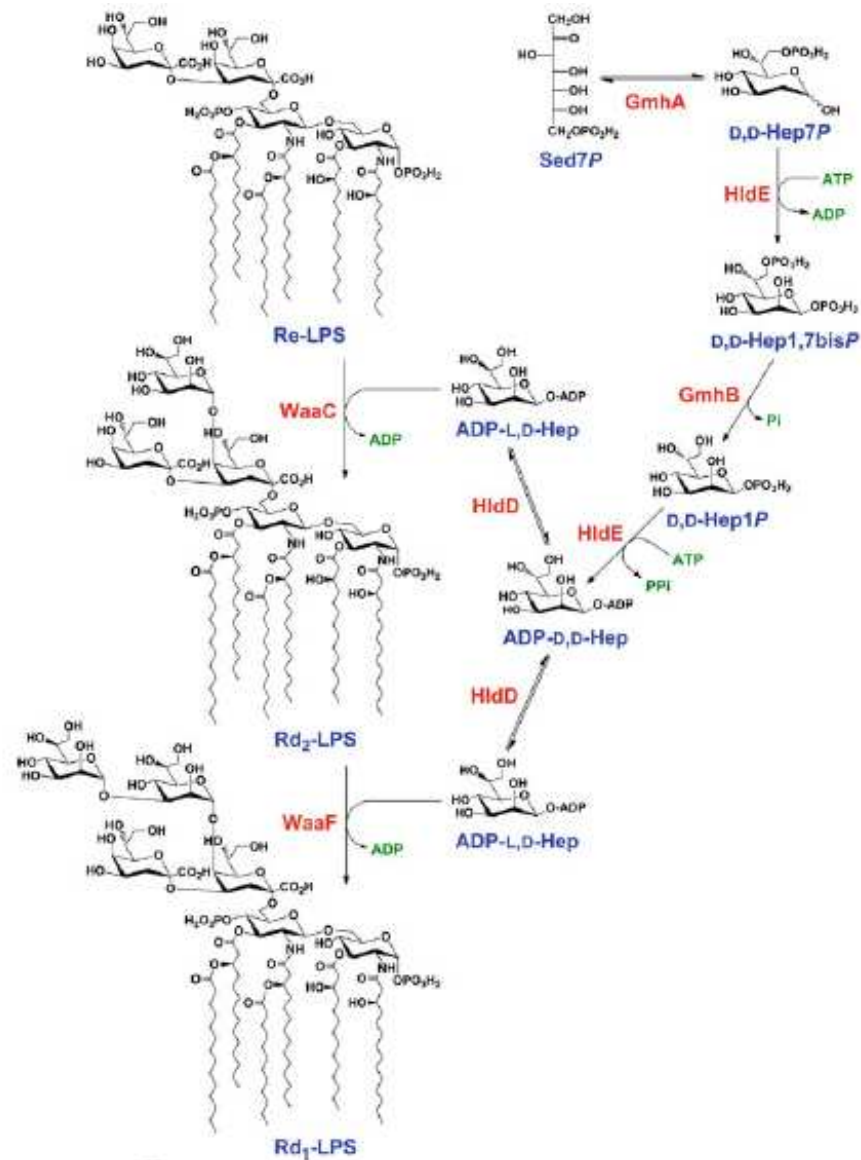


Figura 6. Biosíntesis e incorporación de las heptosas en el núcleo interno del LPS de *E.coli*. Tomada de Skurnik M. y colaboradores "Lipopolysaccharide Core Oligosaccharide Biosynthesis and Assembly" 2011³³⁰.

Algunas bacterias Gram negativas presentan modificaciones de la estructura descrita anteriormente. Se ha descrito que en *Rizhobium* las heptosas están sustituidas por manosa, galactosa y Kdo⁴⁴⁸. *Yersinia pestis* y *Haemophilus influenzae* añaden Ko o fosfatos en lugar de una segunda molécula de Kdo en la posición 4 del Kdo I, respectivamente^{577,596}. La enzima EptB cataliza la adición de fosfoetanolamina al Kdo externo del núcleo *E.coli* y *S. typhimurium* según la concentración de calcio en el medio de cultivo^{277,459}. *P. aeruginosa* presenta un núcleo interno con grupos fosfato en las posiciones 2 y

6 de la Hep I y en la posición 6 de la Hep II⁹⁹. Señalar que la presencia de fosfatos en el núcleo no es esencial. Así, el núcleo interno de *K. pneumoniae* no contiene grupos fosfato en el núcleo interno. En su lugar, el núcleo de *Klebsiella* presenta ácido galacturónico (GalA) que proporciona las cargas negativas necesarias para la estabilidad de la membrana⁵⁰⁰. *H. pylori* y *F. novicida* expresan una Kdo hidrolasa que elimina el Kdo externo del núcleo^{537,539,585}.

1.4 Síntesis del lípido A

Los genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis del lípido A se encuentran dispersos en el genoma bacteriano, en copia única, y están conservados en las bacterias Gram negativas estudiadas. El laboratorio de Chris Raetz elucidó complementamente la síntesis del lípido A en *E. coli* (Figura 7) y en general, se considera que todas las bacterias Gram negativas sintetizan su lípido A de la misma manera⁴⁴⁸.

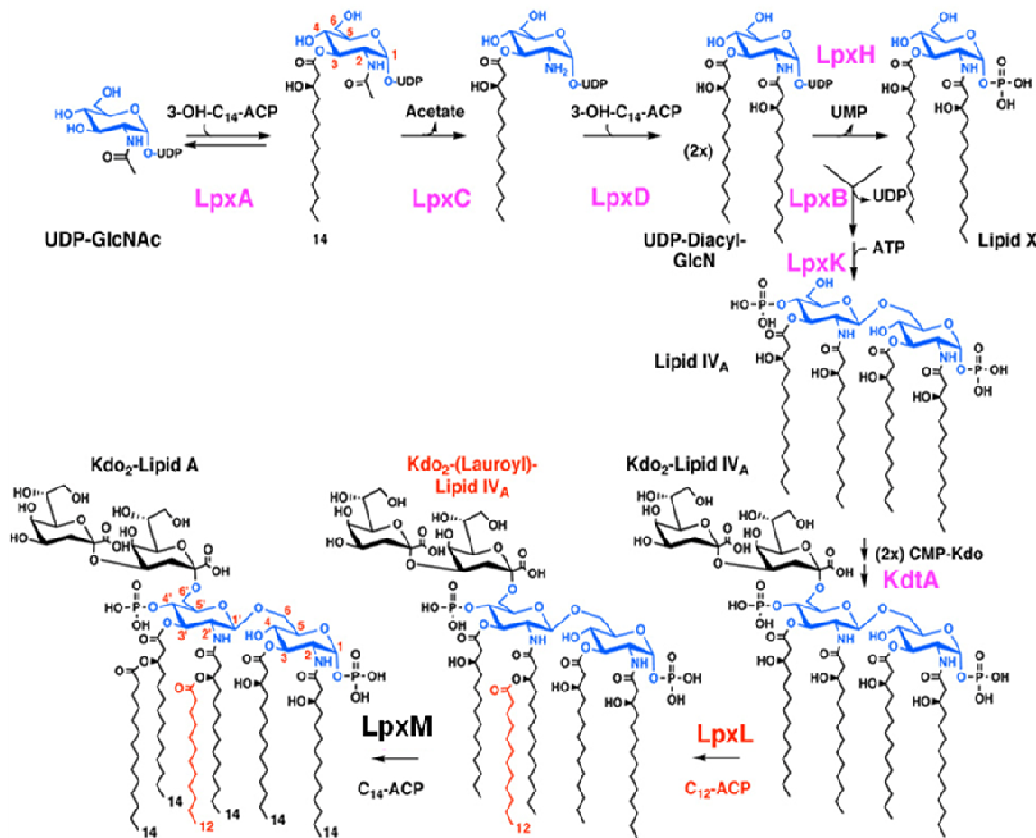


Figura 7. Biosíntesis del lípido A. Amablemente cedido por Raetz y colaboradores⁴⁴⁷

La síntesis del lípido es llevada a cabo en la cara citoplasmática de la membrana interna en la que actúan de forma secuencial nueve enzimas⁴⁴⁸. Brevemente, la síntesis comienza con la adición de hidroximiristato (3-OH-C14) a la molécula UDP-N-acetilglucosamina para formar UDP-3-O-monoacil-N-acetilglucosamina. Esta reacción está catalizada por la aciltransferasa LpxA. Posteriormente, la deacetilasa LpxC elimina un grupo acetilo y la aciltransferasa LpxD incorpora otra molécula de 3-OH-C14 para generar UDP-2,3-diacilglucosamina. Sobre esta molécula, denominada lípido X, actúa una hidrolasa (LpxH) que libera UMP para obtener 3,3-diacilglucosamina-1-P. A continuación, se produce la condensación de una molécula de UDP-2,3-diacilglucosamina con una molécula de 3,3-diacilglucosamina-1-P generándose un tetraacildisacárido denominado lípido IV_A. Esta reacción está catalizada por la enzima LpxB. Sobre el lípido IV_A, la enzima LpxK añade un grupo fosfato en la posición 4' y la Kdo transferasa (WaaA o KdtA) añade dos moléculas de Kdo generándose la molécula (Kdo)₂-lípido IV_A⁹⁰.

Los últimos pasos de la síntesis concluyen con la formación de un LPS hexaacilado⁹¹. Así, en primer lugar, se incorpora una molécula de miristato (C14), proceso catalizado por la aciltransferasa LpxM (MsbB), y posteriormente una molécula de laureato (C12), proceso mediado por la aciltransferasa LpxL (HtrB)^{130,131}. En *E. coli* se ha descrito la actividad de otra aciltransferasa, LpxP, que cataliza la adición de una molécula de ácido palmitoleico (C16:1) al lípido A en lugar de laureato. Esta transferasa sólo se expresa a temperaturas inferiores a 12°C¹⁰⁹.

1.4.1 Modificaciones del lípido A

- Adición de 4-amino-deoxy-L-arabinosa

Diversas bacterias presentan el grupo fosfato 4' del lípido A sustituido con 4-amino-deoxy-L-arabinosa (L-Ara4N). La ruta de síntesis y adición de L-Ara4N al lípido A se muestra en la **Figura 8**. Los genes necesarios para su biosíntesis y adición están codificados en el operón *arnBCADTEF* (*pmrHFJKLM*). La vía empieza con la conversión de UDP-glucosa a UDP-

ácido glucurónico mediante la reacción catalizada por la deshidrogenasa Ugd. Seguidamente, ArnA (PmrI) cataliza la descarboxilación oxidativa del UDP-ácido glucurónico para generar el intermediario UDP-4-keto-piranos⁸². A continuación, ArnB (PmrH) cataliza la transaminación de UDP-4-keto-piranos a UDP-L-Ara4N utilizando ácido glutámico como donador del grupo amino. UDP-L-Ara4N es formilado de ArnA⁸¹. Este derivado formilado es transferido al aceptor und-P por ArnC (PmrF)⁸¹. Seguidamente se produce una de-formilación, reacción catalizada por ArnD, generándose und-P-L-Ara4N⁸¹. ArnE (PmrM) y ArnF (PmrL) son las responsables del transporte de esta molécula a la cara externa de la membrana interna⁶⁰⁸. Allí, ArnT (PmrK) transfiere el residuo de L-Ara4N al fosfato 4' del lípido A⁵⁶³.

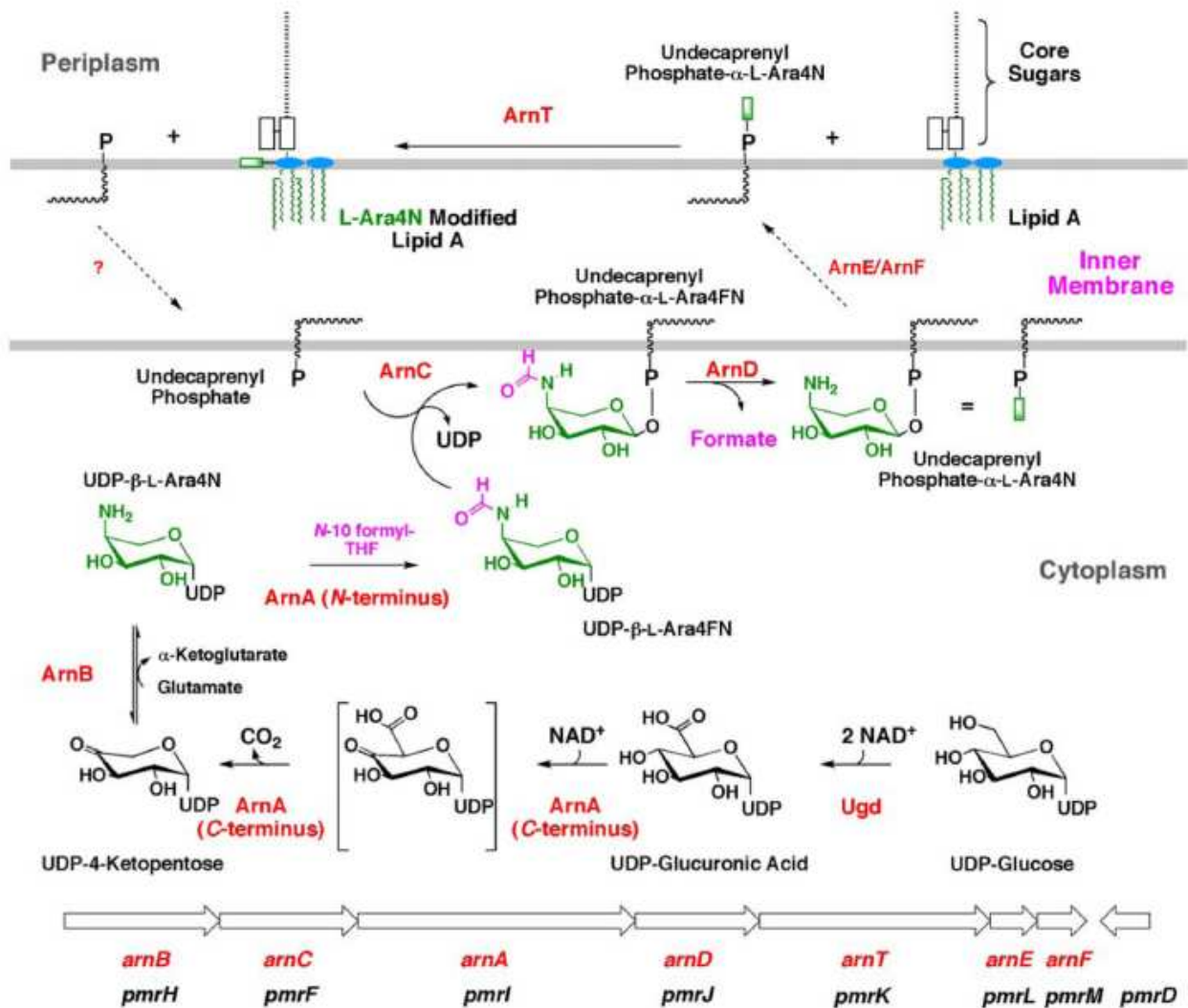


Figura 8. Biosíntesis del undecaprenil fosfato-L-Ara4N y transferencia del residuo de L-Ara4N al lípido A⁴⁴⁷.

- Adición de fosfoetanolamina

La incorporación de fosfoetanolamina al lípido A es llevada a cabo por la enzima EptA (PmrC), localizada en la membrana interna³⁰⁸. En la mayoría de las bacterias estudiadas, la adición de fosfoetanolamina se realiza al fosfato 1 del lípido A aunque en ciertas condiciones, como podría ser la ausencia de L-Ara4N, EptA puede añadir una segunda molécula de fosfoetanolamina al fosfato 4'¹⁹⁹.

- Adición de palmitato

La incorporación de palmitato al lípido A depende de la aciltransferasa codificada por el gen *pagP*^{89,219}. PagP se encuentra en la membrana externa donde utiliza los fosfolípidos como donadores de palmitato⁶³.

- Hidroxilación del lípido A

En *S. typhimurium* se ha identificado a la enzima LpxO como la responsable de la hidroxilación del ácido graso secundario situado en la posición 3', utilizando Fe^{3+} y α -ketoglutarato como cofactores²⁰⁰. Ortólogos de *lpxO* se han encontrado en los genomas de *B. bronchiseptica* y *K. pneumoniae*, si bien sólo en esta última bacteria se ha demostrado la hidroxilación de su ácido graso primario en la posición 3'³²⁴, Llobet y Bengoechea, resultados no publicados).

- Deacilación del lípido A

Se ha descrito una enzima con actividad deacilasa que elimina el hidroximiristato de la posición 3 del lípido A de *S. typhimurium*⁵⁶¹, de *P. aeruginosa*⁴⁷⁷, de *B. bronchiseptica*^{324,197} y de *B. pertussis*, aunque en esta última el gen contiene una mutación¹⁹⁶. Tanto en *Salmonella* como en *Pseudomonas* se ha identificado la deacilasa responsable, PagL^{561,173}. En ambas bacterias, la concentración de magnesio en el medio modula su expresión. Es interesante señalar que, en el caso de *Salmonella*, la modificación del lípido A con L-Ara4N impide la actividad de PagL, a pesar de que la enzima se detecta en la membrana^{289,291}.

En el anexo I se incluye una tabla resumiendo las modificaciones del lípido A en diferentes bacterias.

1.4.2 Regulación de las modificaciones del lípido A

Se ha descrito que varias modificaciones del lípido A están controladas por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ²¹⁸ y PmrA/PmrB^{215,216}. En *S. typhimurium*, la biosíntesis y adición de L-Ara4N al lípido A al igual que la adición de fosfoetanolamina, están reguladas por el sistema PmrA/PmrB^{215,308,626}. La transcripción de los genes activados por PmrA se regula por los niveles de Fe³⁺ o pH ácido, señales detectadas por el sensor PmrB^{603,604}. El sistema también se activa si la concentración de magnesio en el medio es del orden de μM, y para ello se requiere la participación de PhoP/PhoQ^{199,210,527,529} y de la proteína PmrD²⁹⁹. Esta proteína controla la actividad del sistema PmrA/PmrB a nivel post-transcripcional (**Figura 9**).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la regulación de la síntesis y adición de L-Ara4N al lípido A de *K. pneumoniae* es diferente a la descrita anteriormente para *Salmonella*. Así, la expresión del gen *ugd* y el operón *pmrHFJKLM* está regulada independientemente por ambos sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB³¹⁷. Además, nuestro grupo demostró que el sistema RcsCDB, implicado en la regulación de la expresión de la cápsula, también controla las modificaciones del lípido A incluyendo la expresión del sistema PhoP/PhoQ³¹⁷.

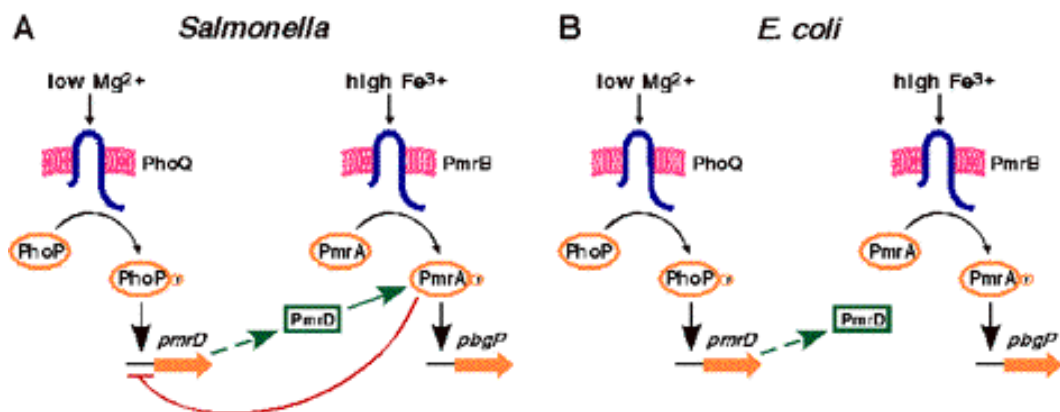


Figura 9. Esquema de la regulación por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB en *Salmonella* (A) y *E. coli* (B)⁴²⁴.

En *Salmonella* y *Klebsiella* la adición de palmitato al lípido A está regulada por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ^{40,199,218,365,366,317}. PhoP/PhoQ no sólo controla las modificaciones del lípido A sino que regula numerosas actividades implicadas en la virulencia como, por ejemplo, la expresión de los sistemas de secreción tipo III en *Salmonella*^{5,27,151,177,366,392}.

En *Salmonella* y *Citrobacter rodentium* la adición de fosfoetanolamina al lípido A está regulada por el sistema PmrA/PmrB^{308,573}. Recientemente nuestro grupo, ha descrito que en *A. baumannii* la adición de fosfoetanolamina también está regulada por este sistema³⁹.

En *S. enterica* la deacilasa PagL está regulada por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ⁵⁶¹ al igual que en *P. aeruginosa*⁴⁷⁷.

La hidroxilación del lípido A de *Salmonella* por parte de LpxO se sugirió que estaba también regulada por PhoP/PhoQ y es dependiente de O₂^{200,218}. Sin embargo, no se han realizado estudios confirmando esta regulación. De hecho, no se ha encontrado el gen *lpxO* analizando los genes regulados por PhoP/PhoQ^{40,199,529}.

LpxT, cataliza la fosforilación de la posición 1 del lípido A y está negativamente regulado por PmrA. Esta regulación no ocurre a nivel de transcripción sino en el momento de que LpxT se ensambla en la membrana interna. La inhibición de LpxT es necesaria para que se añada fosfoetanolamina al lípido A^{241,555}.

2. EL SISTEMA IMMUNE INNATO Y EL LPS

El sistema inmune innato representa la primera barrera defensiva frente a las infecciones. Este sistema reconoce ciertos componentes bacterianos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés “*pathogen associated molecular patterns*”). Los PAMPs poseen 3 características principales: los expresan únicamente los patógenos, están conservados a lo largo de la evolución presentando sólo pequeñas variaciones entre microorganismos diferentes y, habitualmente, su expresión es esencial para la supervivencia del microorganismo³⁵². El LPS contiene uno de los PAMPs más característicos de las bacterias Gram negativas.

A continuación se describe brevemente la interacción entre el LPS y algunos elementos del sistema inmune innato.

2.1 LPS e inflamación

El huésped posee una serie de receptores llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs; del inglés "*pattern recognition receptors*") que reconocen a los PAMPs. Las células del sistema inmune innato, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células "natural killers" (NKs) y células dendríticas, reconocen y reaccionan frente a los PAMPs tras la activación de los receptores celulares "Toll-like" (TLR)^{352,353,414}. Hasta el momento se han descrito diez TLRs en el hombre y cada uno de ellos reconoce uno o varios PAMPs^{8,545}. El LPS es reconocido por un complejo receptor que incluye al TLR4^{125,249}. El reconocimiento del LPS por este complejo da lugar a la activación de cascadas de señalización celulares implicadas en la producción de interleuquinas (IL), quimioquinas y agentes antimicrobianos (**Figura 10**). Todos estos compuestos son necesarios para desarrollar una respuesta inmune eficaz frente a la infección. Además, la activación de este complejo da lugar a la expresión de moléculas co-estimuladoras en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Estas moléculas están implicadas en la sinapsis celular y, por tanto, son necesarias para desarrollar una respuesta inmune adaptativa⁴¹⁴.

El complejo receptor del LPS está formado por el TLR4 y dos proteínas correceptoras: MD2³⁸⁶ y CD14³⁷⁹. Además, para conseguir la máxima activación celular se requiere otra proteína soluble denominada LBP (del inglés "*lipopolysaccharide binding protein*") que transfiere las moléculas de LPS al CD14. La proteína CD14 se encuentra en dos formas: anclada en la membrana ó soluble. Esta última facilita la respuesta frente al LPS en células que carecen de CD14 anclado en la membrana, como es el caso de las células endoteliales y epiteliales. El plasma, así como otros fluidos de las mucosas, como el lavado broncoalveolar, contienen niveles elevados de CD14 soluble⁵⁷⁰.

La unión del LPS al complejo TLR4/MD-2 produce la homodimerización de TLR4 y la subsecuente activación de varias cascadas intracelulares de señalización. Así, tras el reconocimiento del LPS, la proteína adaptadora MyD88 (del inglés “*myeloid differentiation protein*”) interacciona con TLR4 a través de sus respectivos dominios Tir (del inglés “*toll-interleukin 1-receptor*”) ⁷. A continuación, se produce el reclutamiento de IRAK-1 (del inglés “*IL-1 receptor associated kinases*”) al complejo. IRAK-1 se activa por fosforilación e induce la asociación de TRAF6 (del inglés “*TNF-receptor associated factor 6*”) ^{101,102} dando lugar a la activación de la vía canónica del factor de transcripción NF- κ B (del inglés “*nuclear factor κ B*”) y la vía de las MAPK (del inglés “*mitogen-activated protein kinase*”). Existe otra vía de señalización independiente de MyD88 pero dependiente la proteína adaptadora TRIF ³¹. La activación de esta vía termina en la activación del factor de transcripción IRF-3 (del inglés “*interferon regulatory factor 3*”) a su vez responsable de la expresión de los genes IFN- $\alpha\beta$ y de los genes inducibles por IFN ^{30,286}.

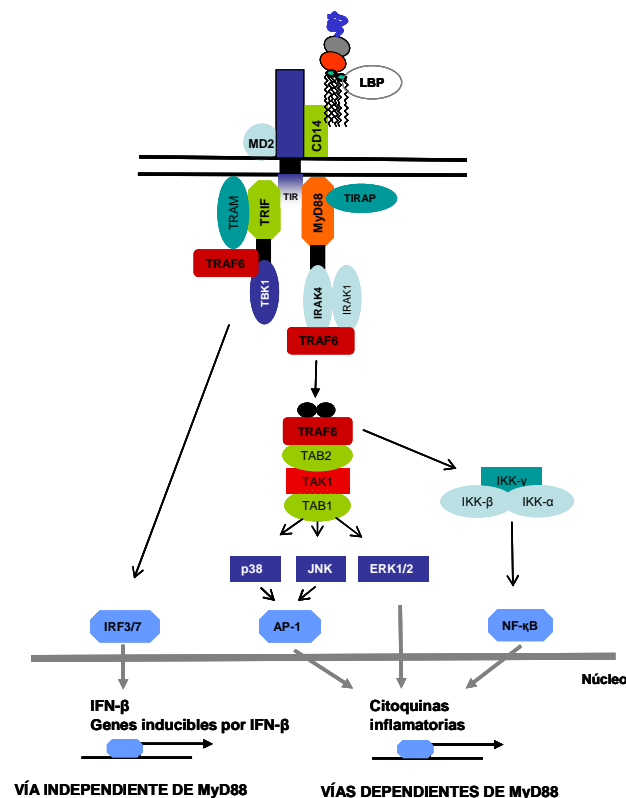


Figura 10. Cascadas de señalización MyD88-dependientes y MyD88-independiente activadas tras el reconocimiento del LPS por el complejo receptor TLR4-MD2.

La evidencia disponible indica que la conformación supramolecular que adquiere el lípido A determina la bioactividad del LPS⁷⁹ (**Figura 11**). Los lípidos A bifosforilados y hexaacilados, que adoptan una conformación en forma de cono truncado y forman agregados hexagonales, son potentes estimuladores de respuestas inflamatorias. A esta estructura supramolecular se le ha denominado conformación endotóxica. En cambio, los lípidos A pentaacilados o los lípidos A sintéticos tetraacilados, que adoptan una conformación cilíndrica y forman agregados lamelares, tienen una reducida capacidad estimuladora⁸⁰.

La ausencia de grupos acilo en el lípido A no es un requisito *per se* para no estimular respuestas inflamatorias⁴⁹³. Lo importante es la distribución de los ácidos grasos en el disacárido de glucosamina, independientemente del número. Una distribución simétrica de seis ácidos grasos (3+3) o asimétrica (4+2) determina diferencias en la inclinación del disacárido de glucosamina con respecto a la orientación de los ácidos grasos y la superficie de la membrana⁴⁹³ y esto se traduce en diferencias con respecto a la interacción con el receptor celular. Una distribución simétrica es menos inflamatoria que una distribución asimétrica de los ácidos grasos. (**Figura 11**)

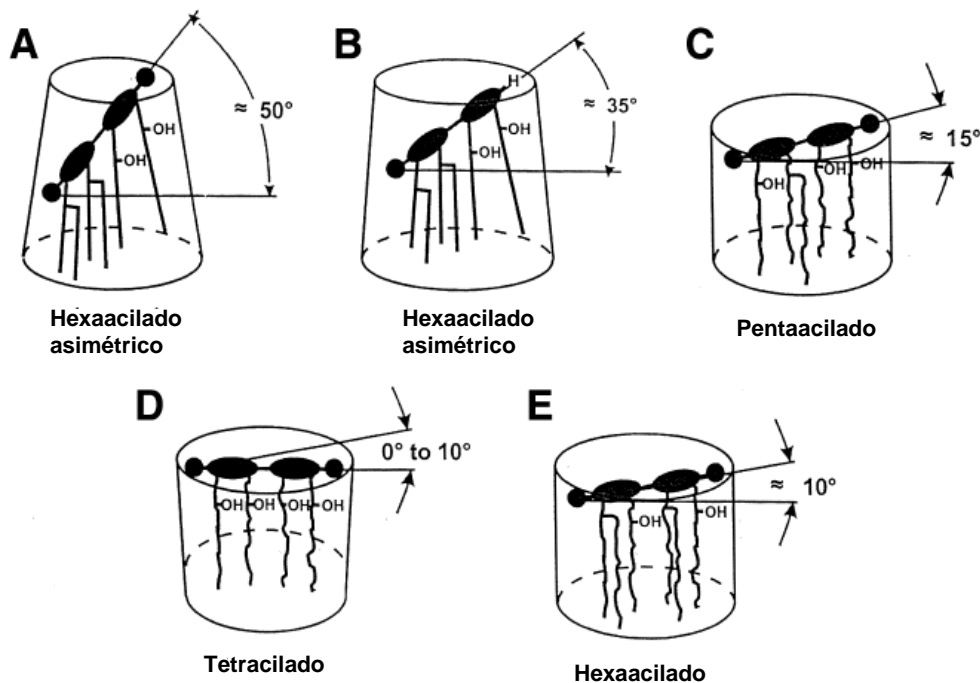


Figura 11. Conformaciones adoptadas por distintos tipos de lípidos A.

Pero además, en otro trabajo se demostró que el grado de activación del complejo receptor del LPS depende de la longitud de los ácidos grasos secundarios del lípido A. Así, lípidos A sustituidos con ácidos grasos secundarios de ocho carbonos son pobres estimuladores de respuestas inflamatorias⁵⁴³. Hasta el momento, no existen datos sobre qué estructura supramolecular adquieren estos lípidos A.

Se ha estudiado en varios trabajos, como influye el cambio de los ácidos grasos principales en la capacidad estimuladora del lípido A, sobre todo en cuanto al cambio de longitud de estos ácidos grasos. En *Neisseria meningitidis* la sustitución de los cuatro grupos 3-OH-C12 de su lípido A por cuatro grupos 3-OH-C14 o 3-OH-C10 modifica la capacidad estimuladora de su lípido A, disminuyendo la activación de los macrófagos humanos⁵⁴¹. Las diferencias en las propiedades biológicas de los diferentes perfiles de ácidos grasos de los LPS están causadas muy probablemente por diferencias en cuanto a la capacidad de unirse o activar los receptores celulares o proteínas accesorias implicadas en el reconocimiento del LPS.

Diversos trabajos apuntan a que algunas de las modificaciones del lípido A descritas en el apartado 1.4 modulan la bioactividad del LPS. Así, en *Salmonella* tanto la incorporación de C16 al lípido A, reacción dependiente de PagP, como la eliminación del grupo 3-OH-C14 de la posición 3, proceso catalizado por PagL, reducen la respuesta celular dependiente del reconocimiento del LPS por el complejo receptor del LPS^{267,287,288}. En el caso de *B. pertusis*, la actividad de PagL también produce un LPS menos endotóxico mientras que la actividad de PagP se traduce en la síntesis de un LPS con mayor actividad endotóxica¹⁹⁶. La eliminación de fosfatos del lípido A también afecta a la respuesta celular^{427,461}. En el caso de *Porphyromonas gingivalis*, activa sus fosfatasas de las posiciones 1 y 4' y genera un lípido A sin ningún grupo fosfato, evadiendo la activación de los TLR4 y disminuyendo la capacidad estimuladora de su lípido A¹³². *H. pylori* consta de dos fosfatasas *lpxE* y *lpxF* que eliminan también los fosfatos de las posiciones 1 y 4' , respectivamente¹⁴³. La desfosforilación de la posición 1 y/o 4' provoca una atenuación en la activación del complejo TLR4-MD2¹⁴³, siendo la actuación de *lpxF* más importante. *Francisella novicida* y *H. pylori* también presentan

actividades fosfatasa en su lípido A que les permiten evitar ser reconocidas por el sistema inmune^{143,586,589}.

2.2 LPS y péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAs) desempeñan un papel clave en la defensa del huésped frente a las infecciones. Existen cierta diversidad en cuanto a tamaño y estructura pero todos comparten dos características importantes para su mecanismo de acción: son catiónicos (ricos en lisina o arginina) y de naturaleza anfipática^{87,397}. Existen cuatro familias diferentes según sus características estructurales: péptidos con forma de lámina beta con puentes disulfuro, péptidos anfipáticos con forma de alpha hélice, péptidos extendidos y péptidos con forma de lazo^{227,397}. En la mayoría de los casos, el primer paso en el mecanismo de acción de estos péptidos consiste en la interacción electrostática entre los péptidos catiónicos y las cargas negativas del LPS presentes en el núcleo y lípido A del LPS. Esto produce un desplazamiento de los cationes divalentes asociados al LPS lo que causa una desestabilización de la membrana externa^{400,569}.

Las bacterias han desarrollado dos tipos de mecanismos para resistir a los PAs: mecanismos de resistencia constitutivos y mecanismos de resistencia inducibles⁴⁰³. Los primeros se refieren a las propiedades inherentes que posee un organismo que le confieren resistencia frente a PAs y que, por tanto, expresa sin estar expuesto al péptido. Por ejemplo, el LPS de *Brucella* no es reconocido por los PAs lo que hace que esta bacteria sea extramadamente resistente a los PAs³⁴¹. Otro factor constitutivo implicado en la resistencia frente a los PAs es la presencia de la cadena O ya que dificulta la accesibilidad del PA a las dianas presentes en el núcleo y el lípido A^{103,430}. Nuestro grupo describió, por primera vez, que los polisacáridos aniónicos de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* también están implicados en la resistencia frente a los PAs^{100,319}. Existen otros mecanismos de resistencia constitutivos no asociados a polisacáridos como son, por ejemplo, las bombas de expulsión. Estas bombas evitan la entrada de los péptidos al interior de la bacteria de manera similar a como lo hacen para los antibióticos. En *Neisseria*

gonorrhoeae se ha demostrado que la resistencia frente a PAs es mediada, al menos en parte, por bombas de flujo llamadas MtrCDE⁵⁰¹. También se han descrito este tipo de bombas en *Staphylococcus aureus*³⁰¹ y en *K. pneumoniae*⁴⁰⁹. Nuestro grupo demostró que *Yersinia enterocolitica* serotipo O:8 emplea una bomba dependiente de potasio para expulsar los PAs⁴⁸.

Los mecanismos inducibles son aquellos que se expresan en respuesta a la presencia de los PAs⁶¹². En el caso de las bacterias Gram negativas estos mecanismos están basados en modificaciones del LPS dirigidas a reducir la interacción del péptido con el LPS. Las mejor conocidas son la eliminación de los fosfatos o su modificación con pEtN y L-Ara4N. Estos cambios reducen las cargas negativas del lípido A y, por tanto, se disminuye la interacción del LPS con los PAs^{234,308,563}. Así, se ha descrito que la resistencia de *H. pylori* frente a la polimixina B depende de la eliminación del grupo fosfato situado en la posición 1 del lípido A por la fosfatasa LpxE⁵⁵⁸. En *P. gingivalis* también se ha descrito una actividad fosfatasa implicada en la resistencia frente a la polimixina que elimina el fosfato de la posición 4'¹³³. La expresión de *lpxF* de *F. novicida* en *E. coli* que elimina el fosfato de la posición 4' del lípido A, aumenta la resistencia de *E. coli* frente a la polimixina²⁵⁵ y el mutante para el gen *lpxF* en *F. novicida* presenta una mayor sensibilidad frente a la polimixina^{278,587}. En *Rhizobium etli*, las fosfatasas *lpxE* y *lpxF* también están implicadas en la resistencia frente a la polimixina²⁵⁶. La modificación del lípido A con L-Ara4N y su contribución en la resistencia frente a los PAs se ha descrito en *Proteus mirabilis*³⁴⁸, *E. coli*⁴⁰⁵, *Y. pseudotuberculosis*³³⁷, *K. pneumoniae*^{233,317} y *P. aeruginosa*³⁸¹. La modificación del lípido A con pEtN y su contribución en la resistencia frente a los PAs se ha descrito en *Salmonella*³⁰⁸ y *C. rodentium* en medio LB⁵⁷³. Recientemente nuestro grupo lo demostró en *A. baumannii*^{22,39}. La adición de C16 al lípido A, proceso dependiente de la aciltransferasa PagP²¹⁹, también es necesaria para la resistencia frente a algunos PAs. La importancia de esta modificación en la resistencia frente a los PAs sólo se ha establecido rigurosamente en *Salmonella*²¹⁹ y en *Klebsiella*³¹⁷. Sin embargo, hay que señalar que hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular por el que la hepta-acilación media resistencia frente a los PAs. Otro mecanismo de resistencia frente a los PAs con estructura de hélice alpha es la endopeptidasa

PgtE descrita en *Salmonella*²¹³. Su homóloga en *E.coli* es la proteasa OmpT, que hidroliza la protamina y bloquea su entrada en la bacteria²⁵⁴.

3. EL GÉNERO *Yersinia*

El género *Yersinia* está incluido en la familia *Enterobacteriaceae* y dentro de él se incluyen catorce especies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. ruckeri*, *Y. aldovae*, *Y. rhodei*, *Y. mollaretii* y *Y. bercovieri*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis* y *Y. similis*^{50,52,53,84,357,533,534,592}.

El bacilo de la peste (*Y. pestis*) fue aislado como agente causal de la peste bubónica en 1894 casi simultáneamente por Yersin y por Kitasato. *Y. pseudotuberculosis* se describió por primera vez en 1883 mientras que *Y. enterocolitica* no recibió importancia como patógeno para el hombre hasta 1960. En 1944, Van Loghem propuso la creación del género *Yersinia*, en honor de Yersin, incluyendo en él a las especies *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*, separándolas del género *Pasteurella*¹⁹. Años más tarde, varios estudios confirmaron la validez de esta propuesta. En 1984, la 8ª edición del Manual Bergey incluía el género *Yersinia* con una especie más, *Y. enterocolitica*.

3.1 Características generales

El porcentaje de GC de todas las especies del género *Yersinia* está en torno a 50. Los estudios de hibridación ADN/ADN muestran una gran homología (porcentajes iguales o superiores al 50%) entre las diferentes especies del género, a excepción de *Y. ruckeri*. Entre *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* el grado de homología es superior al 90%, por lo que se podría incluir a la primera como una subespecie de la segunda si se aplicara el concepto de especie genómica⁵¹. Achtman y colaboradores² han propuesto que *Y. pestis* es un clon derivado, hace 1500-2000 años, de *Y. pseudotuberculosis*. Skurnik y colaboradores⁵¹⁸ han sugerido, tras comparar la región génica que codifica la cadena O de *Y. pseudotuberculosis* O:1b y la región críptica de la cadena O de *Y. pestis*, que la segunda ha evolucionado a partir de la primera.

Más recientemente se ha sugerido que hubo una transferencia de material genético (exactamente el plásmido pMT1) entre una cepa de *Salmonella enterica* serovar *typhi* y una ancestral de *Y. pseudotuberculosis*, que condujo a la aparición de *Y. pestis*, hace ahora unos 2000 años⁴³⁷. Sin embargo, dado su diferente grado de virulencia y por razones de seguridad (*nomen periculosum*, Judicial Commission, 1985) se mantiene la denominación de *Y. pestis*.

Las especies de *Yersinia* son anaerobias facultativas, oxidasa negativas y catalasa positivas. Presentan pleomorfismo dependiendo del medio de cultivo empleado, observándose desde cocos a bacilos cortos e incluso cadenas de cuatro o cinco elementos. Su diámetro es de 0,5-0,8 μm y su longitud de 1-3 μm . No forman esporas ni presentan inclusiones específicas. Presentan un amplio rango de temperatura de crecimiento, desde 4 a 42°C, con una temperatura óptima de 28°C. Salvo *Y. pestis* que es siempre inmóvil, todas las especies de *Yersinia* presentan motilidad a la temperatura de crecimiento comprendida entre 21 y 29°C, expresando entre dos y quince flagelos peritricos⁴⁰¹. Sin embargo, a 37°C pierden esta característica. En general, metabólicamente no difieren de otras enterobacterias, pero cabe destacar la gran influencia que tiene la temperatura sobre algunas de sus actividades bioquímicas.

3.2 Patogenicidad

Mientras que todas las cepas de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* son patógenas, sólo algunas cepas de *Y. enterocolitica* lo son. Las cepas patógenas de *Yersinia* pueden dividirse en aquellas de baja patogenicidad y alta patogenicidad. Las cepas de baja patogenicidad son aquellas que pueden causar infecciones intestinales leves en humanos y no son letales en ratones a bajas dosis de infección. En este grupo están comprendidos los serotipos de *Y. pseudotuberculosis* II, IV y V y los biotipos 2, 3, 4 y 5 de *Y. enterocolitica* que incluyen los denominados serotipos europeos, por ejemplo O:3 y O:9. Por otro lado, las cepas de alta patogenicidad pueden causar infecciones sistémicas graves en humanos y son letales en ratones a dosis de infección bajas. Estas cepas pertenecen a *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* serotipos I y III y *Y.*

enterocolitica del biotipo 1B, donde se incluyen los llamados serotipos americanos, como por ejemplo el O:8¹⁰⁸.

Aunque otros factores aún desconocidos pueden estar involucrados en el fenotipo de alta virulencia, la principal característica común de las cepas de alta patogenicidad es que expresan la isla de alta patogenicidad que codifica genes para la captación de hierro. Los datos indican que este sistema de captación del hierro es necesario para la diseminación sistémica de la bacteria en el organismo¹⁰⁵.

De las 3 especies patógenas para el hombre, *Y. pestis*, agente causal de la peste, es la más virulenta. La peste es una enfermedad propia de roedores que esporádicamente se transmite al hombre. El contagio de *Y. pestis* entre roedores se debe a la picadura de pulgas, en las cuales la bacteria se multiplica en el esófago y la faringe. La multiplicación de la bacteria es tal que se produce un bloqueo del canal intestinal anterior en la pulga. En la siguiente ingesta de sangre, en el esfuerzo por vencer la obstrucción, la pulga regurgita parte de la masa bacteriana en la mordedura, de forma que la bacteria se transmite al torrente sanguíneo, bien de otro roedor, o bien del hombre. Tras la picadura, la bacteria circula por la sangre hasta los ganglios linfáticos más próximos, donde es ingerida por los macrófagos, dentro de los cuales se multiplica, lo que se traduce en la aparición de bubas o adenopatías inflamatorias (de ahí el nombre de peste bubónica) (**Figura 12**). Entre un 30 y un 90% de los sujetos infectados mueren si no se les proporciona el tratamiento adecuado. A partir de las bubas, la bacteria puede volver otra vez a la sangre, produciendo lo que se denomina la peste septicémica secundaria. También existe una forma septicémica primaria que, junto con la neumónica, es la más mortífera. La peste septicémica primaria se da en individuos en los que las bubas pasan desapercibidas y la bacteria pasa a la sangre provocando una infección sistémica que en pocas horas acaba con el individuo. La muerte en el hombre se debe al elevado número de bacterias diseminadas y a las reacciones del huésped (choque séptico) asociadas al LPS. Los individuos infectados con *Y. pestis* a menudo desarrollan lesiones necróticas en los vasos sanguíneos periféricos probablemente debido a una coagulación intravascular diseminada inducida por el LPS, fenómeno que conlleva un ennegrecimiento de

la piel en los enfermos (peste o muerte negra). La bacteriemia conduce a la infección de nuevas pulgas y la subsiguiente transmisión a otros huéspedes. También puede ocurrir que la bacteria llegue al pulmón a través de la sangre (**Figura 12**). Esta forma se denomina peste neumónica secundaria, de contagio muy fácil y rápido por aerosoles, con tasas de mortalidad prácticamente del 100%. La inhalación de estos aerosoles produce una forma de la enfermedad, peste neumónica primaria, que progresa mucho más rápido que las anteriores, probablemente porque la bacteria ya expresa todos los factores de virulencia necesarios para la colonización del cuerpo humano⁹⁶.

Las otras dos especies patógenas humanas, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* causan un amplio número de síndromes gastrointestinales como adenitis mesentérica y diarrea. Las infecciones se contraen normalmente por ingestión de agua o alimentos contaminados^{65,309,584}. La infección por *Y. enterocolitica* es bastante común en el hombre, al contrario que la causada por *Y. pseudotuberculosis*. En ambos casos, la bacteria migra a través del tracto intestinal hasta el íleon donde se adhiere y atraviesa la pared intestinal a través de las células M llegando al tejido linfoide (placas de Peyer) donde induce una respuesta inflamatoria²¹². En las placas de Peyer las bacterias se multiplican antes de alcanzar e infectar los nódulos linfáticos mesentéricos y, eventualmente, diseminarse a otros tejidos como el hígado o el riñón, donde se replican extracelularmente formando microabscesos monoclonales^{212,505} (**Figura 12**). Existen varias evidencias que indican que la adhesión e invasión sucede de forma similar en *Y. enterocolitica* con o sin plásmido de virulencia. No obstante, el siguiente paso de proliferación en las placas de Peyer es diferente: las bacterias con plásmido proliferan, en cambio, las bacterias sin plásmido son eliminadas²¹².

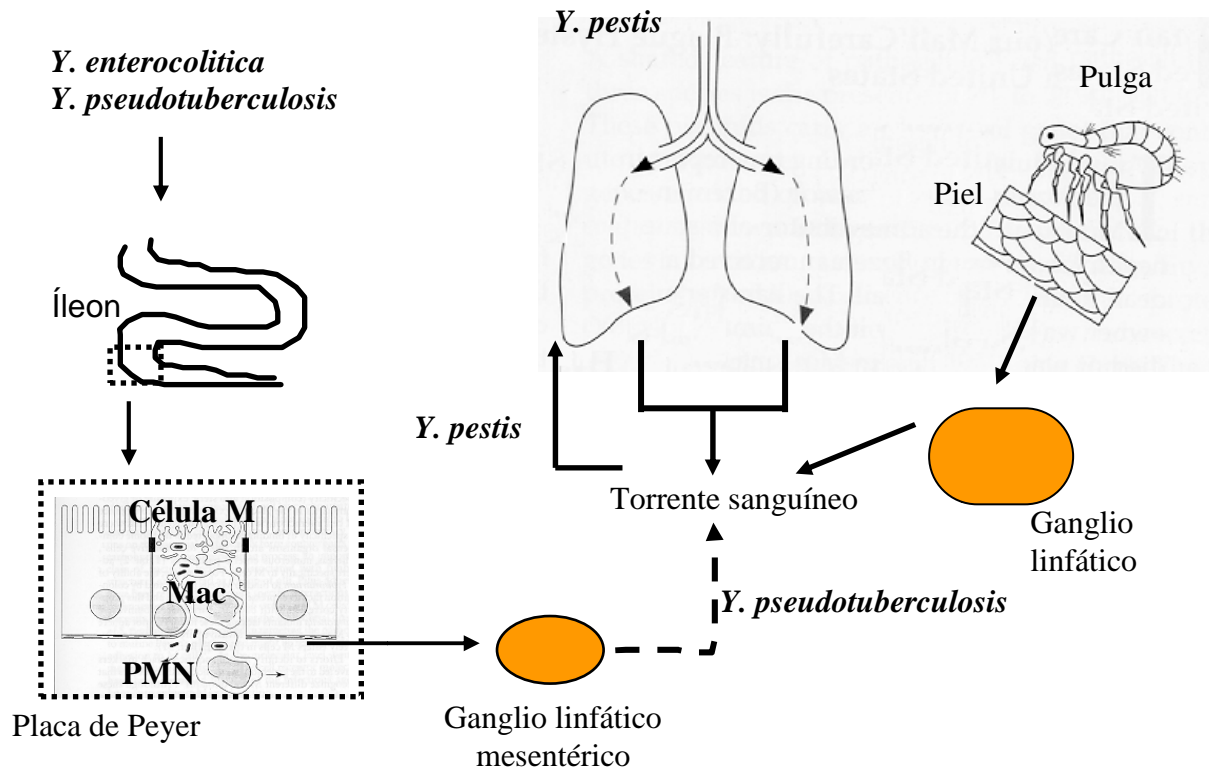


Figura 12. Representación esquemática de las rutas de entrada y localización final de *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis* en las infecciones humanas. (PMN, leucocitos polimorfonucleares; Mac, macrófago).

En el caso de las infecciones por *Y. enterocolitica*, los síntomas dependen de la edad del paciente. En niños, esta bacteria produce adenitis mesentéricas agudas fácilmente confundibles con apendicitis, así como ileítis terminal que cursa con diarrea. En adultos, la infección intestinal puede complicarse con eritema nodoso y artritis reactiva. No se suelen producir septicemias y, si ocurren, están asociadas con otras patologías como la cirrosis o la hemocromatosis⁹⁶. En el caso de la infección por *Y. pseudotuberculosis*, se producen septicemias con relativa frecuencia, especialmente en pacientes inmunodeprimidos⁹⁶.

Cabe señalar que, aunque la replicación de *Yersinia* en el interior del huésped es principalmente extracelular, diversos trabajos demuestran que las tres especies de *Yersinia* patógenas son capaces de sobrevivir y multiplicarse en el interior de macrófagos, hecho que parece ser de especial importancia en las primeras fases de la infección^{32,322,442,624}.

3.3 Factores de virulencia

Las tres especies patógenas de *Yersinia* tienen ciclos de vida bifásicos durante los cuales la expresión génica se adapta a diferentes ambientes⁵⁴⁴. Los principales factores ambientales que regulan la expresión de los factores de virulencia de *Yersinia* son el pH, la osmolaridad, la disponibilidad de iones y nutrientes, el oxígeno y, de manera destacable, la temperatura^{203,544}.

Los factores de virulencia de *Yersinia* están codificados tanto en el cromosoma como en diferentes plásmidos. Las tres especies patógenas contienen un plásmido de 70-75 kb (pYV), esencial para su virulencia. Este plásmido codifica un conjunto de proteínas, YadA (del inglés "*Yersinia adhesin A*") y Yops (del inglés "*Yersinia outer proteins*"), que protegen a la bacteria frente a la lisis mediada por el complemento, la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos y previenen la activación de respuestas inflamatorias. Las Yops son secretadas a través de la envoltura de la bacteria mediante un sistema de secreción tipo III (SSTT) Ysc, codificado en el mismo plásmido, que transloca directamente las proteínas al citoplasma de la célula huésped^{135,139,434}. Una vez allí, estas proteínas bloquean numerosas vías de señalización de la célula diana^{565,574} lo que asegura la supervivencia de la bacteria en los tejidos del huésped. Además del plásmido pYV, *Y. pestis* contiene otros dos plásmidos: pPCP de 9.5 kb y pMT de 100 kb. Estos plásmidos codifican las proteínas necesarias para la colonización de la pulga (la proteína capsular Calf1 codificada por pMT) y para la dispersión e infección sistémica en el hombre (la proteína Pla codificada por pPCP)^{179,525}.

4. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Y. enterocolitica*

4.1 Factores de virulencia codificados en el plásmido de virulencia pYV

El plásmido pYV de *Y. enterocolitica* 8081 tiene unas 70 kb. La transcripción de los genes está regulada tanto por la temperatura como por el contacto con la célula eucariota¹³⁹.

4.1.1 El sistema tipo III de secreción Ysc

El SSTT Ysc codificado en el plásmido de virulencia pYV consta de cuatro componentes básicos: (i) el aparato de secreción tipo III formado por proteínas Ysc, (ii) las proteínas Yop efectoras, (iii) un conjunto de proteínas reguladoras que bloquean el SSTT en ausencia del estímulo adecuado; y (iv) un grupo de proteínas que ayudan a la translocación de las proteínas efectoras.

El contacto íntimo entre la bacteria y una célula eucariota, además de un contexto con bajo Ca^{2+} es condición imprescindible para la secreción y translocación de las Yops¹³⁵ (**Figura 13**). El contacto íntimo con la célula eucariota está mediado por la interacción de las adhesinas y las integrinas de la membrana externa de la bacteria con la superficie de la célula huésped. *In vitro*, se puede inducir la secreción de Yops creciendo las bacterias a 37°C en un medio rico pero deficiente en iones Ca^{2+} 231,361.

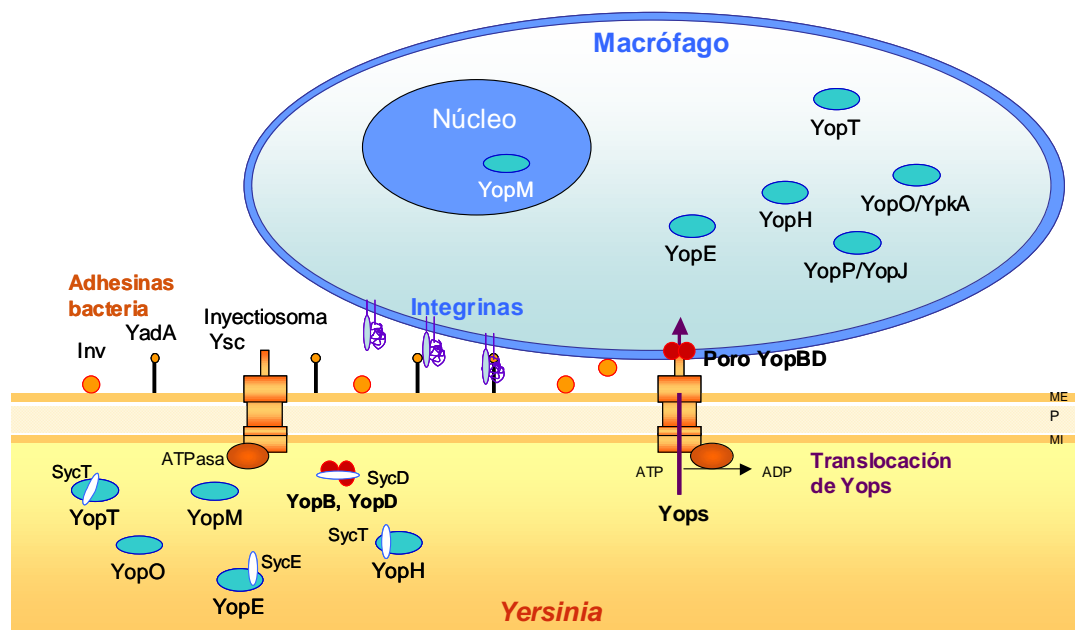


Figura 13. Secreción de Yops por el inyectosoma Ysc y translocación a través de la membrana de la célula eucariota. (ME, membrana externa; P, peptidoglicano; MI, membrana interna). Adaptado de: Cornelis G. R., 2002¹³⁵.

La transcripción de los genes *ysc* y *yop* está regulada por la temperatura siendo VirF el activador transcripcional que controla este proceso^{136,137,304,519}. A su vez, VirF está regulado negativamente por YmoA y por FliA^{72,136,138,248,328}. Y,

además, se ha demostrado que el grado de enrollamiento de la cromatina también modula la expresión de los genes *ysc* y *yop*⁴⁷⁰.

Recientemente se ha descrito que el regulador transcripcional YtxR, que induce la expresión de los genes *ytxAB* que codifican para una toxina ADP-ribosilada²⁶, inhibe la expresión de los genes *ysc* y *yop*. Los estudios realizados sugieren que YtxR interfiere en la activación transcripcional mediada por VirF, compitiendo por los sitios de unión en la zona promotora de los genes *ysc* y *yop*²⁵.

Estructura y composición del aparato de secreción Ysc

El aparato de secreción del SSTT Ysc consta de dos partes diferenciadas: el **inyectosoma** y el **aparato de translocación**. El inyectosoma está compuesto por aproximadamente 25 proteínas. La parte proximal del inyectosoma está anclada en la membrana de la bacteria mientras que la parte más distal termina con una aguja que sobresale de la superficie bacteriana. Tres de las proteínas Yops secretadas por el inyectosoma YopB, YopD y LcrV forman el aparato translocador. Se adhieren a la membrana de la célula diana formando un poro y median la translocación de las otras proteínas efectoras Yops al citosol celular¹³⁴.

A. El inyectosoma

El inyectosoma permite la translocación de proteínas desde el citosol bacteriano al citosol de la célula huésped en un solo paso¹³⁴. Consta de tres estructuras diferenciadas (**Figura 14**): (a) un dominio citoplasmático, (b) un canal transmembrana formado por dos pares de anillos que abarcan la membrana interna y externa, y (c) una estructura externa denominada “aguja”
158,548 .

(a) Dominio citoplasmático

Es una estructura situada en la parte citosólica del inyectosoma en forma de anillo hexamérico formado por YscQ y la proteína

citoplasmática YscN que tiene función ATPasa⁶⁰¹. (**Figura 14**). YscL interacciona con la ATPasa ejerciendo de regulador⁷⁰.

(b) Canal transmembrana

Es una base cilíndrica formada por dos pares de anillos, que abarcan las membranas interna y externa, unidos por una estructura en forma de varilla (**Figura 14**). El anillo de la membrana externa que sobresale al periplasma está formado por la secretina YscC^{95,298}. YscW es una lipoproteína auxiliar necesaria para la inserción adecuada de YscC en la membrana externa^{94,298}. El anillo de la membrana interna está formado por 24 subunidades de la lipoproteína YscJ⁵⁰⁴. YscD podría conectar los dos anillos de las membranas⁵³⁵. YscR/S/T/U/V son proteínas integrales de la membrana interna^{12,49} que reconocen a las Yops translocadoras (YopB, YopD, LcrV) y forman el canal de exportación en la membrana interna⁵³¹. YscO e YscP parecen ser los componentes más externos del aparato de secreción y son necesarias para la secreción de LcrV y las Yops^{415,416}

(c) Aguja extracelular

Es una estructura extracelular alargada, rígida y hueca, que está unida al cuerpo basal y a través de la cual se translocan/secretan las proteínas efectoras (**Figura 14**). En *Yersinia*, la aguja está formada por la polimerización de la proteína YscF²⁴⁴. La aguja de *Y. enterocolitica* consiste en 139 ± 19 subunidades de YscF y la punta del complejo está formada por 3-5 monómeros de la proteína LcrV⁸⁸. Journet y colaboradores²⁷³ demostraron que la longitud de la aguja de *Yersinia* depende del tamaño de la proteína YscP. Estos autores propusieron que YscP controla el tamaño de la aguja durante el ensamblaje progresivo de las unidades del inyectiosoma, interrumpiendo la exportación de YscF una vez alcanzada la longitud de la estructura madura. Cada aguja es regulada por una sola proteína YscP reguladora⁵⁸¹. El hecho de que la longitud de la aguja esté regulada sugiere que su longitud es un parámetro físico importante para su función⁶⁹.

B. El aparato de translocación

La formación del poro en la membrana de la célula huésped es dependiente de tres translocadores YopB, YopD y LcrV^{134,246,376}. YopB y YoD son proteínas hidrofóbicas y forman el poro insertándose en la membrana celular^{223,396} mientras que LcrV forma una estructura pentamérica en la punta de la aguja del inyectiosoma que sirve de plataforma de unión para los otros dos translocadores^{383,484} (**Figura 14**).

Por otra parte, YopN es una de las proteínas secretadas por el inyectiosoma que parece actuar como tapón citoplasmático del aparato de translocación^{118,181,339} impidiendo la secreción de proteínas efectoras tanto en presencia de calcio como en ausencia de contacto entre la bacteria y la célula eucariota¹¹⁸.

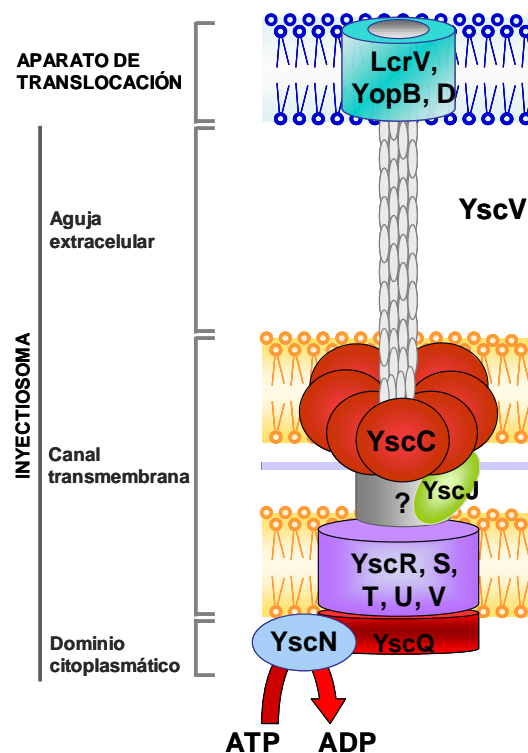


Figura 14. Representación esquemática del sistema de secreción tipo III Ysc de *Yersinia*. Adaptado de: Tampakaki A. P⁵⁴⁸.

Tipos y funciones de las proteínas Yop efectoras

Se han caracterizado cinco proteínas efectoras en las tres especies patógenas de *Yersinia*: YopE, YopH, YopM, YopP, YopO¹³⁷. Otra proteína efectora YopT se encuentra exclusivamente en *Y. enterocolitica*⁵⁶⁵.

A. Acción sobre el citoesqueleto

YopE, YopH, YopT y YopO inhiben la dinámica del citoesqueleto, con lo que contribuyen a la resistencia de *Yersinia* frente a la fagocitosis por macrófagos^{428,471} y leucocitos polimorfonucleares^{14,211,578}. Su diana son las proteínas de la familia Rho GTPasas (RhoA, Rac-1 y Cdc42), las cuales controlan varias funciones celulares, incluyendo la regulación del citoesqueleto de actina^{211,222,355}. Estas proteínas oscilan entre un estado activo o inactivo en función de si tienen unido GTP o GDP, respectivamente. La forma activa es capaz de interactuar con efectores moleculares que actúan sobre el citoesqueleto celular. (**Figura 15**).

YopE: es una proteína que estimula la hidrólisis de GTP unido a las Rho GTPasas^{66,579}. La desactivación de las Rho GTPasas provoca que se altere la estructura de los filamentos de actina y se inhiba la fagocitosis por macrófagos^{66,471,532,579}. En el modelo murino, YopE es esencial para la virulencia de la bacteria indicando la importancia de su actividad antifagocítica para la supervivencia del patógeno. Su actividad sobre las Rho GTPasas también da lugar a que células epiteliales en cultivo infectadas se redondeen y se despeguen, fenómeno denominado citotoxicidad. Además, YopE regula la respuesta inflamatoria, ya que la desactivación de Rac-1 inhibe la maduración de la prointerleuquina-1 β en macrófagos⁴⁹².

También se ha descrito que YopE está involucrada en cerrar el poro realizado por el SSTT después de la translocación de los efectores⁵⁷⁴. Se especula que la polimerización de actina es necesaria para la formación del poro y, por tanto, YopE contrarresta esta actividad⁵⁷⁵. Algunos datos apuntan a

que YopE también podría regular la cantidad de efectores inyectados en la célula diana con el fin de evitar una hipertranslocación⁶.

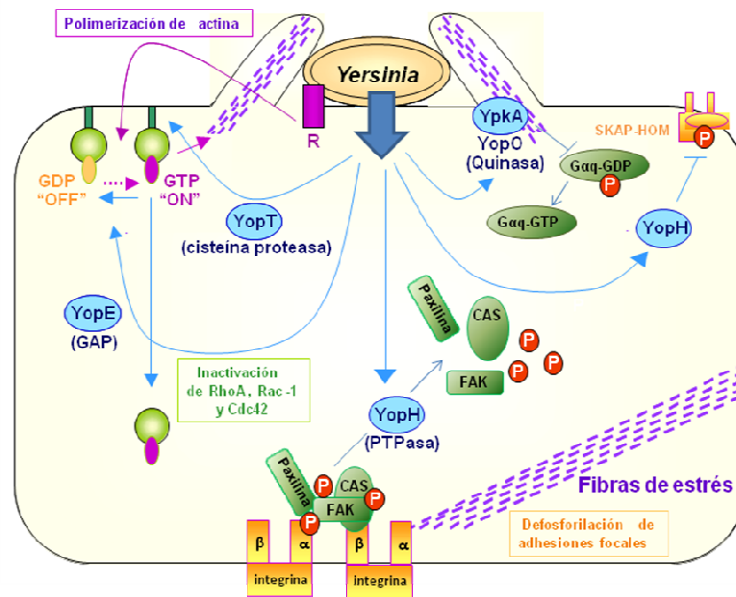


Figura 15. Acción antifagocítica de las Yops. Tras el contacto de la bacteria con el receptor del fagocito (R), se desencadena una cascada de señalización y los miembros de la familia Rho (RhoA, Rac-1, Cdc42) promueven la polimerización de actina. YopE hace que disminuya la expresión de Rac-1f, Cdc42 y RhoA. La proteasa YopT corta el extremo COOH de RhoA, Rac-1 y Cdc42, liberándolas de la membrana plasmática. La quinasa YopO se autofosforila tras el contacto con la actina e interacciona con RhoA y Rac-1. La PTPasa YopH es dirigida a adhesiones focales y a otros complejos proteicos donde defosforila proteínas como la quinasa de adhesión focal (Fak), p130Cas y SKAP-HOM e inhibe la fagocitosis. Adaptado de: Cornelis G. R., 2002 y Matsumoto H. 2009^{135,345}.

YopT: Es una cisteína proteasa que elimina el grupo prenilo que une a las Rho GTPasas a la membrana celular²⁵⁹. Esto provoca que la Rho GTPasa se libere de la membrana y sea inactiva⁵⁰². La inyección de YopT también provoca un efecto citotóxico en las células epiteliales y la ruptura de las fibras de estrés del citoesqueleto de actina^{259, 4,489}. Es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8⁵⁶⁶.

YopH: tiene actividad (fosfotirosina fosfatasa)⁴²⁸ y participa en la inhibición de la fagocitosis por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares^{532,578}. La diana principal de YopH es p130^{Cas} que es una proteína de adhesión focal necesaria para la fagocitosis⁵⁷⁴. La defosforilación de esta proteína provoca una alteración en la estructura de la actina, incluyendo pérdida de adhesiones focales y posterior inhibición de la

fagocitosis⁵⁶⁵. Otros estudios también han identificado a FAK, paxilina, Lck, Fyb y SKAP-HOM como dianas de YopH^{67,135} (**Figura 15**).

YopO: es una proteína con múltiples dominios; por una parte tiene un dominio con actividad serina/treonina quinasa, otro dominio de unión a las Rho GTPasas RhoA y Rac-1 y, por último, posee otro dominio de unión a actina^{162,275}. YopO se produce de forma inactiva y es activada por contacto con la actina²⁷⁵,⁵⁶⁰. YopO impide que la bacteria sea fagocitada actuando sobre las integrinas β ^{211,436}. Fosforila el residuo Ser47 del mediador de procesos celulares Gαq e impide su acción en múltiples procesos celulares³⁹⁵.

B. Acción sobre las vías de señalización inflamatorias

Las Yops también promueven la supervivencia intracelular bloqueando la activación de respuestas inflamatorias (**Figura 16**).

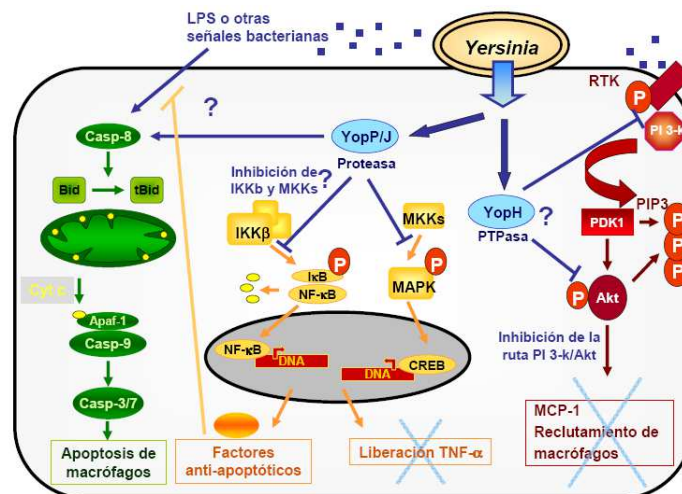


Figura 16. Inhibición de la respuesta inflamatoria. YopP se une y bloquea la quinasa $I\kappa B\beta$ (IKK β), la cual inhibe la fosforilación y degradación de I κ B, el inhibidor de NF- κ B. Esto a su vez previene la migración del factor de transcripción NF- κ B al núcleo. La ausencia de NF- κ B en el núcleo previene la transcripción de genes antiapoptóticos y varios genes proinflamatorios, como el gen de TNF α . YopP también bloquea las MAPK quinastas (MKKs), inhibiendo la activación de MAPK, lo cual impide que se active CREB, otro factor de transcripción implicado en la respuesta inmune. YopP induce la apoptosis en macrófagos, bien directamente actuando por encima de Bid o indirectamente bloqueando la síntesis de los factores antiapoptóticos dependientes de NF- κ B. YopH inhibe la producción de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) defosforilando elementos clave en la vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-k)/Akt. Adaptado de: Cornelis G. R., 2002¹³⁵

YopP: es una serina/treonina acetiltransferasa que altera la respuesta inflamatoria de la célula huésped reduciendo la secreción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-8 en macrófagos y células epiteliales y endoteliales infectadas^{74,156,413,487}. Las dianas moleculares de YopP son las MAPKs y la $\text{I}\kappa\text{B}-\beta$ quinasa^{74,473}. La inhibición de estas vías de señalización además promueve la apoptosis de las células infectadas⁴¹³ en un proceso dependiente de la activación de la vía de la caspasa 3^{156,473,474} (**Figura 16**).

YopH: contribuye a la alteración de la respuesta inflamatoria inhibiendo la síntesis de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), una quimioquina implicada en el proceso de reclutamiento de macrófagos al sitio de la infección⁴⁸⁵. También se ha descrito que evita la activación y proliferación de las células T y B^{13,611} (**Figura 16**).

LcrV: es también una proteína efectora que induce la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en macrófagos. La IL-10 reduce la producción de $\text{TNF}\alpha$ y de $\text{IFN}\gamma$ contrarrestando así el desarrollo de la respuesta inmune del huésped⁵⁰⁷.

YopM: no se conoce exactamente el papel que ejerce esta proteína en la célula huésped pero se ha demostrado que es esencial para la virulencia en ratón tanto para *Y. pestis* como para *Y. enterocolitica*^{312,384}. Estudios iniciales demostraron que YopM es translocada en la célula huésped y una vez allí es transportada del citoplasma al núcleo a través de vesículas^{510,511}. Un análisis del patrón de expresión de genes de macrófagos infectados con *Y. enterocolitica* sugiere que YopM afecta a la expresión de genes implicados en el ciclo celular y en el crecimiento de la célula⁴⁸⁶. Dos estudios han identificado dos dianas a las cuales se une YopM y las regula. Se trata de las serina/treonina quininas PRK2 y RSK1 implicadas en diferentes procesos celulares^{235,350}. Los miembros de la familia RSK están implicados en la regulación del ciclo celular, la regulación de la fagocitosis, la apoptosis y la translación y la movilidad celular^{18,305}. Por otro lado, PKN2 participa en la

regulación del citoesqueleto de actina, la adhesión celular y la progresión del ciclo celular⁴⁸⁸.

Chaperonas

Todas las clases de proteínas efectoras explicadas anteriormente se pueden dividir en dos grupos: las que requieren chaperonas para que su secreción sea eficiente (YopH, YopE, YopT, YopO) y las que no (YopP, YopM)⁵⁹¹. Estas chaperonas se denominan Sycs (del inglés “*Specific Yop Chaperone*”) y son pequeñas proteínas acídicas presentes en el citosol. No se conoce su función exacta pero se ha propuesto que podrían prevenir el plegamiento de la proteína⁵⁴⁰ o bien conferir una señal de secreción tridimensional a la proteína a la que asisten⁶¹. Además, pueden estar implicadas en la organización de la secreción de Yops de manera que éstas se secreten en un orden determinado^{78,607}. Normalmente están codificadas por un gen localizado cerca del que codifica la proteína a la que asisten¹³⁵.

4.1.2 YadA

YadA es una proteína autotransportadora (41-44 kDa) localizada en la membrana externa y que está codificada en el plásmido de virulencia pYV de las tres especies patógenas de *Yersinia*¹³⁷. En *Y. pestis* está en forma de pseudogen. YadA sólo está implicada en la virulencia de *Y. enterocolitica*^{283,423,468,547}. Así, un mutante *yadA* de *Y. enterocolitica* presenta una menor capacidad para colonizar el íleon de ratones infectados tanto por vía oral como intraperitoneal^{283,423}.

YadA forma estructuras homotríméricas^{207,325} u homotetraméricas²⁴⁵ en la membrana externa de la bacteria. Estas estructuras recubren la superficie de la bacteria y le confieren características hidrofóbicas^{245,323,342}. La estructura de YadA consta del extremo N-terminal seguido por el cuello y una parte peduncular que termina en el extremo C-terminal que ancla la proteína en la membrana externa. El extremo N-terminal tiene forma de óvalo y es responsable de la adhesión a células y a componentes de la matriz

extracelular, además de mediar el proceso de autoaglutinación por la interacción tipo cremallera entre diferentes moléculas de YadA^{28,166,245,466,516,547}.

La estabilidad de la estructura trimérica de YadA es esencial para la resistencia frente al suero y crítica para la virulencia de *Y. enterocolitica* en ratones⁴⁹⁸.

El papel de YadA como factor de virulencia en *Y. enterocolitica* está asociado a sus múltiples funciones biológicas. Por un lado, YadA promueve la adhesión e invasión de células del huésped, principalmente en la lámina propia y en la submucosa intestinal^{230,262,334,517,609}. Aunque no contribuye de manera importante en el inicio del proceso de infección^{167,423,517}. YadA es el principal factor de adhesión una vez la bacteria ha atravesado el epitelio intestinal, mediando la adherencia a células epiteliales, células fagocíticas profesionales⁴⁶⁷ y proteínas de la matriz extracelular^{172,496}. De hecho, una de las propiedades más importantes de YadA es su capacidad para unirse a moléculas de la matriz extracelular como el colágeno- α 1^{172,184,404,496,497,547} la laminina o la fibronectina^{184,495,551}. La unión al colágeno mediada por YadA es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8⁵⁴⁷.

Destacar que YadA es el principal factor de resistencia de *Yersinia* a la actividad bactericida del suero humano^{28,60,73,410,433,469}. Molecularmente, YadA se une al factor H, lo que impide la activación de la vía alternativa del complemento^{59,121,122,433}, y al regulador C4bp, que previene la activación de la vía clásica y de las lectinas del complemento²⁹³. Por consiguiente, YadA evita la formación del complejo de ataque en la membrana externa de *Y. enterocolitica*⁴³³, la opsonofagocitosis y la lisis bacteriana²⁹³. No obstante, aunque YadA medie la resistencia frente al complemento y evite la fagocitosis, al mismo tiempo hace que la bacteria sea más sensible frente a la acción de unas fibras extracelulares formadas por proteínas granulares y cromatina (NETs) que se unen a la bacteria y la eliminan^{85,110}. Esta especie de fibras son secretadas por los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs)^{110,595}.

La expresión de *yadA* está regulada por la temperatura y por el activador transcripcional VirF^{304,519,523}. La expresión de VirF a su vez está también regulada por la temperatura siendo máxima a 37°C y no se induce por debajo

de 30°C^{75,282}. Al contrario de lo que ocurre con otros genes regulados por VirF, la expresión de *yadA* no es dependiente de Ca²⁺^{75,512,516}.

4.2 Factores de virulencia codificados en el cromosoma

4.2.1 El sistema de secreción tipo III del flagelo

Además del SSTT Ysc codificado en el plásmido pYV, el sistema del flagelo de *Y. enterocolitica* codificado en el cromosoma también actúa como SSTT^{327,617}. De hecho, el flagelo bacteriano parece ser el ancestro común de todos los SSTT, de modo que varios de sus componentes estructurales están conservados en todos los SSTT conocidos^{252,327}.

El SSTT del flagelo se requiere para exportar las proteínas que forman el flagelo a la superficie de la bacteria³²⁷, aunque también secreta proteínas que intervienen en las interacciones bacteria-huésped⁶¹⁷. Un ejemplo lo constituye la fosfolipasa A (YpIA), una proteína involucrada en la virulencia y no en la motilidad⁶¹⁴. Además, el SSTT del flagelo también secreta otras proteínas denominadas Fops (del inglés “flagellar outer proteins”), cuya identidad y función aún se desconoce⁶¹⁷.

Por otra parte, la síntesis del flagelo confiere a la bacteria motilidad tipo “swimming” y tipo “swarming”^{617,618}. El posible papel de la motilidad en la patogenicidad de *Yersinia* dista mucho de estar claro. Estudios recientes han demostrado que el flagelo es esencial para la colonización de superficies abióticas y establecer un biopelícula²⁹².

Estructura y regulación de la biosíntesis del flagelo

La estructura del flagelo consta de tres componentes: (i) el cuerpo basal, estructuralmente parecido al aparato de secreción tipo III, (ii) el gancho y (iii) el filamento^{271,550,617} (**Figura 17**).

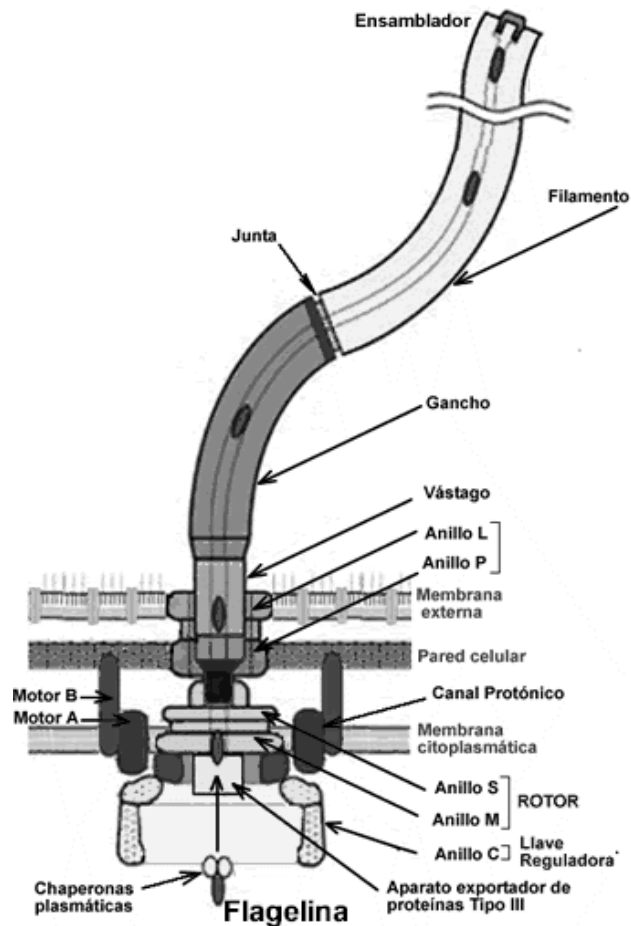


Figura 17. Elementos estructurales del sistema de secreción tipo III del flagelo.

Como en otras bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, la regulación de los genes implicados en la síntesis del flagelo y la quimiotaxis se realiza en coordinación con el ensamblaje del mismo y en respuesta a señales ambientales³²⁶. Como se ha explicado anteriormente, *Y. enterocolitica* presenta motilidad únicamente en un rango de temperatura de 21 a 29°C^{280,402}. El regulón del flagelo de *Y. enterocolitica* se expresa siguiendo una cascada de regulación en la que se activan secuencialmente los genes tipo I, tipo II y tipo III^{11,120,302}. Los genes tipo I son los que forman el operón *flhDC* y codifican el principal complejo de regulación del flagelo, FlhDC, el cual es necesario para la expresión del resto de genes del flagelo. En *Y. enterocolitica*, la transcripción de *flhDC* no está regulada por la temperatura^{46,279}. Además FlhDC tampoco interviene en la regulación mediada por la temperatura de los genes del flagelo^{279,618}. Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heteromultimérico que se une a las secuencias promotoras de los genes tipo II, activando la transcripción del operón *flhBAE*³¹⁵. Los genes tipo II codifican las proteínas

estructurales y accesorias del cuerpo basal, los componentes del gancho, FlgN requerido para el anclaje del filamento y las proteínas reguladoras FliA (σ^{28}) y FlgM^{178,260,281}. FliA es necesario para la transcripción de todos los genes tipo III^{248,279,316,407}, de algunos operones tipo II y del gen que codifica el factor anti-sigma FlgM¹¹³. La expresión de *fliA* sí está regulada por la temperatura y, así, este gen sólo se transcribe a temperaturas inferiores a 30°C^{248,279,280}. FlgM es un factor anti-sigma que limita la actividad de FliA hasta que se ha completado el ensamblaje del cuerpo basal del flagelo y el SSTT del flagelo es competente para exportar la flagelina²⁵³. Entre los genes tipo III se encuentran los del operón *fleABC*, que codifica la flagelina²⁸⁰, el gen *ylpA*, que codifica una fosfolipasa⁴⁹¹ y los que codifican componentes del motor del flagelo y proteínas quimiotácticas.

Por otra parte, recientemente se ha descrito que OmpR controla la motilidad regulando positivamente la expresión de *flhDC* a nivel transcripcional en *Y. enterocolitica* O:9⁴⁴⁴. En enterobacterias, el regulador OmpR junto con la quinasa EnvZ forman el sistema de dos componentes OmpR/EnvZ que regula la transcripción de varios genes implicados en la respuesta adaptativa ante señales ambientales¹⁶⁴. EnvZ es el sensor de cambios en la osmolaridad del medio⁴⁷⁵ el cual se autofosforila y seguidamente transfiere el grupo fosfato al efector OmpR. OmpR se une específicamente a la región promotora de *flhDC* y se especula que hay más de un sitio de unión⁴⁴⁴. Un mutante *ompR* no presenta flagelo, confirmando que OmpR es necesario para la biosíntesis del flagelo.

En el caso de *Y. enterocolitica*, la termoregulación de la síntesis del flagelo puede ser un factor importante en la patogenicidad bacteriana, puesto que la flagelina es un potente inductor de citoquinas^{349,373,452}. Por consiguiente, la represión de la expresión de flagelina a 37°C puede contribuir a la pobre respuesta inflamatoria característica de las infecciones de *Yersinia*^{71,373}.

FliA y FlhDC como reguladores de la expresión génica

En *Y. enterocolitica*, FlhD/FlhC y FliA además de su función como reguladores de la síntesis del flagelo, son reguladores globales que afectan a la expresión de un gran número de genes.

FliA además de regular positivamente los niveles de expresión de varios genes tipo III del flagelo, regula negativamente varios factores de virulencia codificados en el plásmido pYV: YadA, YscG y YscM (que forman parte del operón *virC*), el elemento de inserción altamente móvil ISYe1 (de función desconocida) y YopQ²⁴⁸ (**Figura 18**). Mientras que la regulación sobre los genes tipo III del flagelo es directa, la regulación negativa sobre estos factores de virulencia parece ser indirecta y es debida a la acción de FliA sobre VirF²⁴⁸. Además también se ha descrito que FliA induce la expresión de *inv* y *yplA*^{491,616}. (**Figura 18**).

Por su parte FlhD/FlhC afecta a los niveles de expresión de varios genes implicados en el metabolismo, en concreto los implicados en el metabolismo del nitrógeno y en el ciclo de la urea²⁷⁹. Además FlhDC inhibe la expresión de los genes *ysc* y *yop* a temperaturas inferiores a 37°C posiblemente actuando también sobre su activador transcripcional VirF⁷² y regula la síntesis de la fosfolipasa A (YplA)⁴⁹¹ (**Figura 18**).

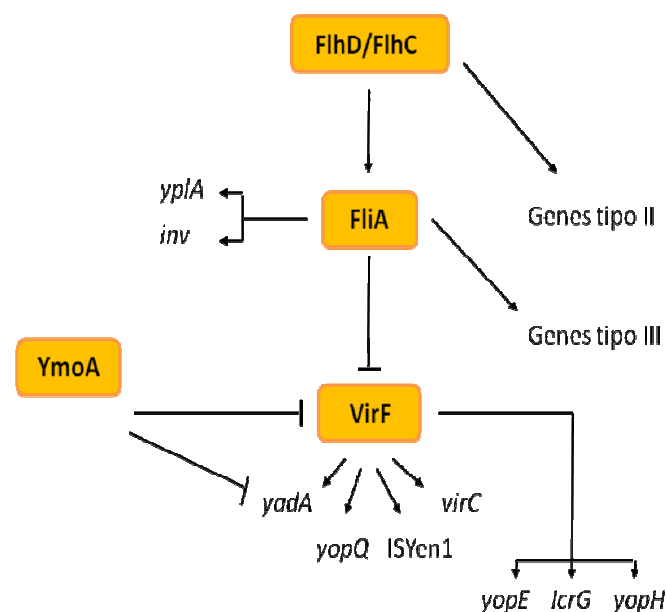


Figura 18. Modelo de regulación global en *Y. enterocolitica* incluyendo los reguladores FlhD/FlhC, FliA y YmoA²⁴⁸.

4.2.2 Fosfolipasa A

La fosfolipasa A (YplA) es una proteína extracelular de 35,5 kDa codificada por un gen tipo III del SSTT del flagelo^{490,491,617}. Todas las cepas de *Y. enterocolitica* codifican en su cromosoma el gen *yplA*, pero sólo las del biotipo 1 tienen actividad fosfolipasa⁴⁹⁰. Por su parte, ni *Y. pestis* ni *Y. pseudotuberculosis* expresan YplA⁴⁹⁰.

El locus *yplA* está formado por dos genes *yplA* y *yplB*⁴⁹⁰. El gen *yplA* codifica por la fosfolipasa A y el gen *yplB* se especula que codifica por una proteína accesoria o una chaperona necesaria para la secreción de YplA⁴⁹¹. El gen *yplA* forma parte del regulón del flagelo y se expresa de manera coordinada junto con otros genes del flagelo a 26°C⁴⁹¹. Tanto en un mutante *flhDC* como en un mutante *fliA* la expresión de *yplA* está reducida. La expresión de *yplA* se induce cuando la bacteria alcanza la fase de crecimiento exponencial y es máxima cuando el pH oscila entre 6.5-7.5⁴⁹¹. En la región promotora de *yplA* se han identificado potenciales sitios de unión de los reguladores de la expresión génica Fnr (regulador de crecimiento en anaerobiosis), Crp (proteína receptora de AMPc) y FliA (del regulón del flagelo). De hecho, la expresión de FliA es necesaria para que se de la secreción de YplA⁶¹⁷. La posible regulación por los factores citados encaja con el hecho de que la expresión de *yplA* se reduce por la aireación, la adición de glucosa y/o sacarosa, por niveles elevados de sales y por la temperatura⁴⁹¹.

En el modelo de infección oral de ratón, un mutante *yplA* no coloniza las placas de Peyer ni los nódulos linfáticos mesentéricos tan eficazmente como la cepa silvestre. Por lo tanto, YplA podría mediar la colonización de tejidos por diferentes vías. Por una parte, la actividad fosfolipasa podría provocar la rotura de membranas de células del tejido intestinal lo cual facilitaría la penetración y supervivencia de la bacteria en el tejido intestinal. Perturbando la membrana de los macrófagos dificulta una respuesta inmune eficaz, con lo que otra función de YplA sería modular la respuesta inflamatoria. Por otro lado, la fosfolipasa podría promover el crecimiento bacteriano mediante el aporte de nutrientes en forma de ácidos grasos para la biosíntesis o el metabolismo celular^{55,490}.

4.2.3 El sistema de secreción tipo III Ysa

El SSTT denominado Ysa (del inglés “*Yersinia* secretion apparatus”) está codificado en la isla de patogenicidad Ysa (IP-Ysa) que se encuentra únicamente en el cromosoma de las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B^{185,224,554}. *In vitro* la expresión del SSTT Ysa se induce a 26°C, pH neutro/básico y elevada concentración de NaCl^{224,572}. En el modelo de infección oral de ratón, La DL₅₀ de un mutante *ysa* es 10 veces mayor que aquella de la cepa silvestre y parece que este sistema es necesario durante las fases iniciales de la infección^{224,572}.

El SSTT Ysa secreta los efectores denominados Ysp (YspA, YspE, YspF, Yspl, YspK, YspL, YspM, YspP). Cada uno de ellos es necesario para la virulencia de *Y. enterocolitica* biotipo 1B, aunque para la mayoría no se conocen ni las dianas celulares ni el efecto que median^{186,343,600}. No obstante, se ha especulado acerca de la función de determinadas Ysp basándose en la presencia de determinados dominios de función conocida en otras proteínas o en el grado de similitud con efectores de otros SSTT^{343,345}. Curiosamente, este sistema también parece secretar algunas de las Yops efectoras del SSTT Ysc, en concreto YopE, YopN y YopP^{186,613}.

El SSTT Ysa está regulado por el sistema de dos componentes YsrS/YsrR (localizado en la parte más distal del *locus ysa*) a través de YsaE/SycB y por RcsB^{572,582}. El sensor YsrS es necesario para la expresión del promotor de *ysaE* y esta activación es dependiente de NaCl. A su vez, YsaE y la chaperona SycB son necesarias para controlar la transcripción de genes *ysa* y *ysp* del SSTT Ysa⁵⁸³.

Algunos de los genes que codifican para las proteínas Ysp se localizan en la IP-Ysa, mientras que otros están dispersos en el cromosoma³⁴³. La chaperona SycP, necesaria para la secreción y translocación de YspP (PTPasa) está codificada en la IP-Ysa y también es secretada por el SSTT Ysa³⁴⁴.

4.2.4 El sistema de secreción tipo II

Las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B poseen un sistema de secreción tipo II (SST2), llamado Yst1, codificado en una región del cromosoma llamada “región de plasticidad”. Varios factores de virulencia se encuentran en esta región incluyendo una región similar a la isla de patogenicidad YAPI de *Y. pseudotuberculosis* y el SSTT Ysa, descrito anteriormente^{265,554}. Análisis posteriores indicaron que *Y. enterocolitica* posee un segundo SST2, denominado Yst2, que difiere significativamente de Yst1²⁶⁵. Es probable que Yst2 no esté implicado en la virulencia de *Y. enterocolitica*, puesto que también está presente en las cepas consideradas avirulentas²⁶⁵. No obstante, Yst1 sí es necesario para la virulencia de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B en el modelo de infección oral de ratón. Un mutante deficiente en este sistema es 100 veces menos virulento que la cepa silvestre y presenta dificultades para la colonización del hígado y el bazo, pero no para la colonización de las placas de Peyer. Así, el sistema Yst1 parece ser más importante para la diseminación de la bacteria que para la colonización inicial del tejido linfoide. Yst1 no contribuye a la virulencia si la ruta de infección es intravenosa²⁶⁵.

4.2.5 Ail

Ail es una proteína de 17 kDa localizada en la membrana externa. Pertenece a la familia OmpX, cuya estructura se caracteriza por presentar ocho dominios transmembrana y cuatro bucles extracelulares^{180,368,435}. Generalmente, las proteínas de esta familia se caracterizan por promover la invasión de las células, la resistencia al sistema del complemento, la supervivencia en macrófagos y la internalización en células epiteliales¹²⁷.

Ail está codificada en el cromosoma de todas las especies patógenas de *Yersinia* lo que sugiere que tiene un papel en la patogenicidad. No obstante, Ail no es necesaria para establecer la infección ni para provocar una infección sistémica^{370,580}. Diferentes autores han descrito que la cadena O del LPS puede enmascarar Ail^{60,73}. De hecho, alteraciones en la estructura del LPS parecen tener efectos dramáticos en la expresión, exposición en la superficie o en la actividad de Ail^{33,46,431}.

La expresión de *ail* está regulada por la temperatura y la fase de crecimiento⁴³². Además su expresión está afectada por la tensión de oxígeno⁴¹⁷. En *Y. enterocolitica*, Ail sólo se expresa a 37°C y ejerce funciones importantes para la diseminación extracelular. Por una parte, Ail es un factor de adhesión e invasión de células del huésped, aunque no sea necesaria para establecer la infección^{367-369,580}. Por otra parte, Ail confiere a la bacteria resistencia al complemento^{59,73,367,432,580}. Así, Ail inhibe la activación de las vías del complemento uniéndose al regulador de la vía clásica C4bp^{73,293} y al inhibidor de la vía alternativa, el factor H^{59,121}. Sin embargo, esto sólo es cierto cuando Ail no está bloqueada por la cadena O del LPS lipopolisacárido o el núcleo externo^{58,293}.

4.2.6 Invasin

Invasin (Inv) es el principal factor que emplea *Y. enterocolitica* para atravesar la barrera intestinal⁴²². Inv está codificada por el gen *inv* presente en el cromosoma de las tres especies patógenas de *Yersinia*, aunque sólo se expresa en las cepas patógenas de *Y. enterocolitica* y en *Y. pseudotuberculosis*^{264,340}. En *Y. pestis* está inactivado por una mutación⁵⁰⁶. Inv es una proteína de membrana externa de 92-103 KDa, formada por cinco dominios globulares que se proyectan hacia el exterior de la membrana externa²²⁵. El extremo N-terminal se localiza en la membrana externa de la bacteria, mientras que el dominio C-terminal está expuesto en la superficie y media la unión a las integrinas-1 β que se expresan en la superficie apical de las células M^{129,225,263,311}. Por lo tanto, Inv tiene como función principal mediar la adhesión e invasión del epitelio intestinal, a través de las células M, para que la bacteria alcance las placas de Peyer^{128,261,369,422}.

Inv es importante en las primeras fases del proceso de infección. Un mutante *inv* tarda más tiempo que la cepa silvestre en colonizar eficientemente las placas de Peyer⁴²². La eventual colonización por el mutante *inv* es debida a la expresión de YadA⁴²³. En cualquier caso, las DL₅₀ de un mutante *inv* y la cepa silvestre no son significativamente diferentes, tanto en infección oral como intraperitoneal⁴²².

La expresión de *inv* está regulada por la temperatura, el pH, la osmolaridad y la fase de crecimiento. *In vitro*, la expresión máxima de *inv* ocurre a 23°C y pH 8.0, o bien a 37°C y pH 5.5, en el inicio de la fase estacionaria⁴¹⁹. En *Y. enterocolitica*, el activador transcripcional RovA y el complejo inhibidor H-NS-YmoA controlan la expresión de *inv* en respuesta a señales ambientales^{170,398,458}.

RovA (del inglés “regulator of virulence A”) comparte un 77% de similitud con el regulador transcripcional SlyA de *Salmonella*⁴⁵⁸. Pertenece a la familia de reguladores transcripcionales MarR/SlyA, los cuales engloban toda una serie de proteínas con varias funciones reguladoras. Están implicados en diversos procesos fisiológicos y juegan un papel importante en la adaptación de la bacteria al ambiente, en la virulencia y en la supervivencia en el huésped^{387,553}.

En el modelo de infección oral de ratón, un mutante *rovA* de *Y. enterocolitica* es menos virulento que la cepa silvestre o que un mutante *inv*. Además, un mutante *rovA* no coloniza los tejidos más profundos comparado con la cepa silvestre o el mutante *inv*, lo que sugiere que RovA regula directa o indirectamente la expresión de otros factores de virulencia, además de *Inv*^{161,458}. Estos otros factores de virulencia podrían estar implicados en eventos post-invasión así como en la iniciación de la inflamación en las placas de Peyer¹⁶¹. RovA está sobre todo implicado en la invasión, colonización y supervivencia de la bacteria en el tejido linfoide ya que si la ruta de infección en ratón es intraperitoneal, el mutante *rovA* no es tan atenuado como si la ruta de infección es oral¹⁶¹.

Para activar la expresión de *inv*, RovA se une a dos secuencias ricas en AT de la región promotora de *inv*^{240,387}. RovA también activa su propia transcripción uniéndose a secuencias específicas de su región promotora³⁸⁷. La coordinación de la expresión de *rovA* e *inv* no es debida al efecto directo de señales ambientales sobre la expresión del promotor de *rovA*, sino que existen mecanismos post-transcripcionales que controlan la síntesis de RovA en función de la temperatura, concentración de nutrientes y fase de crecimiento³⁸⁷. Así, y en *Y. pseudotuberculosis*, se demostró que RovA sufre un cambio

conformacional cuando la temperatura pasa de 25°C a 37°C lo que supone una reducción de su capacidad para unirse al ADN y un aumento de su susceptibilidad para ser degradada por las proteasas Lon y ClpP²³⁶. Por lo tanto, los niveles de RovA en la bacteria dependen de una proteólisis regulada por la temperatura.

Por otra parte, H-NS (del inglés “histone-like nucleoid structure protein”) inhibe la transcripción de los genes *rovA* e *inv*. Esta proteína asociada al nucleoide, actúa generalmente como represor global de la transcripción en bacterias Gram negativas y está implicada en la regulación de la expresión génica en respuesta a señales ambientales. Aunque H-NS se une de manera inespecífica al ADN, reconoce y se une preferentemente a dos secuencias diana ricas en AT y que presentan una curvatura intrínseca^{160,394,542,552}. La evidencia indica que después de la unión de H-NS a las secuencias diana, se produce una oligomerización. Se genera un bucle de ADN uniendo las dos dianas. En consecuencia de la formación de este complejo núcleo-proteico, se bloquea la unión de la ARN polimerasa y la expresión de los genes se ve afectada^{160,462}. Regiones de este tipo están presentes en los promotores de *inv* y *rovA* por lo que los sitios de unión de RovA y H-NS están superpuestos en estas regiones promotoras²⁴⁰. La acción represora de H-NS está reforzada por la formación de heterómeros con proteínas de la familia Hha-YmoA formando un complejo represor^{138,170,171,328,398,399}. En *Y. enterocolitica* O:8, *hns* es un gen esencial por lo que su mutación es letal para la bacteria^{170,426}.

Así, para activar la transcripción de estos genes a temperatura ambiente, RovA debe expresarse en un nivel suficiente para poder desplazar a H-NS y unirse a la región promotora de *inv* y *rovA* con el fin de interactuar con la ARN polimerasa^{170,240,559}. Sin embargo, a 37°C el complejo H-NS-YmoA inhibe la expresión de ambos genes (**Figura 19AB**). En *Y. enterocolitica* la expresión de *rovA* también está regulada por RovM, una proteína de la familia tipo LysR³⁰⁶. Además de RovM, H-NS y RovA como reguladores de la expresión de *rovA* en *Y. enterocolitica*, Lawrenz y colaboradores³⁰⁶ describieron que LeuO regula positivamente la expresión de *rovA*. Se desconoce si la regulación es a través de la interacción directa de LeuO y la región promotora de *rovA* o bien si LeuO modula otro regulador³⁰⁶.

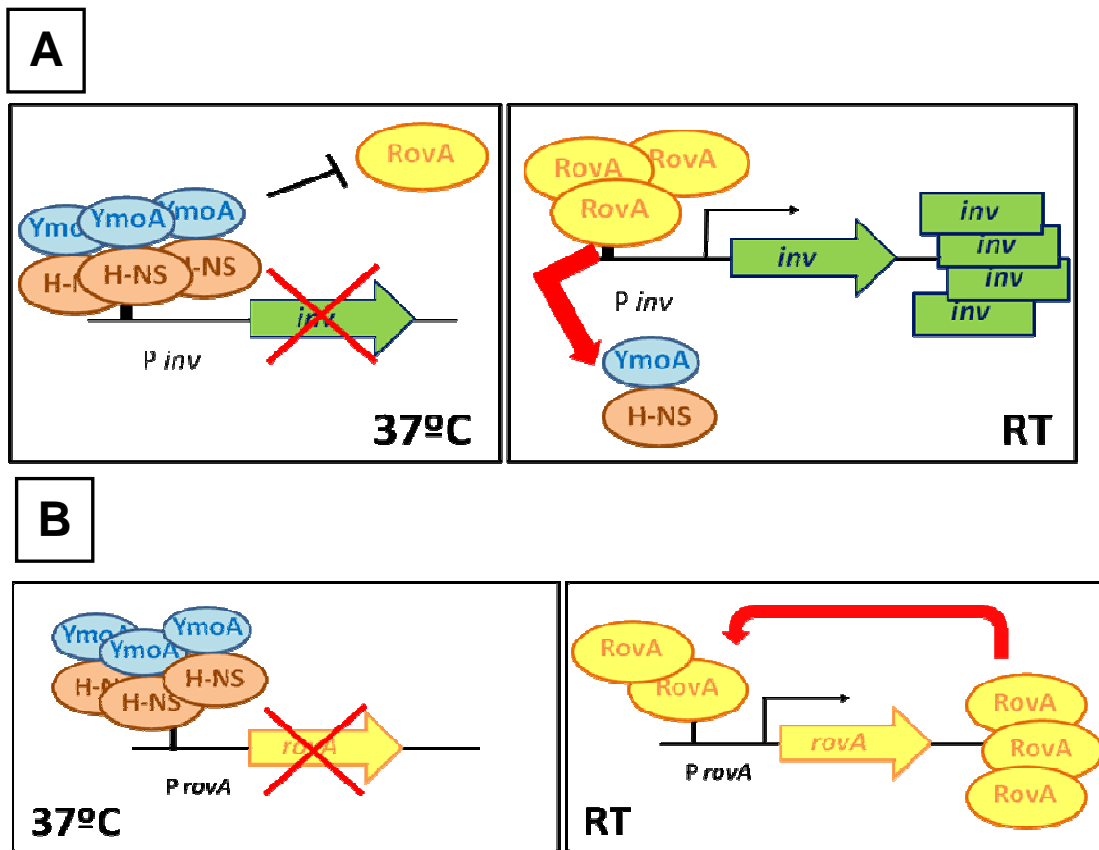


Figura 19. Modelo de la regulación por la temperatura de *inv* (A) y *rovA* (B)

Aunque el gen *rovA* está altamente conservado en las tres especies de *Yersinia*, la inspección de las regiones promotoras, reveló que el promotor de *Y. enterocolitica* O:8 diverge bastante. El gen *rovA* de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* tiene dos promotores, en cambio *Y. enterocolitica* tiene tres³⁰⁶. En *Y. pseudotuberculosis* RovA activa la transcripción de *inv* de la misma manera que en *Y. enterocolitica*^{170,240,388}. Un mutante *rovA* de *Y. pseudotuberculosis* invade las células con menor eficiencia que la cepa silvestre en ensayos *in vitro* y presenta una virulencia atenuada en el modelo de ratón de infección oral⁴⁵⁸. Por otra parte, se describió en *Y. pseudotuberculosis* que RovM también regula la transcripción de *rovA*²³⁹. RovM interacciona con una zona reguladora entre el promotor 1 y el promotor 2 de *rovA* y junto con H-NS, inhibe su expresión²³⁷⁻²³⁹. La mutación del gen *rovM* provoca un aumento en la expresión de RovA e invasinas, así como un aumento de la internalización de *Y. pseudotuberculosis* en las células huésped.

En *Y. pestis*, que no expresa Inv, RovA es fundamental para el establecimiento de la peste bubónica y neumónica ya que controla la expresión del *locus psa*, que codifica una estructura tipo fimbria en la superficie de la bacteria con propiedades de adhesión, propiedades antifagocíticas²⁵⁰ y que está implicada en la virulencia de la bacteria^{111,191}. Su homólogo en *Y. enterocolitica* es el *locus myf*²⁵⁸ que también parece estar regulado por RovA (Bengoechea, comunicación personal).

4.2.7 Ureasa

Las ureasas son metaloenzimas que catalizan la hidrólisis de urea a ácido carbónico y amonio. El efecto neto de estas reacciones es un aumento del pH del medio. Estas enzimas están presentes en multitud de organismos y su principal función es la de contribuir al metabolismo del nitrógeno³⁷⁴.

La actividad ureasa está codificada en el *locus ure* del cromosoma de las tres especies patógenas de *Yersinia*. Aunque este *locus* presenta una baja variabilidad genética entre las diferentes especies, la ureasa sólo está implicada en la patogenicidad de *Y. enterocolitica*^{152,463,499},¹⁵³. La ureasa es necesaria para la virulencia de *Y. enterocolitica* en el modelo de infección oral de ratón y en el modelo de infección intravenosa en rata²⁰⁸. El papel de la ureasa como factor de virulencia en *Y. enterocolitica* es el de proteger a la bacteria y potenciar su supervivencia durante el paso por el estómago donde se encuentra con un ambiente ácido. Presuntamente lo hace neutralizando los iones de hidrógeno que penetran la membrana bacteriana. También facilita la supervivencia en los ambientes ácidos que encuentra la bacteria a lo largo del proceso de infección, como el interior del fagosoma de macrófagos, de leucocitos polimorfonucleares u otras células del huésped^{152,615}.

En *Y. enterocolitica*, la ureasa tiene una alta actividad en condiciones de pH ácido y una baja actividad en condiciones de pH neutro. No obstante, a pHs ácidos la ureasa requiere de la integridad de la membrana para funcionar correctamente⁶¹⁵. Este control de la actividad enzimática por el pH permite su adaptación a cambios bruscos de pH, como ocurre cuando la bacteria atraviesa

el estómago. Su actividad óptima se da a un pH de 3,5-4,5, lo cual se ajusta a su función fisiológica de protección de la bacteria frente a ambientes ácidos^{150,615}. Este rango de pH es significativamente más ácido que para otras ureasas bacterianas.

In vitro, su expresión está regulada por la fase de crecimiento y la temperatura, siendo máxima en la fase estacionaria y superior a 25 que a 37°C^{150,279}. La inducción de la expresión de la ureasa a bajas temperaturas se ha relacionado con la necesidad de factores de virulencia en fases tempranas del proceso de infección^{152,153}.

Por otra parte, la subunidad β del centro catalítico de la ureasa (UreB) ha sido considerada por algunos autores como un factor inductor de artritis reactiva en las infecciones de *Y. enterocolitica*^{358,514}. No obstante, Gripenberg-Lerche y colaboradores indican que dicha subunidad no está implicada en la inducción de artritis en aquellas ratas infectadas por vía intravenosa²⁰⁸.

4.2.8 La isla de alta patogenicidad

La captación de hierro es un requerimiento esencial para la mayoría de microorganismos. De hecho, la patogenicidad de las bacterias depende de su capacidad para captar hierro, puesto que en los mamíferos este metal se encuentra unido a proteínas eucariotas y, por consiguiente, los niveles de hierro libre son muy bajos. Las especies más patógenas de *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* serotipo I y *Y. enterocolitica* biotipo 1B) codifican una isla de alta patogenicidad de 36-43 kb en su cromosoma, cuya función principal es la captación de hierro^{92,105,450}. Esta isla de alta patogenicidad está ampliamente distribuida en enterobacterias como *E. coli*, *Klebsiella* y *Citrobacter*^{36,494}.

La isla de alta patogenicidad consta de una región conservada entre las diferentes especies patógenas de *Yersinia* y una región variable, rica en AT, de función desconocida^{449,450}. La región conservada es de unas 30 kb y comprende genes implicados en la síntesis, transporte y regulación del sideróforo yersiniabactin (Ybt) y el gen que codifica para la integrasa de la isla de patogenicidad^{38,93,183,221,418,449}. Los genes del *locus ybt* están regulados

negativamente por el complejo Fur-Fe²⁺^{106,232,536} y positivamente por el activador transcripcional YbtA, codificado en la isla de alta patogenicidad y que se activa por la unión del complejo Ybt-Fe^{15,83,182}.

Aunque la isla de alta patogenicidad no es el único *locus* que codifica para sistemas de captación de hierro en las especies patógenas de *Yersinia*, sí es el único implicado en su virulencia^{202,221,232}.

4.2.9 El sistema Psp

Las bacterias Gram negativas han desarrollado diferentes sistemas de respuesta a situaciones de estrés de membrana para mantener la integridad de la envoltura bacteriana¹⁴⁸. En el cromosoma de *Y. enterocolitica* están codificados los sistemas de estrés extracitoplasmático Cpx, RpoE y Psp (“phage-shock-protein”), siendo este último el único esencial para su virulencia^{104,147,242,346}.

La expresión del sistema Psp se induce de manera específica por la deslocalización de secretinas^{147,320,346}. Las secretinas son una familia de proteínas oligoméricas que forman poros en la membrana externa¹⁹⁵ y deben asociarse a lipoproteínas para alcanzar su ubicación correcta en la membrana²²⁹. Las secretinas están implicadas en la formación de los sistemas de secreción tipo II y III, en la biogénesis de *pilus* tipo IV y en la extrusión del fago filamentoso¹⁹⁵. Otros factores que pueden desencadenar la activación del sistema Psp son condiciones extremas de temperatura u osmolaridad, tratamientos con etanol, la presencia de ionóforos, incubación en fase estacionaria con pH alcalino, inhibición de la secreción de proteínas o de la síntesis de ácidos grasos^{148,375}. Todos estos factores explicados hasta el momento, tienen un efecto común que es la disipación del gradiente electroquímico de la membrana, aunque no está totalmente demostrado en todos los casos^{54,86,594}. Por lo tanto probablemente lo que induce la activación del sistema Psp es la disipación de dicho gradiente²⁹⁵.

En *Y. enterocolitica*, el sistema Psp está codificado en dos *loci* no adyacentes en el cromosoma, *pspF-pspABCDycjXF* y *pspG*. El sistema Psp está formado por proteínas localizadas en la membrana interna que interaccionan con proteínas del citoplasma para comunicar la presencia de un estrés extracitoplasmático. La regulación de la expresión de los promotores *pspA* y *pspG* es compleja, dependiendo de interacciones proteína-proteína y del activador transcripcional PspF^{3,295}. En condiciones normales, PspF está inhibido por la interacción directa con PspA^{163,168}. Las proteínas PspB y PspC son proteínas integrales de la membrana citoplasmática necesarias para la inducción de la expresión de los genes *psp* en respuesta a la reducción del gradiente electroquímico y/o la deslocalización de secretinas^{3,347,593}. Tras una perturbación en la envoltura, PspB y PspC se unen a PspA, lo que se traduce en la liberación de PspF para activar la transcripción génica²⁷⁴. PspA parece contribuir a restablecer el gradiente electroquímico asociándose a la membrana después de la inducción del sistema Psp²⁹⁵. PspG parece ser también una proteína efectora, aunque su función es aún desconocida^{204,272,320}.

El sistema Psp es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* en el modelo de infección oral de ratón^{146,147}. El hecho de que las secretinas sean un componente esencial de los SSTT explicaría, al menos en parte, la importancia del sistema Psp en la virulencia de *Y. enterocolitica*¹⁴⁷.

4.2.10 La enterotoxina Y-STa

La producción de enterotoxina es una característica importante en la virulencia de muchos enteropatógenos. Y-STa (del inglés “**Yersinia** stable toxin”) es una enterotoxina termoestable codificada en el cromosoma de las cepas patógenas de *Y. enterocolitica*¹⁵⁵. Esta enterotoxina es una proteína de 30 aminoácidos que proviene del procesamiento de un polipéptido de mayor tamaño¹⁵⁵. La organización y el centro activo de la proteína Y-STa son muy similares a los de la enterotoxina termoestable STa de *E. coli*¹⁵⁵. La expresión de la enterotoxina Y-STa está regulada por la temperatura³⁶². *In vitro*, su máxima expresión se alcanza a temperaturas de entre 20-25°C y durante la entrada en fase estacionaria. A 37°C su expresión está inhibida a menos que la

bacteria crezca en condiciones de elevada osmolaridad o pHs elevados, condiciones que se dan en el íleon³⁶². YmoA participa en la represión de *yst* y en la regulación por la temperatura y la fase de crecimiento³⁶².

Las cepas consideradas avirulentas de *Y. enterocolitica* (biotipo 1A) producen una enterotoxina denominada Y-STb que se expresa únicamente a 37°C y en las condiciones de pH del íleon⁵⁰⁸. Aunque dichas cepas son consideradas avirulentas, Y-STb es el principal factor implicado en brotes de diarrea asociados a infecciones alimentarias y nosocomiales causadas por estas cepas^{97,205,206,508}. Por lo tanto, Y-STb puede ser un factor de virulencia determinante para *Y. enterocolitica* biotipo 1A⁵⁰⁸. Finalmente, ni *Y. pseudotuberculosis* ni *Y. pestis* producen ninguna enterotoxina^{411,412}.

Como se ha descrito anteriormente, la infección de *Y. enterocolitica* en humanos da lugar a gastroenteritis con episodios de diarrea, fiebre y dolor abdominal^{77,140}. Aunque el modelo de infección oral de ratón refleja el progreso de la infección en humanos¹⁰⁸, los brotes de diarrea no ocurren y sólo se observan en la infección de conejos jóvenes. Delor y colaboradores¹⁵⁴ demostraron que la enterotoxina Y-STa es el factor de virulencia responsable de la diarrea, puesto que la incidencia de diarrea, pérdida de peso y mortalidad asociada a deshidratación no ocurrió en los conejos inoculados con un mutante deficiente en *yst* en el modelo de infección oral de conejos jóvenes

Y-STa, al igual que STa de *E. coli*, estimula la actividad guanilato ciclasa a nivel del intestino e induce la acumulación de fluido debido al aumento de los niveles de guanósín monofosfato cíclico (cGMP) en las células del epitelio intestinal de ratones y conejos^{257,453}. Además, Y-STa regula las señales de calcio que modulan eventos celulares tanto en el núcleo como en el citoplasma de enterocitos de rata. Parece que esta regulación del calcio intracelular podría ser responsable de los efectos de la enterotoxina en el huésped^{478,479}.

4.3 LPS: cadena O y lípido A como factores de virulencia

4.3.1 Cadena O

La mayoría de las cadenas O de los LPSs de *Yersinia* presentan una estructura heteropolimérica. Únicamente *Y. enterocolitica* O:3 y *Y. enterocolitica* O:9 tienen cadenas O homopoliméricas, compuestas por 6-deoxi-L-altrosa y por N-formil-perosamina, respectivamente^{107,385}. La cadena O de *Y. enterocolitica* O:8 (YeO8) está formada por un polisacárido que contiene entre siete y diez unidades repetidas de un pentasacárido^{47,621}. *Y. pseudotuberculosis* presenta un reducido número de azúcares unidos al núcleo por lo que a este LPS se le denomina lipooligosacárido (LOS). Los azúcares que lo componen son derivados de 3,6-dideoxihexosa⁴⁸³. *Y. pestis* carece de cadena O, teniendo un LPS rugoso^{116,440,441}.

En la mayoría de las especies de *Yersinia* los genes necesarios para la síntesis de las cadenas O heteropoliméricas se encuentran agrupados entre los genes *hemH* y *gsK* del cromosoma⁵¹³. Las cepas que expresan cadenas O homopoliméricas, entre los genes *hemH* y *gsK* se encuentran los genes necesarios para la síntesis del núcleo externo⁵²². En estas cepas los genes de la cadena O también están agrupados, pero localizados en otro sitio del genoma. En caso de *Y. enterocolitica* O:3, los 8 genes necesarios para la síntesis de la cadena O (*wbbX*, *wbbW*, *wbbV*, *wzt*, *wzm*, *wbbU*, *wbbT*, *wbbS*) se encuentran entre los genes anotados como Y11_16701 (transposasa) y Y11_16791 (ORF 0.67)^{37,457,622}. El serotipo O:9 de *Y. enterocolitica* tiene los 6 genes (*manC*, *manB*, *galV*, *galF*, *gmd*, *per*) localizados entre los genes anotados como YE105_C1499 (proteína hipotética) y YE105_C1506 (permeasa, sistema de transporte de LPS)^{515,590}.

Un aspecto importante de la cadena O de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* es que su expresión está regulada por la temperatura, al igual que ocurre con muchos otros factores de virulencia de las especies de *Yersinia*. Cuando la bacteria crece a temperatura ambiente (21-26°C) produce mayor cantidad de cadena O y de mayor longitud que a 37°C, temperatura a la cual sólo presenta pequeñas trazas de polisacárido^{9,47}.

El papel de la cadena O como factor de virulencia ha sido abordado en diferentes estudios. Nuestro grupo ha demostrado la importancia que tiene la cadena O *Y. enterocolitica* O:8 en la virulencia en diferentes modelos animales^{46,390,623}. En el modelo de infección de ratón, un mutante que no expresa la cadena O es 100 veces menos virulento que la cepa silvestre si la ruta de infección es oral, 1000 veces menos si la ruta de infección es intraperitoneal y 100 veces menos virulento que la cepa silvestre si la ruta de infección es intravenosa. Esto indica que la cadena O del LPS es importante tanto en los primeros estadios de la infección como en la fase de colonización de los órganos internos del huésped⁶²³. En otros dos modelos animales, conejos y cerdos, un mutante que no expresa la cadena O también es menos virulento que la cepa silvestre^{389,390}. La importancia de la cadena O como factor de virulencia de *Y. enterocolitica* serotipo O:8 ha sido corroborada por otros autores. En un estudio empleando STM, Darwin y Miller encontraron que el 23% de los mutantes atenuados tenían inserciones en el operón de la cadena O¹⁴⁶. En el caso del serotipo O:3 de *Y. enterocolitica* la cadena O y el núcleo externo del LPS también son esenciales para la virulencia. La DL₅₀ del mutante que no expresa la cadena O tras una infección oral en ratón es 100 veces mayor que la DL₅₀ de la cepa silvestre, mientras que la DL₅₀ del mutante del núcleo externo es 1000 veces mayor que aquella de la cepa silvestre^{10,521}. Además, en este serotipo la cadena O juega un papel importante en la resistencia al sistema del complemento^{10,60,520}. En *Y. pseudotuberculosis* la cadena O también parece ser esencial para la virulencia. Utilizando la técnica de STM, Meccas y colaboradores³⁵¹ hallaron que el 15% de los mutantes atenuados tenían inserciones en el operón de la cadena O.

Sin embargo, el papel específico que ejerce la cadena O en la virulencia de *Y. enterocolitica* es aún desconocido. La cadena O podría jugar un papel directo en la virulencia protegiendo la bacteria de los mecanismos de defensa del huésped. En otros patógenos, la cadena O está involucrada en la resistencia al complemento y a los PAs⁸⁰.

Por otro lado, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de la cadena O está coordinada con la expresión de otros factores de virulencia de *Yersinia*⁴⁶. Así, un mutante de YeO8 que no expresa la cadena O no expresa

Ail, la función de YadA está alterada, tiene la expresión de *inv* disminuida y sobreexpresa el operón de regulación del flagelo *flhDC* con el subsiguiente incremento en la expresión de YpIA⁴⁶. En la actualidad sólo se puede especular sobre el efecto que tiene el aumento de la expresión de *flhDC* en la virulencia de *Yersinia*. Esto es incluso más difícil debido a que la naturaleza del SSTT del flagelo es poco conocida y a que *flhDC* regula otros sistemas además del flagelo²⁷⁹. En otro estudio realizado por nuestro grupo, se analizó la expresión y funcionalidad del sistema tipo III de secreción codificado en el plásmido pYV en un mutante rugoso⁴²⁶. La ausencia de cadena O regula negativamente la transcripción de *virF* lo que se traduce en una menor secreción de Yops *in vitro*⁴²⁶. Molecularmente, se demostró que en el mutante rugoso H-NS se encuentra sobreexpresado lo que causa el aumento de la expresión de *flhDC*. Y son esos niveles anormalmente elevados de *flhDC* los responsables de la menor secreción de Yops.

4.3.2 Lípido A

Se han llevado a cabo varios análisis de la estructura del lípido A en *Y. enterocolitica*. Según Rebeil y colaboradores⁴⁵⁵, el lípido A de *Y. enterocolitica* crecida a 21°C es principalmente hexaacilado, constituido por la molécula lípido IV_A modificada con un grupo C12 y un grupo C16:1. También aparece una forma tetraacilada, compuesta por una forma triacilada modificada con un grupo C16:1 o C14 (**Figura 20**). A 37°C el lípido A de *Y. enterocolitica* presenta una forma tetraacilada pero en este caso formada mayoritariamente por un lípido A triacilado modificado con un grupo C14 (**Figura 20**). Por lo tanto, estos estudios demuestran que la expresión del lípido A está regulada por la temperatura⁴⁵⁵. Estos resultados fueron corroborados posteriormente por Oertelt y colaboradores⁴⁰⁶.

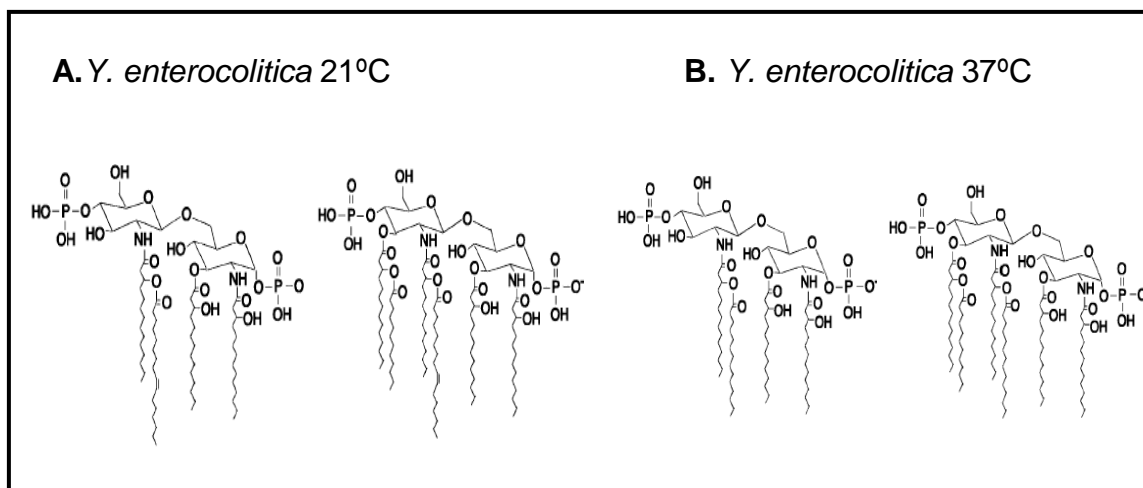


Figura 20. Estructura química de los lípidos A de *Y. enterocolitica* obtenidos por Rebeil y colaboradores⁴⁵⁵: Lípido A extraído de *Y. enterocolitica* crecida a 21°C (**A**) y a 37°C (**B**).

Nuestro grupo⁴²⁵ también llevó a cabo el análisis de la estructura del lípido A de YeO8. Los resultados mostrados en la **Figura 21A** indican que el lípido A de YeO8 crecida a 21°C contiene predominantemente una estructura hexaacilada (masa/carga m/z 1823) formada por dos glucosaminas, dos grupos fosfato, cuatro ácidos grasos principales 3-OH-C14, dos de ellos acilados con un C12 y un C16:1, resultados que concuerdan con los de Rebeil y colaboradores⁴⁵⁵. No obstante, también aparece otro pico menos abundante que corresponde a una forma hexaacilada (m/z 1797) pero con un C14 en lugar de un C16:1. También se detectó una forma tetraacilada (m/z 1414) formada por tres ácidos grasos principales y un C16:1. Por último, a 21°C presenta otros dos picos que son consistentes con la adición de L-Ara4N (m/z 1964) ó C16 (m/z 2053) a la estructura hexaacilada. Por otro lado, a 37°C (**Figura 21B**), YeO8 presenta un lípido A mayoritariamente tetraacilado, formado por tres ácidos grasos principales 3-OH-C14 y un C14 (m/z 1388). Además, presenta otro pico minoritario correspondiente a una forma hexaacilada (m/z 1797). Más aún, en este trabajo se demostró que en YeO8 las aciltransferasas LpxM (MsbB), LpxL(htrB) y LpxP son las responsables de añadir al lípido IV_A un C12, C14 y C16:1, respectivamente. A pesar de la similitud de estas aciltransferasas con las de *E.coli*⁴⁴⁸ en YeO8 LpxM (MsbB) añade C12 y LpxL (htrB) añade C14, al revés que en *E.coli*. Además nuestro grupo también demostró que estas aciltransferasas están reguladas por la temperatura. Así, la expresión de *lpxM* (*msbB*) y *lpxP* es superior a 21°C que a 37°C mientras que la expresión

de *lpxL* (*htrB*) es más elevada a 37°C que a 21°C. Esto concuerda con las estructuras de lípido A analizadas. Señalar que la única estructura no explicada a nivel molecular es la formada por tres ácidos grasos principales 3-OH-C14 y un C14 (*m/z* 1388), también descrita por Rebeil y colaboradores⁴⁵⁶.

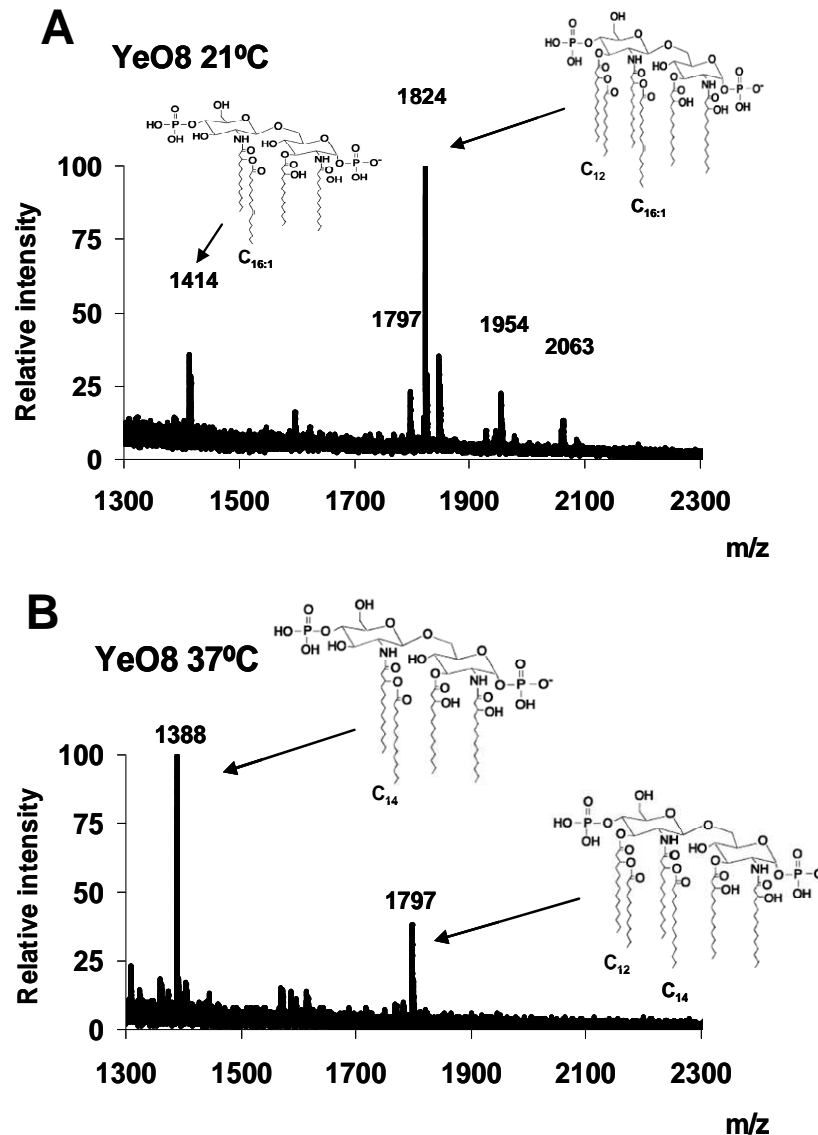


Figura 21. Estructura del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 crecida a 21°C **(A)** y crecida a 37°C **(B)** analizada por MALDI-TOFF⁴²⁵.

Existen pocos trabajos en los que se estudie el papel del lípido A en la virulencia de *Yersinia*. Anisimov y colaboradores¹⁷ construyeron un mutante *lpxM* en la cepa silvestre de *Y. pestis* y en una cepa atenuada utilizada como vacuna (EV). Al infectar ratones, el mutante *lpxM* construido en el fondo genético de la cepa silvestre no mostraba cambios significativos en cuanto a DL₅₀. En cambio, el mutante *lpxM* de la cepa atenuada era menos virulento.

Esta reducción en la virulencia fue debido a que el mutante *lpxM* sintetizaba un lípido A menos tóxico. Además con la mutación *lpxM* se obtenía una vacuna con una menor reactividad y una mayor inmunogenicidad. Por lo tanto, modificar el estado del lípido A puede ser útil para la síntesis de vacunas. Nuestro grupo⁴²⁵ demostró que la aciltransferasa LpxL(HtrB) juega un papel importante en la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8. En una infección oral de ratón, un mutante *lpxL (htrB)* fue menos virulento que la cepa silvestre. Así, este mutante no colonizó eficientemente las placas de Peyer ni se diseminó a los órganos internos. En el momento presente no se conocen las causas exactas de la atenuación de este mutante y no se puede descartar que la expresión de algunos factores de virulencia esté afectada. No obstante, la expresión y funcionalidad del SSTT no estaban alteradas en este mutante⁴²⁵.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Como se ha explicado en la introducción (apartado 3.3), la temperatura regula la expresión de la mayoría de los factores de virulencia de *Y. enterocolitica*^{335,544}. Más aún, varios estudios indican que *Yersinia* modifica su lípido A en función de la temperatura de crecimiento^{24,42,455,456} y así ha sido demostrado por nuestro grupo en el caso de *Y. enterocolitica* O:8⁴²⁵

Una de las características más relevantes del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 es la detección de especies modificadas con aminoarabinosa o palmitato únicamente a 21°C. Dado que estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que *Y. enterocolitica* es más resistente a la polimixina B a 21°C que a 37°C⁴⁴, en este trabajo nos planteamos que: las modificaciones del lípido A que presenta *Y. enterocolitica* O:8 están ligadas a la resistencia frente a los PAs y están reguladas por la temperatura.

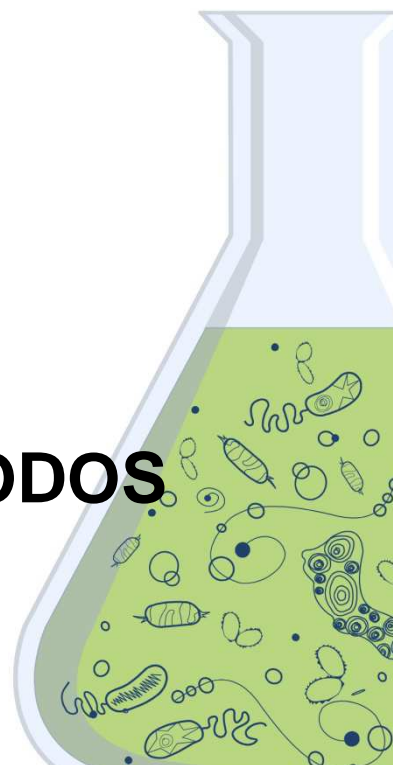
Para estudiar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Identificar si las modificaciones del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 están implicadas en la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos.
2. Estudiar si las modificaciones del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 están reguladas por la temperatura.
3. Evaluar el papel las modificaciones del lípido A en la virulencia de YeO8.
4. Caracterizar las bases moleculares de los sistemas reguladores que controlan la expresión de los genes responsables de las modificaciones del lípido A.

Otro de los cambios del lípido A según la temperatura es la presencia de una especie tetraacilada característica sólo a 37°C. Esta estructura es consistente con la existencia de una enzima con actividad deacilasa en la posición 3' del lípido A. Por consiguiente, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar la actividad enzimática que determina la estructura tetraacilada característica de *Y. enterocolitica* O:8 a 37°C.
2. Estudiar el efecto de la temperatura en su expresión y/o funcionalidad.
3. Analizar el impacto de esta estructura tetraacilada del lípido A en la interacción de *Y. enterocolitica* O:8 con diferentes elementos del sistema inmune innato.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en este trabajo así como sus características más relevantes están descritas en las **Tablas 3 y 4**, respectivamente (**Anexo II**).

La presencia o ausencia del plásmido de virulencia pYV en las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 se determinó, en primer lugar, comprobando si las bacterias autoaglutinaban tras crecer en medio RPMI1640 sin rojo fenol (PAA Laboratories) a 37°C³⁰³. Las bacterias que poseen el pYV autoaglutinan debido a que expresan la proteína YadA. En algunas ocasiones, la presencia del plásmido pYV también se comprobó mediante PCR a partir de colonia usando las parejas de cebadores YadAgenf y YadAgenr, o YadAPf y YadAPr (**Tabla 5, Anexo II**) específicas para el gen *yadA*.

1.1 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *Y. enterocolitica* y de *E. coli* se crecieron en medio LB (Luria-Bertani) o LB agar (LB con 1.5% de agar bacteriológico), a 21°C temperatura ambiente) o a 37°C. Los cultivos en medios líquidos se realizaron en agitación a 180 r.p.m. tanto a 21°C como a 37°C.

En la **Tabla 1** se indica la composición de los medios de cultivo empleados en este trabajo.

Tabla 1. Medios de cultivo y composición.

Medios de cultivo
LB (Scharlau Microbiology)
Composición: 10 g peptona tríptica de caseína, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, por litro. Añadir 16 g de agar bacteriológico por litro para LB agar .
LB0
Composición: 10 g peptona tríptica de caseína, 5 g extracto de levadura, 10% de sacarosa por litro.
CIN agar (OXOID)
Medio comercial para el crecimiento selectivo de <i>Y. enterocolitica</i> en medio sólido. Se

usa junto con el *Suplemento Selectivo de Yersinia* (Oxoid) según las indicaciones de la casa comercial.

Medio de motilidad

Composición: 0,3% de agar bacteriológico, 1% de triptona.

Medio de secreción de Yops (TSBox)

Consiste en medio TSB (Tryptona soya broth) suplementado con 20 mM oxalato sódico y 20 mM cloruro magnésico.

Cuando fue necesario, se añadieron **antibióticos** a los distintos medios de cultivo a partir de una solución concentrada conservada a -20°C .

- Ampicilina (Ap): Utilizada a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ en los cultivos de *E. coli*. En el caso de *Y. enterocolitica*, se usó a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$, en los cultivos en medio líquido, y de 100 $\mu\text{g/ml}$, en los cultivos en medio sólido.
- Kanamicina (Km): Utilizada a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ en los cultivos de *E. coli*. En el caso de *Y. enterocolitica*, se usó a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$, en los cultivos en medio líquido, y de 100 $\mu\text{g/ml}$, en los cultivos en medio sólido.
- Cloranfenicol (Cm): Utilizado a una concentración final de 25 $\mu\text{g/ml}$.
- Tetraciclina (Tet): Utilizada a una concentración final de 12.5 $\mu\text{g/ml}$.
- Estreptomina (Str): Utilizada a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.
- Trimetropina (Tp): Utilizada a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.
- Carbenicilina (Cn): Utilizada a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.
- Gentamicina (Gm): Utilizada a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas de Biología Molecular empleadas en este trabajo se realizaron siguiendo protocolos ya descritos por Sambrook y colaboradores⁴⁸¹. El ADN plasmídico fue purificado usando kits comerciales (*QIAprep*[®] *Spin*

Miniprep Kit y *Qiagen plasmid Midi Kit* de Qiagen, *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* de GE Healthcare). Las reacciones de PCR se realizaron empleando la enzima *GoTaq® Flexi* ADN polimerasa (Promega) o *Takara Ex Taq*. (Laboratorios Conda). En aquellos casos en los que fue necesaria una mayor fidelidad se empleó la enzima *Vent* ADN polimerasa (New England Biolabs). Para la purificación de ADN, en solución o a partir de geles de agarosa, se usaron kits comerciales (*QIAquick PCR Purification Kit* y *QIAEX II Gel Extraction Kit* de Qiagen, *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de GE Healthcare). Las enzimas de restricción del ADN (Promega o New England Biolabs), y las enzimas T4 ADN ligasa, T4 quinasa, T4 ADN polimerasa y el fragmento Klenow (New England Biolabs) se emplearon según las indicaciones de la casa comercial.

Todos los cebadores utilizados en este trabajo, se diseñaron a partir del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Yenterocolitica/).

2.1 Caracterización rápida del ADN plasmídico a partir de colonia

Para comprobar la presencia de un plásmido en una bacteria se empleó el método descrito por Beuken y colaboradores⁵⁶ que facilita la discriminación de plásmidos por su tamaño. Brevemente, se inocularon 800 µl de medio de cultivo en un tubo tipo Eppendorf® con una colonia. El cultivo creció 18 h en agitación (180 r.p.m.) a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Posteriormente, se tomó una alícuota del cultivo (300 µl) y las bacterias se recogieron mediante centrifugación (17500 x g, 5 min). El precipitado se resuspendió en 40 µl de reactivo de tinción (0.1% azul de bromofenol, 6% sacarosa) a los que se añadieron 14 µl de una mezcla fenol:cloroformo (1:1). Las bacterias se lisaron mediante agitación empleando un agitador tipo vórtex. Las muestras se volvieron a centrifugar (17500 x g, 10 min) con el fin de separar la fase acuosa de la fase orgánica. Finalmente se cargaron 10 µl de la fase acuosa (superior) en un gel de agarosa y el ADN de las muestras se

separó mediante electroforesis. Como control, se procesó del mismo modo la cepa que contenía el plásmido de referencia.

2.2 Métodos de transferencia genética

La introducción de plásmidos en las cepas de *E. coli* se realizó por transformación química o por electroporación. Por su parte, la introducción de plásmidos en las cepas de *Y. enterocolitica* se realizó por electroporación o por conjugación, biparental o triparental.

2.2.1 Transformación química con cloruro cálcico

Este método se usó para generar cepas de *E. coli* competentes para ser transformadas con ADN plasmídico. Para ello, 250 ml de medio LB se inocularon con 5 ml de un cultivo de *E. coli* en fase estacionaria crecido en LB (180 r.p.m., 16 h, 37°C). Este cultivo se incubó a 37°C con agitación (180 r.p.m.) hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0.4-0.6. Al llegar a la DO deseada, los matraces de cultivo se enfriaron en hielo picado durante 10 min y, posteriormente, se recuperaron las células por centrifugación (2000 x g, 5 min, 4°C). Las células se resuspendieron en 60 ml de MgCl₂ 100 mM frío. Se volvieron a recuperar las células por centrifugación (2000 x g, 5 min, 4°C) y se resuspendieron con 60 ml de CaCl₂ 100 mM frío. Las células se incubaron en hielo picado durante 20 min antes de ser recogidas de nuevo por centrifugación (2000 x g, 5 min, 4°C). Las células se resuspendieron en 12 ml de una solución 86 mM CaCl₂- 12,3 % Glicerol. Seguidamente se distribuyeron en alícuotas de 200 µl en tubos tipo Eppendorf® fríos, que se congelaron rápidamente a -80°C.

La transformación de las células competentes de *E. coli* así preparadas se realizó siguiendo un protocolo de choque térmico. Para ello se descongeló en hielo una alícuota de células competentes, a la que posteriormente se añadió el ADN plasmídico o el producto de la reacción de ligación con el que se deseaba transformar (800 ng ADN, máximo 10 µl). Luego, la mezcla se incubó en hielo durante 30 min y, a continuación, fue sometida a un choque térmico de 90 seg a 42°C en un baño termostático. Seguidamente, se mantuvo en hielo durante 2 min y se añadieron 800 µl de medio LB, previamente atemperado a

37°C. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 h, en agitación (180 r.p.m.). Finalmente, las bacterias se plaquearon en placas de LB agar que contenían los antibióticos apropiados para la selección de transformantes, y se incubaron a la temperatura adecuada durante 18-24 h²²⁶.

2.2.2 Transformación por electroporación

Para preparar las células electrocompetentes, tanto de *Y. enterocolitica* como de *E. coli* se siguió el protocolo descrito por Choi y Schweizer¹²⁴. Brevemente, se creció un cultivo bacteriano durante 16 h en 6 ml de medio LB en agitación (180 r.p.m.) y a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. A continuación, se distribuyó el cultivo en cuatro tubos tipo Eppendorf® de 1.5 ml y se centrifugaron (17500 x g, 2 min, temperatura ambiente). Las células se lavaron dos veces con 1 ml de una solución 300 mM de sacarosa, con el objetivo de reducir la fuerza iónica de la suspensión celular. Tras la última centrifugación, los cuatro precipitados se resuspendieron en 200 µl de 300 mM sacarosa. Para cada electroporación, se mezclaron 100 µl de células electrocompetentes junto con el ADN con el que se pretende transformar la bacteria (800 ng ADN, no más de 10 µl). Para la electroporación, se usó un electroporador modelo *Gene Pulser Xcell II* junto con el *PC Module* (Bio-Rad), cubetas de 2 mm *Gene Pulser Cuvettes* (Bio-Rad) y las siguientes condiciones:

Tipo de pulso:	Caída exponencial
Capacitancia:	25 µF
Resistencia:	200 Ω
Voltaje de descarga:	2,5 kV
Fuerza del campo eléctrico aplicado:	10-20 kV/cm
Duración del pulso:	~ 5 ms

Tras el choque eléctrico, las células se resuspendieron rápidamente en 800 µl de y se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf® que se incubó 1-3 h en agitación (180 r.p.m.) a la temperatura adecuada en función de la cepa transformada o el plásmido introducido. Por último, las bacterias se plaquearon en placas de LB agar que contenían los antibióticos apropiados para la selección de transformantes, y se incubaron a la temperatura adecuada durante 18-24 h.

2.2.3 Conjugación en medio sólido

En ocasiones, aquellos plásmidos que contienen la región *mob* se introdujeron en *Y. enterocolitica* O:8 mediante conjugación, biparental o triparental. Esta última se empleó en aquellos casos en los que la cepa donadora de *E. coli* no expresaba la región *tra*. La cepa *E. coli* HB101 transformada con el plásmido pRK2013, confiere las funciones de transferencia y la formación del *pili* conjugativo en las conjugaciones triparentales.

Las cepas donadoras se crecieron en LB a 37°C sin agitación y la cepa receptora (*Y. enterocolitica* O:8) en LB a 21°C con agitación durante 16 h. Las bacterias se recogieron por centrifugación (2000 x *g*, 20 min, 4°C), se lavaron 3 veces con 5 ml de una solución 10 mM MgSO₄ y se resuspendieron en 500 µl de 10 mM MgSO₄. A continuación, se plaquearon 100 µl de cada una de las cepas que intervienen en la conjugación en una placa de LB. En las conjugaciones triparentales, la cepa HB101 se plaqueó en primer lugar y la cepa receptora de *Y. enterocolitica* siempre fue la última en plaquearse. Tras incubar las placas 16 h a temperatura ambiente, se recogió el césped bacteriano con 1 ml de PBS y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en CIN-agar (Oxoid) con los antibióticos necesarios para la selección de bacterias transconjugantes.

3. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y CEPAS

3.1 Construcción de cepas mutantes de *Y. enterocolitica* O:8 8081 $\Delta manCKm$, $\Delta pmrAB$, $\Delta phoPQ$, $\Delta lpxRKm$, $\Delta yopPKm$, $\Delta pmrC$, $\Delta rcsD$, $\Delta hfqKm$, $\Delta pagPGB$, $\Delta pmrF$ mediante doble recombinación homóloga.

3.1.1 Construcción de los vectores suicida pKNG101 $\Delta manCKm$, pKNG101 $\Delta pmrAB$, pKNG101 $\Delta phoPQ$, pKNG101 $\Delta lpxRKm$ y pKNG101 $\Delta yopPKm$

La construcción de mutantes de YeO8 en los genes *manC* (YE3073), *pmrAB* (YE0423, YE0422), *phoPQ* (YE1718, YE1717), *lpxR* (YE3039) y *yopP* (pYVe8081_p61) se basó en el método mostrado en la **Figura 22**.

En primer lugar, se amplificaron mediante PCR los fragmentos correspondientes a ambos extremos del gen a mutar, utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *GoTaq[®] Flexi* y las parejas de cebadores denominados DELTAmancUpF/DELTAmancUpR y DELTAmancdownF/DELTAmancdownR para el mutante $\Delta manC$; YeO8BasupF2/ YeO8BasupR2 y YeO8BasdownF/ YeO8BasdownR para el mutante $\Delta pmrAB$; YeO8PhoPQupF/ YeO8PhoPQupR y YeO8PhoPQdownF/ YeO8PhoPQdownR para el mutante $\Delta phoPQ$; LpxRupF/LpxRupR y LpxRdownF/LpxRdownR para el mutante $\Delta lpxR$ y YopPUpF/YopPUpR y YopPDownF/YopPDownR para el mutante $\Delta yopP$ (**Tabla 5, Anexo II**). Para cada mutante, los cebadores DownF y UpR incluyen en su extremo 5' la diana de la enzima de restricción *Bam*HI. Los dos fragmentos de PCR obtenidos para la construcción de cada uno de los mutantes, se purificaron a partir de un gel de agarosa y se digirieron con *Bam*HI. A continuación, uno de los dos fragmentos se defosforiló con la enzima fosfatasa antártica (New England Biolabs). Se purificaron ambos y se ligaron (T4 DNA ligasa New England Biolabs). El fragmento de ADN obtenido a partir de la ligación anterior se usó como molde para una reacción de PCR empleando una mezcla de las polimerasas *Vent* (0.2 u/reacción) y *GoTaq[®] Flexi* (2.5 u/reacción) y los cebadores UpF y DownR. Los fragmentos de PCR así obtenidos (1569 pb para

$\Delta manC$, 1845 pb para $\Delta pmrAB$, 1353 pb para $\Delta phoPQ$, 1660 pb para $\Delta lpxR$, 1370 pb para $\Delta yopP$) se clonaron en el vector pGEM-T[®] Easy (Promega), generándose pGEMT $\Delta manC$, pGEMT $\Delta pmrAB$, pGEMT $\Delta phoPQ$, pGEMT $\Delta lpxR$, y pGEMT $\Delta yopP$, respectivamente.

- **pKNG101 $\Delta manCKm$, pKNG101 $\Delta lpxRCKm$ y pKNG101 $\Delta yopPKm$**

El plásmido pKD4¹⁴⁹ contiene un casete que confiere resistencia a Km flanqueado por las secuencias FRT (del inglés “FLP recognition target”). La secuencia FRT es la diana de la recombinasa de levadura FLP y puede usarse para eliminar el casete de Km del cromosoma bacteriano, una vez obtenido el mutante por doble recombinación homóloga. El casete de resistencia a Km se obtuvo mediante PCR usando como molde el plásmido pKD4, la polimerasa *Vent* y los cebadores cassette-F1 y cassette-R1 (Tabla 5, Anexo II), que contienen la diana de la enzima de restricción *Bam*HI. A continuación, el producto de PCR se purificó por columna y se digirió con *Bam*HI.

El casete de resistencia a Km obtenido se clonó en los plásmidos pGEMT $\Delta manC$, pGEMT $\Delta lpxR$ y pGEMT $\Delta yopP$ previamente digeridos con *Bam*HI y desfosforilados. De esta manera se generaron los plásmidos pGEMT $\Delta manCKm$, pGEMT $\Delta lpxRCKm$ y pGEMT $\Delta yopPKm$. Finalmente, estos plásmidos se usaron como molde en reacciones de PCR con la polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores UpF y DownR. Los fragmentos de PCR así obtenidos (3 kb para $\Delta manCKm$, 3.1 kb para $\Delta lpxRCKm$ y 2.9 kb para $\Delta yopPKm$) se purificaron a partir de un gel de agarosa y se clonaron en el vector suicida pKNG101²⁷⁶ digerido con *Sma*I, obteniéndose pKNG101 $\Delta manCKm$, pKNG101 $\Delta lpxRCKm$ y pKNG101 $\Delta yopPKm$. Dichos vectores se transformaron en *E. coli* CC118- λ pir.

- **pKNG101 $\Delta phoPQ$ y pKNG101 $\Delta pmrAB$**

Los plásmidos pGEMT $\Delta pmrAB$ y pGEMT $\Delta phoPQ$ se digirieron con *Pvu*II y los respectivos fragmentos de 1845 pb y de 1353 pb *Pvu*II se purificaron de un gel de agarosa. Estos fragmentos se clonaron en el vector suicida pKNG101 digerido con *Sma*I obteniéndose pKNG101 $\Delta pmrAB$ y pKNG101 $\Delta phoPQ$ respectivamente. Dichos vectores se transformaron en *E. coli* CC118- λ pir.

3.1.2 Construcción de los vectores suicida pKNG101 Δ *pmrC*, pKNG101 Δ *rscD* y pKNG101 Δ *hfqKm*

Para la construcción de mutantes de YeO8 en los genes *pmrC* (YE2150), *rscD* (YE1398) y *hfq* (YE0377) se amplificaron por PCR los fragmentos correspondientes a ambos extremos del gen a mutar (UP y DOWN), utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *GoTaq[®] Flexi* y las parejas de cebadores denominados YepmrCUPF1/YepmrCUPR1 y YepmrCdownF1/ YepmrCdownR1 para el mutante Δ *pmrC*; YerscDUPF1/YerscDUPR1 y YerscDdownF1/YerscDdownR1 para el mutante Δ *rscD*; UphfqYeO8F/UphfqYeO8R y DownhfqYeO8F/DownhfqYeO8R para el mutante Δ *hfq* (Tabla 5, Anexo II). Se purificaron ambos fragmentos a partir de un gel de agarosa y se realizó una PCR de polimerización de los fragmentos y sin cebadores. La reacción empezó con una incubación inicial a 94°C durante 3 min y luego se repitieron las siguientes condiciones durante 8 ciclos: 94°C durante 30 s, 52°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; para terminar con un tiempo de extensión de 7 min a 72°C. El resultado de la PCR se utilizó como molde para amplificar el fragmento entero utilizando los cebadores más externos en cada caso. Los fragmentos obtenidos fueron de 2034 pb para Δ *pmrC*, 1577 pb para Δ *rscD* y 1618 pb para Δ *hfq*; los cuales se purificaron a partir de un gel de agarosa y se clonaron en el vector pGEM-T[®] Easy (Promega) para obtener los plásmidos pGEMT Δ *pmrC*, pGEMT Δ *rscD* y pGEMT Δ *hfq*. Los siguientes pasos para la construcción de los vectores suicida están explicados en la **Figura 22**.

Se clonó en el plásmido pGEMT Δ *hfq* un casete de resistencia a Km que se obtuvo mediante PCR tal y como se ha explicado en el apartado 3.1.1 obteniéndose el plásmido pGEMT Δ *hfqKm*.

A. Construcción de la copia mutada del gen y clonación en el vector pGEM-T

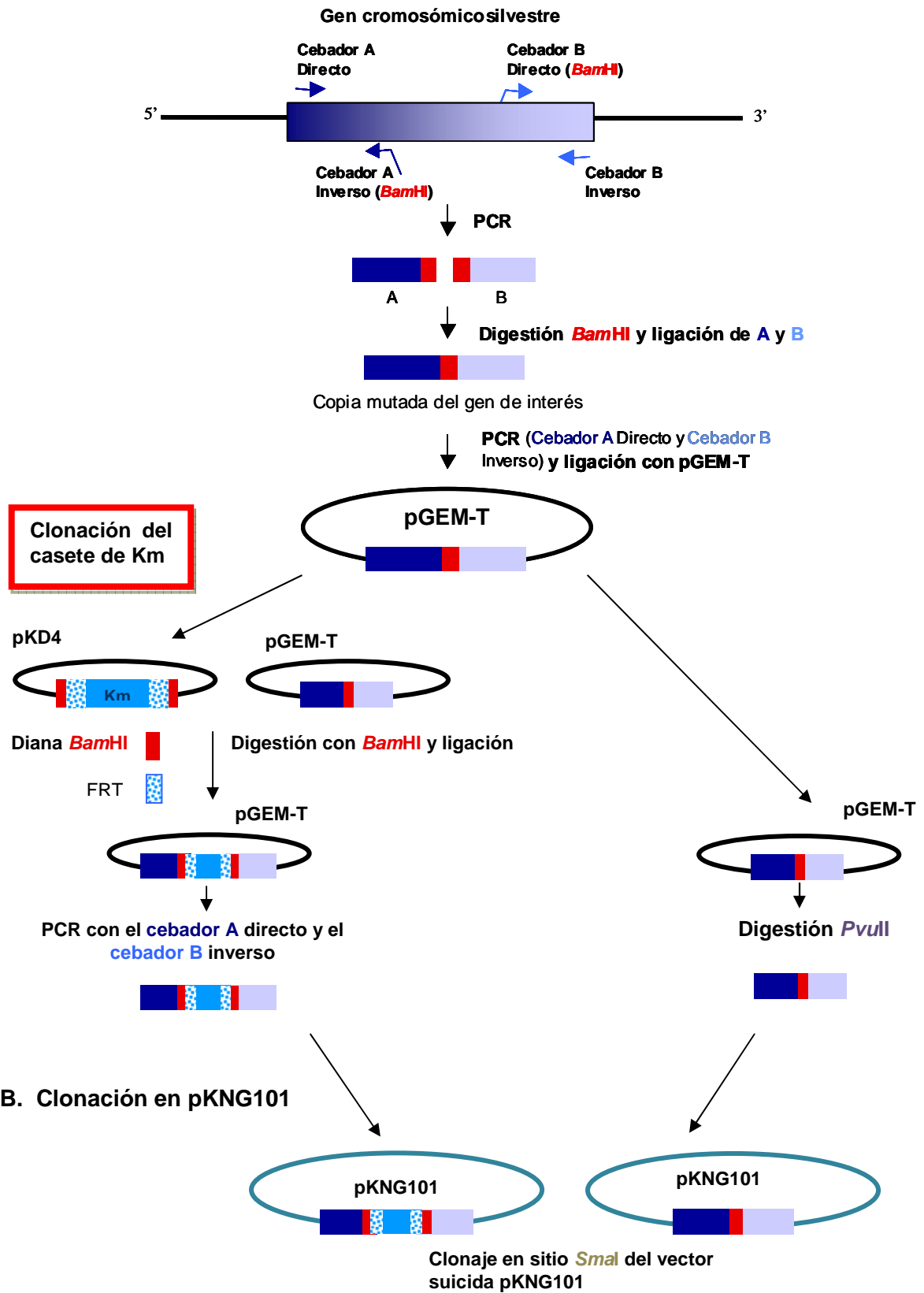


Figura 22. Esquema de la construcción de los vectores suicidas para la obtención de mutantes por doble recombinación.

3.1.3 Construcción de los vectores suicida pKNG101 Δ pagPGB y pKNG101 Δ pmrF

En primer lugar, se amplificaron por PCR los fragmentos correspondientes al gen *pagP* (YE1762) y al gen *pmrF* (YE2191) utilizando *GoTaq[®] Flexi* y los pares de cebadores denominados YeO8PagPR/YeO8PagPF y YeO8pmrFR/YeO8pmrFF, respectivamente (**Tabla 5, Anexo II**). Los fragmentos resultantes se purificaron a partir de un gel de agarosa y se clonaron en el pGEM-T easy (Promega), obteniéndose pGEMTYepagP y pGEMTYepmrF. Estos plásmidos fueron amplificados por PCR inversa (*Vent*) utilizando el método descrito por Byrappa y colaboradores⁹⁸. En el caso del mutante Δ pmrF, se cerró el plásmido y mediante digestión con *PvuII* se obtuvo el fragmento (1,4 kb), se purificó a partir de un gel de agarosa, se fosforiló mediante el tratamiento con T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs) y se clonó en el vector suicida pKNG101 digerido con *SmaI*. En caso del mutante Δ pagP, se clonó un casete de Km, obtenido por digestión *PstI* del plásmido pUC4K (Pharmacia), en el plásmido obtenido por PCR inversa para generar el plásmido pGEMT Δ pagPGB. Posteriormente, se obtuvo el alelo Δ pagP::GenBlock tras una digestión con *PvuII* de pGEMT Δ pagPGB; el fragmento se purificó a partir de un gel de agarosa, y se clonó en el vector suicida pKNG101 digerido con *SmaI*.

Ambos vectores pKNG101 Δ pmrF y pKNG101 Δ pagPGB fueron transformados a *E. coli* CC118- λ pir.

3.1.4 Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga

El vector pKNG101 es un plásmido conjugativo que contiene un origen de replicación R6K, el gen *sacB* y un gen que confiere resistencia a Str²⁷⁶. Este plásmido no puede replicar en *Yersinia* ya que este género bacteriano no expresa la proteína Pi necesaria para la replicación del mismo. Por consiguiente, la única manera de obtener bacterias resistentes a la estreptomicina es que el vector se integre mediante recombinación homóloga en el cromosoma bacteriano. Por otra parte, el gen *sacB* facilita la selección de

aquellas bacterias que hayan perdido el plásmido tras una segunda recombinación homóloga. La enzima SacB hidroliza la sacarosa, lo que genera compuestos tóxicos para las bacterias Gram negativas. Por tanto, la pérdida del vector suicida es necesaria para el crecimiento de *Y. enterocolitica* O:8 en presencia de sacarosa.

En primer lugar se movilizaron los vectores suicidas anteriormente obtenidos por conjugación a *Y. enterocolitica* O:8, tal y como se describe en el apartado 2.2.3. Para seleccionar los merodiploides, se plaquearon diluciones seriadas de la conjugación en CIN-agar (Oxoid) con 100 µg/ml de Str.

Los merodiploides se crecieron en LB a 21°C con agitación durante 16 h y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en LB0 (**Tabla 1**). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 días. En el caso de los mutantes $\Delta manCKm$, $\Delta lpxR Km$, $\Delta pagPGB$, $\Delta hfq Km$, $\Delta yopPKm$ de las colonias que crecieron se seleccionaron aquellas que no crecían en Str y sí en Km, lo que indicó la pérdida del vector suicida. En el caso de los mutantes $\Delta phoPQ$, $\Delta pmrAB$, $\Delta pmrF$, $\Delta rcsD$ y $\Delta pmrC$, al no tener marcador de antibiótico, se seleccionaron las que no crecían en Str pero si en LB agar. La sustitución del alelo silvestre por el mutado se comprobó mediante PCR en todos los casos. Además, se comprobó que los mutantes no habían perdido el plásmido de virulencia analizando su autoaglutinación y, en algunos casos, comprobando mediante PCR la presencia de *yadA*.

3.1.5 Eliminación del cassette de Km

- **pCP20**

Para eliminar el casete de resistencia de Km del mutante $\Delta manCKm$ se le introdujo mediante electroporación el plásmido pCP20. Este plásmido confiere resistencia a Ap y Cm, tiene un origen de replicación sensible a la temperatura y codifica la recombinasa FLP, cuya síntesis es inducible por temperatura^{119,149}. Una vez transformadas, las células se incubaron durante 2 h a 26°C en agitación (180 r.p.m.), se plaquearon en LB agar con Cm, y se incubaron durante 2 días a 30°C. Estas condiciones favorecen el crecimiento

de las bacterias que contienen el plásmido pCP20 así como la expresión de la recombinasa FLP. De las colonias que crecieron, se seleccionó una, se diluyó en 500 μ l de PBS y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en LB agar a 42°C para favorecer la pérdida de pCP20. La pérdida del casete de Km en las colonias crecidas se comprobó por PCR, obteniéndose el mutante YeO8 Δ *manC*.

- **pFLP2-Tp**

Para eliminar el casete de resistencia de Km de los mutantes Δ *lpxRKm*, Δ *hfqKm* y Δ *yopPKm* se les introdujo mediante conjugación (véase apartado 2.2.3) el plásmido pFLP2-Tp. El plásmido pFLP2-Tp es un derivado de plásmido pFLP2²⁴³ al cual se le clonó un casete de Tp en el sitio *Scal* del gen *bla*. Este plásmido codifica por la recombinasa Flp cuya expresión está controlada por el represor sensible a la temperatura *cI857* codificado en el mismo plásmido. También codifica el gen *sacB* que facilita la selección de las colonias que han perdido el vector. Se plaqueó la conjugación en placas de CIN agar-Tp. De las colonias resultantes, se seleccionaron aquellas que no crecieron en LB agar-Km y se comprobó mediante PCR que habían perdido el casete de Km. Se escogió una de las colonias Km sensible y se creció en el LB sin antibiótico a 21°C con agitación durante 16 h y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en LB0. De las colonias que crecieron se seleccionaron las que no crecían en Tp, lo que significaba que habían perdido el plásmido.

3.2 Construcción de plásmidos para complementar las mutaciones en los genes *pagP*, *lpxR*, *rovA* y *pmrC*

- **pTMYepagP**

Se amplificó el gen *pagP* de YeO8 con la polimerasa *Vent* (New England Biolabs) y el par de cebadores YeO8PagPF y YeO8PagPR, los mismos utilizados para mutarlo (**Tabla 5, Anexo II**). Se obtuvo un fragmento de 2,021 kb que se purificó a partir de un gel de agarosa y se clonó en el plásmido de

medio número de copia pTM100³⁶⁰ previamente digerido con *Scal*, obteniendo pTMYepagP. En este plásmido el gen está bajo el control de su propio promotor. Se comprobó la orientación del promotor del gen *pagP* mediante digestión con *HindIII*. Se encuentra en la misma dirección de transcripción que el gen *cat* del plásmido. Este plásmido se introdujo en las distintas cepas de *Yersinia* mediante conjugación (véase apartado 2.2.3).

- **pTM/lpxR**

En primer lugar, se amplificó el gen *lpxR* con la polimerasa *Takara Ex.Taq*. (Laboratorio Conda) y los cebadores GeneLpxRF y GeneLpxRR (**Tabla 5, Anexo II**). Se purificó el fragmento a partir de un gel de agarosa y se clonó en el plásmido pGEM-T[®] Easy (Promega) obteniéndose pGEMTCom/lpxR. Este plásmido se digirió con *PvuII* para obtener el fragmento del gen y clonarlo en el plásmido pTM100 previamente digerido con *Scal* para obtener pTM/lpxR que se electroporó en *E. coli* C600. En este plásmido el gen está bajo el control de su propio promotor. Se introdujo a las diferentes cepas de *Yersinia* mediante conjugación (véase apartado 2.2.3).

- **pBADrovA**

El gen *rovA* se amplificó mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y los cebadores denominados PBAAdRovAF y PBAAdRovAR (**Tabla 5, Anexo II**). El fragmento de PCR (500 bp) se purificó a partir de un gel de agarosa, se digirió con *EcoRI* y *XbaI*, y se clonó en el plásmido pBAD30²²⁰ digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniéndose el plásmido pBADrovA. El vector pBAD contiene el promotor del operón de la arabinosa (*araBAD*) y el gen que codifica para el regulador positivo y negativo del promotor, *araC*. Dicho plásmido se electroporó en *E. coli* C600 y se introdujo en las distintas cepas de *Yersinia* por conjugación (véase apartado 2.2.3). Se utilizaron diferentes concentraciones de arabinosa para inducir la expresión de *rovA*.

Este plásmido se utilizó tanto para complementar las mutaciones de *rovA*, como para sobreexpresar dicho gen en cepas de *E. coli* (BSN26)²⁷⁰.

- **pUC18R6KTmini-Tn7TKm-pmrC**

El gen *pmrC* se amplificó mediante PCR con la polimerasa *Vent* y el par de cebadores YepmrCUPF1/YepmrCdownR1 (**Tabla 5, Anexo II**). El fragmento obtenido de 2,4 kb se purificó a partir de un gel de agarosa y se clonó en el plásmido pUC18R6KTmini-Tn7TKm^{123,318} previamente digerido con *Sma*I y defosforilado con la fosfatasa Antártica (New England Biolabs). Se electroporó (véase apartado 2.2.2) el plásmido pUC18R6KTmini-Tn7TKm-*pmrC* a *E.coli* DH5 α - λ pir.

Seguidamente, se electroporó el plásmido pUC18R6KTmini-Tn7TKm-*pmrC* junto con el plásmido suicida pTNS2 a las cepas de *Yersinia*. Se utilizó el plásmido suicida pTNS2 para conseguir la inserción del transposón y la expresión de la transposasa en la bacteria¹²³. El transposón inserta el gen en copia única y en una orientación y lugar concreto del cromosoma bacteriano: sitios *attTn7*. Dichos sitios están localizados después de los genes *glmS* altamente conservados. La inserción del mini-Tn7 al cromosoma YeO8 se comprobó a partir de PCR de colonia utilizando el par de cebadores específicos de *Yersinia* YeO8glmSup/YeO8glmSdown y el par de cebadores del Tn7 Ptn7L/Ptn7R (**Tabla 5, Anexo II**).

3.3 Construcción de pTM/*lpxR*-FLAG

En primer lugar, se amplificó el gen *lpxR* con la polimerasa *Vent* y el par de cebadores *lpxR*Ftagging y *lpxR*RFLAG (**Tabla 5, Anexo II**). Uno de los cebadores incluye un epitopo FLAG para marcar la proteína *LpxR* en el extremo N-terminal y poder detectarla mediante Western Blot (véase apartado 17). El fragmento se purificó a partir de un gel de agarosa y se clonó en el plásmido pTM100 previamente digerido con *Sca*I, generando pTM100/*lpxR*-FLAG que se electroporó en *E. coli* C600. Se introdujo a las diferentes cepas de *Yersinia* mediante conjugación (véase apartado 2.2.3).

4. CONSTRUCCIÓN DE LAS FUSIONES TRANSCRIPCIONALES

lucFF y *gfp*

Las regiones promotoras de los genes *pagP*, *ugd*, *pmrC*, *lpxR* y *rscC* y los operones *pmrH*, *phoPQ* y *dacBpmrAB*, se amplificaron mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores descritas den la (**Tabla 5, Anexo II**). Los fragmentos obtenidos (1096 pb para la región promotora de *pagP*, 889 pb para la región promotora de *ugd*, 881 pb para la región promotora de *pmrC*, 1336 pb para la región promotora de *lpxR*, 443 pb para la región promotora de *rscC*, 677 pb para la región promotora de *pmrH*, 509 pb para la región promotora de *phoPQ* y 416 pb para la región promotora de *dacB*). Se purificaron a partir de un gel de agarosa, se digirieron con *EcoRI* y se clonaron en el plásmido pGPL01Tp²¹⁶ y/o pPROBE'-gfp[LVA]³⁷² digeridos con *EcoRI* y *SmaI* (**Tabla 4, Anexo II**)

pGPL01Tp es un derivado del plásmido pGPL01²¹⁶ en el que se clonó un casete que confiere resistencia a trimetropina, obtenido mediante digestión con *PstI* del plasposón p34S-Tp¹⁵⁷, en el sitio *PstI* del gen de la β -lactamasa de pGPL01 (**Tabla 4, Anexo II**). pGPL01Tp confiere únicamente resistencia a trimetropina. Este vector contiene el gen de la luciferasa sin su propio promotor y el origen de replicación R6K. Al construir las fusiones transcripcionales, el gen de la luciferasa queda bajo el control de los promotores de YeO8. Los diferentes plásmidos se transformaron químicamente a *E.coli* DH5 α - λ pir o CC118- λ pir. Para introducir las fusiones transcripcionales en YeO8 se realizó mediante conjugación triparental (véase apartado 2.2.3). Finalmente, se comprobó mediante PCR (**Tabla 5, Anexo II**) la correcta inserción de los vectores mediante recombinación homóloga.

pPROBE'-gfp[LVA] confiere resistencia a la kanamicina y la proteína GFP que se produce tiene un tiempo de vida media de 40 min lo que permite la realización de estudios de transcripción empleando GFP como proteína indicadora.

5. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para realizar la mutagénesis dirigida de varios residuos de una proteína se utilizó el método descrito por Byrappa y colaboradores⁹⁸. Se utilizó como ADN molde el plásmido pTM/*lpxR*. Se diseñaron cebadores (**Tabla 6, Anexo II**) que cambiaban residuos determinados por Alanina (GCA). Los cebadores se fosforilaron utilizando la polinucleótido quinasa T4 DNA (New England Biolabs) durante 30 min a 37°C y se desactivó la enzima 5 min a 90°C.

Las PCRs se llevaron a cabo en 50 µl de reacción utilizando la polimerasa *Vent* (New England Biolabs). La reacción empezó con una incubación inicial a 95°C durante 70 seg y luego se repitieron las siguientes condiciones durante 20 ciclos: 95°C durante 50 seg, 60°C durante 75 seg y 72°C durante 6 min. Finalmente, la reacción terminó con 10 min de extensión a 72°C. Los productos de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa, se fosforilaron con la polinucleótido quinasa T4 DNA (New England Biolabs), se ligaron y se digirieron con *DpnI* para digerir los restos de plásmidos utilizados como molde. Las ligaciones fueron transformadas químicamente (véase apartado 2.2.1) en *E. coli* C600. Para cada mutación, se secuenció el gen *lpxR* de tres plásmidos para confirmar que se habían generado las mutaciones deseadas y no otros cambios en la secuencia. Finalmente, se electroporaron los diferentes plásmidos con el gen *lpxR* mutado en *E. coli* MG1655⁶⁸ para el análisis del lípido A. Algunos de estos plásmidos se introdujeron en el mutante YeO8Δ*lpxR* mediante conjugación (véase el apartado 2.2.3).

6. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL LÍPIDO A POR MALDI-TOFF

6.1 Crecimiento y preparación de las bacterias

Para la extracción del lípido A las bacterias se crecieron toda la noche a 21 y a 37°C en un caldo de 5 ml. Se refrescaron los cultivos en 100 ml en un matraz de 250 ml y se dejó crecer 24 h. Pasado este tiempo, las células se recogieron por centrifugaron (2.000 x *g* 25°C) y se lavaron dos veces con PBS. El último precipitado se resuspendió en 2 ml de PBS y se congelaron las bacterias a -20°C para su posterior liofilización.

6.2 Extracción del lípido A

La extracción del lípido A se realizó mediante un método hidróxido amonio/ácido butírico^{165,425}. Se resuspendieron las bacterias liofilizadas con 400 µl de ácido butírico/hidróxido amonio 1M (5:3, v:v) y se incubaron a 100°C durante 2 h vorteadando cada 15 min. Transcurrido este tiempo las muestras fueron enfriadas en hielo durante 5 min y centrifugadas a 2.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y diluido con el mismo volumen de agua destilada. Seguidamente, se liofilizaron las muestras.

La muestra conteniendo el lípido A se resuspendió en 400 µl de metanol y se centrifugó dos veces a las mismas condiciones explicadas anteriormente. El lípido A se solubilizó a partir de precipitado resultante empleando 100 µl cloroformo/metanol/agua (3:1,5:0,25, v:v:v).

6.3 Análisis mediante espectrometría de masas

El análisis del lípido A^{24,313} se realizó mediante MALDI-TOF (“*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy*”). Se utilizó un espectrómetro de masas Bruker Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Incorporated) en modo negativo. Se fijó un voltaje de aceleración iónica de 20 kV. Para analizar las muestras, se mezclaron en un tubo tipo Eppendorf® unos microlitros de la suspensión de lípido A (1mg/ml) con unos granos de resina de intercambio iónico (Dowex 50W-X8; H+). De esta suspensión, se cogió una alícuota de 1 µl y se depositó en la placa cubriéndola con la misma cantidad de matriz (saturación de 2'-5'-ácido dihidroxibenzoico en ácido cítrico 0,1 M, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Cada espectro final es el resultado de la media de 300 espectros distintos de la misma muestra. Para calibrar el MALDI-TOF se utilizó una solución estandarizada de péptidos (Bruker Daltonics), así como el lípido A extraído de la cepa MG1655 de *E. coli* crecida a 37°C.

7. ENSAYOS DE RESISTENCIA FRENTE A PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

7.1 Ensayos de supervivencia

Para los ensayos de supervivencia las bacterias se crecieron a 21°C en un caldo de 5 ml de LB durante toda la noche. Al día siguiente los cultivos se refrescaron (a 21°C o a 37°C) y se recogieron por centrifugación (2000 x g, 20 min, 24 °C) tras alcanzar su fase de crecimiento exponencial (OD₅₄₀ 0.8). Las células se lavaron una vez con PBS y se preparó una suspensión bacteriana de 1x10⁵ ufc/ml en PBS 10 mM (pH 6.5), 1 % TSB (Oxoid), y NaCl 100 mM.

Se preparó una batería de tubos tipo Eppendorf® con 25 µl diferentes concentraciones de péptido antimicrobiano, polimixina B o magainina II, y se añadieron a cada uno de los tubos 5 µl de la suspensión bacteriana anteriormente preparada. En todos los casos el volumen final fue de 30 µl. Los tubos se incubaron durante 1 h a la temperatura de crecimiento de las bacterias y, transcurrido este tiempo, se plaqueó todo el contenido de los tubos en placas de LB agar que se incubaron a temperatura ambiente. A los dos días se contaron las colonias y los resultados fueron expresados como porcentajes con respecto al número de colonias de las bacterias no expuestas al agente antimicrobiano. El 50% de la concentración inhibitoria de cada péptido antimicrobiano (IC₅₀) fue definida como la concentración que producía una reducción del 50% del número de colonias, comparando siempre con las bacterias no expuestas al péptido. Los experimentos se realizaron por duplicado en al menos cuatro ocasiones independientes .

7.2 Ensayos por difusión radial

La actividad antimicrobiana de la polimixina B, magainina II, protamina y HNP-1 (Sigma) fue determinada siguiendo el método de difusión radial descrito por Lehrer y colaboradores con pequeñas modificaciones³¹⁰.

Brevemente, las bacterias se crecieron en LB a 21°C y a 37°C durante toda la noche, se recogieron por centrifugación (2000 x g, 20 min, 24°C) y se resuspendieron en PBS a una concentración de 1 x 10⁸ ufc/ml. Por otro lado, se

preparó un gel con 1% de agarosa (SeaKem LE agarose; FMC, Rockland, ME) en 2 mM HEPES (pH 7,2) y 0,3 mg/ml de TSB que se atemperó a 50°C. Se inocularon 180 µl de la suspensión bacteriana en 30 ml de gel que se añadieron a una placa de Petri cuadrada (10 cm x 10 cm). Una vez polimerizado el gel, se excavaron unos pocillos de unos 10 µl de capacidad a los que se añadieron 10 µl de distintas concentraciones de los diferentes péptidos. La placa se incubó durante 3 h a la temperatura de crecimiento de las bacterias. A continuación, se preparó un segundo gel con 1% agarosa y 6% TSB que se vertió sobre el gel anterior (un volumen final de 30 ml). La placa se incubó durante toda la noche a la temperatura de crecimiento de las bacterias. Al día siguiente se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento y se expresó como unidades de difusión según la siguiente relación: 10 unidades = 1 mm. Los coeficientes de correlación y la concentración mínima inhibitoria (intersección con el eje X) se determinaron a partir de la curva de regresión donde el eje X corresponde al \log_{10} de la concentración de péptido antimicrobiano y el eje Y a las unidades de difusión.

Todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado en tres ocasiones independientes.

8. SECRECIÓN DE TNF α POR MACRÓFAGOS INFECTADOS

Las bacterias se crecieron durante toda la noche y al día siguiente se diluyeron 1:10. Seguidamente, se recogieron por centrifugación (2.000 x g, 20 min. 24°C) y se resuspendieron en PBS a una concentración de 10^9 ufc/ml. Esta suspensión se empleó para infectar macrófagos de ratón (línea celular RAW264.7) crecidos en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) en medio DMEM (PAA Laboratories) suplementado con 10% Suero de Ternera Fetal (STF). La multiplicidad de infección fue de 25 bacterias por célula. Se centrifugaron las placas (200 x g 5 min, RT) con el fin de sincronizar la infección. El tiempo de contacto fue de 30 min. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados de 500 µl con PBS y se añadieron 500 µl de medio DMEM suplementado con gentamicina 100µg/ml (Gm) para eliminar las bacterias extracelulares. Se recogieron los sobrenadantes a los 180 min y la cantidad de TNF α secretado

en el sobrenadante se determinó mediante ELISA (Bender MedSystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección de este kit es 4 pg de TNF α por ml.

9. ENSAYO DE INVASIÓN Y ADHESIÓN EN CÉLULAS EPITELIALES HeLa

Las bacterias se crecieron durante toda la noche, se recogieron al día siguiente por centrifugación (2000 x g, 20 min. 24°C) y se resuspendieron en PBS a una concentración de 5×10^8 ufc/ml. Esta suspensión se empleó para infectar células epiteliales de carcinoma humano Henrietta Lacks (HeLa), crecidas en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories) suplementado con 1% de HEPES y 10% de STF. La multiplicidad de infección fue de 25 bacterias por célula. El tiempo de contacto fue de 30 min.

9.1 Adhesión

Transcurrido el tiempo de contacto, las células se lavaron cinco veces con 500 μ l de PBS y se añadieron 300 μ l de una solución de saponina 0.5% para lisar las células. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se realizaron diluciones y se plaquearon en LB agar. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres ocasiones independientes.

9.2 Invasión

Transcurrido el tiempo de contacto, las células se lavaron dos veces con 500 μ l de PBS y se incubaron durante 90 min en medio RPMI 1640 suplementado con 1% de HEPES, 10% de STF y 100 μ g/ml de gentamicina (Gm) para eliminar las bacterias extracelulares. A continuación, las células se lavaron dos veces con 500 μ l de PBS y se añadió una solución de PBS-saponina 0.5% para lisar las células. Se recogió el contenido de los pocillos, se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon en placas de LB agar para

determinar las ufc por ml. La invasión se expresó como las ufc por monocapa de células.

Los experimentos se realizaron por triplicado en tres ocasiones independientes.

10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA

Para analizar la traducción de *inv*, se usó la construcción previamente descrita por Pepe y colaboradores⁴¹⁹, en la que se mide la actividad fosfatasa alcalina en cepas indicadoras portadoras de la construcción *inv::phoA*⁴¹⁹, empleando para ello el protocolo descrito por Manoil y colaboradores³³³. Las bacterias se crecieron en LB a 21°C durante 16 h. A continuación, tras medir la DO₆₀₀, los cultivos se dejaron enfriar en hielo durante 10 min. Se recogió 1 ml de la suspensión bacteriana en un tubo tipo Eppendorf® y se centrifugó (17500 x g, 3 min, 4°C). Las bacterias se lavaron con 1 ml de una solución 10 mM Tris-HCl y 10 mM MgSO₄ (pH 8) y se resuspendieron en 1 ml de una solución 1 M Tris-HCl (pH 8). A continuación, se mezclaron 200 µl de esta suspensión bacteriana con 800 µl de una solución 1 M TrisHCl (pH 8), se añadieron 50 µl de una solución 0.1% SDS en agua y 50 µl de cloroformo. La mezcla se agitó empleando un agitador tipo vórtex durante 10 seg y se incubó sin agitación durante 5 min a 37°C. Se recogieron 825 µl de la fase superior de esta mezcla en otro tubo tipo Eppendorf®, se añadieron 75 µl de una solución de p-nitrofenilfosfato (0.4% de p-nitrofenilfosfato en 1 M Tris-HCl [pH 8]) y se agitó empleando un agitador tipo vórtex. Cuando la solución se volvió amarilla se anotó el tiempo transcurrido tras la adición de p-nitrofenilfosfato y se paró la reacción añadiendo 100 µl de una solución 1 M KH₂PO₄. Se midió la DO₄₁₀ y la DO₅₇₀. Los resultados se expresaron como unidades de enzima por DO₆₀₀ y se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad fosfatasa alcalina} = \frac{1000 \times (\text{DO}_{410} - 1.75 \text{DO}_{570})}{t \text{ (min)} \times \text{vol (ml)} \times \text{DO}_{600}}$$

t: Tiempo que ha transcurrido hasta parar la reacción

vol: Volumen de muestra usada en el ensayo (0.2 ml)

Las medidas se realizaron por duplicado en tres ocasiones independientes.

11. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD B-GALACTOSIDASA

La determinación de la actividad β -galactosidasa se realizó como ha sido descrito anteriormente por Miller y colaboradores³⁶³. Las bacterias se crecieron en LB a 21°C durante toda la noche. A continuación, tras medir la DO_{600} de los cultivos, éstos se enfriaron en hielo durante 10 min. Se recogieron 100 μl de la suspensión bacteriana en un tubo tipo Eppendorf[®] y se añadieron 900 μl de solución Z (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ y 50 mM β -mercaptoetanol [pH 7]). Posteriormente, se añadieron 2 gotas de cloroformo y 1 gota de una solución 0,1% SDS en agua, se agitó la mezcla empleando un agitador tipo vórtex durante 10 seg y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 200 μl de O-Nitrofenil- β -D-Galactopiranosido (ONPG) (4 mg/ml en solución Z) y la mezcla se agitó empleando un agitador tipo vórtex. Cuando la solución se volvió amarilla se anotó el tiempo transcurrido tras la adición de ONPG y se paró la reacción añadiendo 500 μl de una solución 1 M Na_2CO_3 . Se midió la DO_{420} y la DO_{550} . Los resultados se expresaron como unidades de enzima entre DO_{600} y se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{1000 \times (\text{DO}_{420} - 1,75 \text{DO}_{550})}{t \text{ (min)} \times \text{vol (ml)} \times \text{DO}_{600}}$$

Las medidas se realizaron por duplicado en tres ocasiones independientes.

12. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Los niveles de expresión de los genes *pagP*, *ugd*, *pmrC*, *lpxR* y de los operones *pmrH*, *phoPQ* y *dacBpmrAB* de *Y. enterocolitica* O:8 se analizaron midiendo la actividad luciferasa en cepas indicadoras con fusiones transcripcionales entre la región promotora de los genes u operones correspondientes y el gen *lucFF* (véase apartado 4). Las cepas indicadoras se crecieron en LB durante 16 h con agitación, a 21°C. Los cultivos se refrescaron a 21°C y/o a 37°C según el experimento y se dejaron crecer hasta alcanzar una DO_{540} de 1.6 (aprox.). Se ajustó la suspensión bacteriana en PBS a una DO_{540} de 1. En todos los casos, se mezclaron 100 μ l de la suspensión bacteriana con 100 μ l del sustrato de la luciferasa (1 mM D-luciferina [Synchem] en 100 mM citrato [pH 5]) e, inmediatamente, se midió la luminiscencia con un luminómetro (*Lumat LB 9507* de Berthold Technologies). Los resultados se expresaron como unidades relativas de luz (URL). Las medidas se realizaron por quintuplicado en al menos tres ocasiones independientes.

13. MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA

La expresión de los de los genes *pagP*, *ugd*, *pmrC* y de los operones *pmrH*, *phoPQ* y *dacBpmrAB* se analizó en cepas portadoras del plásmido con la fusión transcripcional entre la región promotora de dichos operones/genes y el gen *gfp* (véase apartado 4). Las cepas indicadoras se crecieron en LB durante 16 h con agitación, a 37°C. Los cultivos se refrescaron a 21°C y a 37°C y se dejaron crecer hasta alcanzar una densidad óptica DO_{540} de 1.2. Las células se recogieron mediante centrifugación (2.000 x *g*, 20 min, 15°C) y se resuspendieron en PBS a una DO_{540} de 0.6. Se transfirieron 800 μ l de esta suspensión a una cubeta de fluorescencia de 1 cm. La fluorescencia se midió con el fluorímetro LS-50 (Perkin-Elmer Ltd., Beaconsfield, Inglaterra) en el modo "Read" con una longitud de onda de excitación de 485 nm, de emisión de 528 nm y una ancho de rendija de 5 nm en ambos casos. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF). Las medidas se realizaron por quintuplicado en tres ocasiones independientes. Las URFs de las

cepas conteniendo el plásmido pPROBE'-gfp[LVA] se sustrajeron a las medidas obtenidas con los plásmidos que contenían las fusiones transcripcionales.

14. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Las bacterias se crecieron durante toda la noche en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente. Al día siguiente se inoculó el cultivo en 100 ml de LB en un frasco de 250 ml. Se dejó crecer hasta un DO_{600} de 0.6-0.8. Se recuperaron las bacterias por centrifugación ($6.400 \times g$, 10 min, RT) y se determinó el peso fresco de bacteria. Se resuspendieron en una solución de TrisCl 10 mM, $MgSO_4$ 5 mM, pH 7.4 y se añadió Triton X-100 a una concentración del 2% (peso/volumen). El volumen añadido dependió del peso del precipitado y osciló entre 1.5-2 ml. Las muestras se sonicaron durante 15 min (siempre en hielo) y se centrifugaron a $2.000 \times g$ durante 20 min para separar los restos de bacteria. Se decantó el sobrenadante en un tubo 70.1 Ti y se centrifugó en una ultracentrífuga a 45.000 r.p.m. durante 1 hora a $4^\circ C$. Los sobrenadantes que contenían las envolturas celulares se resuspendieron en 500 μl de agua destilada. Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Thermo Scientific). Las muestras se guardaron a $-20^\circ C$ hasta su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western Blot.

15. SECRECIÓN DE YOPS

Las condiciones óptimas para la secreción de Yops al sobrenadante del medio de cultivo son: utilizar un medio de cultivo rico, una temperatura de crecimiento de $37^\circ C$ y ausencia de iones calcio^{231,361}. Para analizar la secreción de Yops, las bacterias se crecieron en LB a $21^\circ C$ durante 16 h. A continuación, el cultivo se diluyó 1:50 en 25 ml de medio TSBBox en matraces de 100 ml de capacidad. El cultivo se creció durante 3 h a $21^\circ C$ con agitación (180 r.p.m.). Transcurrido este tiempo, el cultivo se transfirió a $37^\circ C$ y se continuó la incubación en agitación (180 r.p.m.) durante 3 h más. Al finalizar este período,

se midió la DO_{540} alcanzada por el cultivo y se realizaron diluciones seriadas del mismo. Dichas diluciones se plaquearon en LB agar para determinar con exactitud el número de ufc por ml. Los cultivos se centrifugaron ($2.000 \times g$, 30 min, $4^{\circ}C$). Se tomaron 20 ml del sobrenadante que se repartieron en dos tubos de plástico de 15 ml (10 ml en cada tubo) y se añadieron lentamente 4.75 g de sulfato amónico a cada uno de ellos. Tras 16 h a $4^{\circ}C$, los precipitados se recogieron por centrifugación ($2.000 \times g$, 30 min, $4^{\circ}C$) y se lavaron con 1.5 ml de agua d.o.i.. Finalmente las proteínas se resuspendieron en tampón de carga 1X (10% glicerol, 2.5% β -mercaptoetanol, 1% SDS, 0.01% azul de bromofenol en 62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]). La cantidad de tampón de carga empleada varió entre 50 y 80 μ l y se normalizó entre muestras según el número de ufc por ml. Las muestras se congelaron a $-20^{\circ}C$ hasta su análisis mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie, que se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 16.

16. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE YOPS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE) Y TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

Para el análisis electroforético de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS se utilizó el equipo MINI-PROTEAN IITM de Bio-Rad. Se empleó un gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS con un gradiente del 4% (gel de compactación) al 12% (gel de resolución). Se cargaron 20 μ l por pocillo de las muestras previamente hervidas durante 5-10 min a $100^{\circ}C$, para su desnaturalización. La electroforesis se realizó en tampón de carrera 1X (Tampón 10X: 0.25 M Trizma base, 1.9 M glicina, 1% SDS) aplicando un voltaje de 80 V hasta el alineamiento de las muestras en la fase de compactación, momento en que se aumentó el voltaje a 140 V hasta el final de la electroforesis.

Tras la electroforesis, el gel se tiñó durante 1 h en agitación con una solución Azul de Coomassie (0.25% Azul de Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético glacial). A continuación, el gel se lavó en agitación durante 1-2 h

con una solución de 10% metanol y 10% ácido acético. Transcurrido este tiempo el gel se mantuvo en agua d.o.i..

17. WESTERN BLOT

El análisis electroforético de proteínas en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) con SDS se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 16, pero utilizando un gradiente de poli(acrilamida) del 5% (fase de compactación) al 15% (fase de resolución) en el caso de YopE.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana usando un sistema de transferencia semihúmedo (TRANS-BLOT[®] SD SemiDry Transfer Cell de Bio-Rad) y aplicando un voltaje de 10 V durante 35 min. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro (Whatman[®] PROTRAN[®]). En el caso del análisis de las proteínas de membrana se utilizó el Buffer V de transferencia: mezcla 1:1 de SDS running buffer 1x (Tris 12 mM, glicina 96 mM, SDS 0,1%) y de buffer de lisis con urea (Na_2HPO_4 10 mM, 1% beta-mercaptoetanol (v/v), SDS 1%, urea 6M)^{1,231}.

La eficiencia de la transferencia se controló rutinariamente tiñendo la membrana con una solución comercial de *Ponceau S* (Sigma), que se eliminó con tampón de lavado (0.1% Tween-20 en TBS 1x del inglés “Tris-buffered saline” compuesto por Tris 20mM y NaCl 140mM, ajustando el pH a 7,6 con HCl). La membrana se bloqueó durante 3 h a temperatura ambiente empleando el tampón de bloqueo (4% de leche en polvo desnatada en una solución 0.1% Tween-20 en TBS 1x). A continuación, se incubó la membrana durante 18 h a 4°C y agitación con el anticuerpo primario. Para la detección de FLAG se utilizó un anticuerpo de ratón anti-flag comercial (Sigma), diluido 1:2000. Para la detección de YopE se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-YopE (donado por el Dr. Holger Rüssmann), diluido 1:2000 en tampón de bloqueo. Tras la eliminación del anticuerpo no unido mediante dos lavados de 15 min con el tampón de lavado (0.1% Tween-20 en TBS), la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (1 h, temperatura ambiente, en agitación). Para la detección del epítipo FLAG, se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Stabilized Goat Anti-Mouse IgG, (H+L),

Thermo Scientific), diluido 1:1000 en tampón de bloqueo (4% de leche en polvo desnatada en una solución 0.1% Tween-20 en TBS 1x). Para la detección de YopE, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Stabilized Goat Anti-Rabbit HRP-Conjugated, PIERCE), diluido 1:1000 en tampón de bloqueo (4% de leche en polvo desnatada en una solución 0.1% Tween-20 en TBS 1x, 1 h, temperatura ambiente, en agitación). Antes del revelado, la membrana se lavó la dos veces con tampón de lavado (0.1% Tween-20 en TBS 1x, 15 min, temperatura ambiente, en agitación). El revelado se realizó incubando la membrana con el reactivo del kit *SuperSignal West-Dura* de PIERCE siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron y procesaron con el sistema de análisis de quimioluminiscencia *GeneGenome HR* de Syngene.

18. TRANSLOCACIÓN DE LA PROTEÍNA YopE EN CÉLULAS A549

Las bacterias se crecieron durante 16 h a 21°C con agitación (180 r.p.m.) y al día siguiente se diluyeron 1:10 y se incubaron durante 3 h a 21°C en agitación. Seguidamente, se recogieron por centrifugación (2.000 x g, 20 min, 24°C) y se resuspendieron en PBS a una concentración de 5×10^8 ufc/ml. Esta suspensión se empleó para infectar células epiteliales A549 (células epiteliales alveolares humanas de un adenocarcinoma) crecidas en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) en medio RPMI (PAA Laboratories) suplementado con 1% de HEPES y 10% de Suero de Ternera Fetal (STF). La multiplicidad de infección fue de 25 bacterias por célula. Se centrifugaron las placas (400 x g, 5 min) con el fin de sincronizar la infección. El tiempo de contacto fue de 60 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados empleando 500 µl con PBS. Posteriormente, se añadieron 400 µl de PBS a cada pocillo y las células se recogieron en tubos tipo Eppendorf® empleando un descamador celular. Seguidamente, las células se recogieron por centrifugación (16.000 x g, 12 s). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 100 µl de una solución de digitonina al 1% e inhibidor de proteasas 1X en PBS. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 min. Posteriormente, las muestras se

centrifugaron (16.000 x *g*, 10 min, 4°C) y se recogieron 80 µl del sobrenadante, que contiene únicamente las proteínas citosólicas. A éstos se les añadieron 20 µl de solución de carga 5X (50% glicerol, 12.5% β-mercaptoetanol, 5% SDS, 0.05% azul de bromofenol en 312.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]). El precipitado, que contiene las bacterias intactas y las membranas celulares, se resuspendió en 100 µl de solución de carga 1X (10% glicerol, 2.5% β-mercaptoetanol, 1% SDS, 0.01% azul de bromofenol en 62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]). Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western Blot usando anticuerpo de conejo anti-YopE (véase apartados 16 y 17).

19. ADHESIÓN A COLÁGENO A 37°C

Las bacterias se crecieron durante 16 horas a 37°C. Al día siguiente se diluyeron 1:10 y se incubaron 2.5 h también a 37°C. Transcurrido este tiempo, las bacterias se recogieron por centrifugación (2.000 x *g*, 20 min. 24°C) y se preparó una suspensión en PBS (DO₆₀₀ de 0.3). Esta suspensión bacteriana se utilizó para estudiar la adhesión dependiente de YadA a colágeno. Para ello, se tapizaron cubres, depositados en placas de 24 pocillos, con colágeno tipo I (Soluble en ácido, de piel humana, SIGMA) a una concentración de 10µg/ml en PBS (100 µl por pocillo) durante 16 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron 3 veces con TBS (500 µl/pocillo) y se bloquearon durante 1 hora a 4°C con 2% de BSA en TBS. Los cubres se lavaron tres veces y se les añadió 100 µl de la suspensión bacteriana anteriormente descrita. Los cubres se incubaron durante 1 h a 37°C. A continuación, se lavaron 3 veces con TBS y se fijaron con 300 µl de solución de PFA (PFA al 4% en agua). Tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con 500 µl de PBS. A continuación, se añadió 1 ml de PBS con 14 µl de NH₄Cl y se incubó a 4°C durante 16 horas para neutralizar los aldehídos libres.

Al día siguiente, se tiñó el ADN de las bacterias empleando Hoechst 33342 (Invitrogen). Para ello, las tinciones se realizaron en un volumen de 40 µl de PBS con 10% de suero de caballo, 0.1% de saponina, Hoechst 1:2500. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0.1%, una vez con PBS

y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad durante 30 min. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0.1%, una vez con PBS y otra con agua. Se secaron cuidadosamente y se fijaron con una gota de Prolong Gold Antifade Mounting gel (Invitrogen) en el portaobjetos.

Se observaron los cubres mediante microscopía de fluorescencia y se realizaron fotos de cuatro campos representativos.

20. EXPRESIÓN DE YadA

Las bacterias se crecieron en 2 ml de RPMI sin el indicador de pH rojo fenol (PAA Laboratories) a 37°C sin agitación durante toda la noche. A continuación, se midió la DO_{540} alcanzada por los cultivos y se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de ufc por ml. En un tubo tipo Eppendorf[®], se centrifugó 1 ml de cultivo (16000 x g, 10 min, 4°C) y las bacterias se resuspendieron en 200 µl de solución de carga 1X (10% glicerol, 2,5% β-mercaptoetanol, 1% SDS, 0,01% azul de bromofenol en 62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8]). Las muestras se incubaron durante 4 horas a 37°C y, posteriormente, se congelaron a -20°C hasta su análisis mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 16, aunque las muestras no se hirvieron.

21. ENSAYO DE MOTILIDAD

Las bacterias se crecieron en 1% triptona a 21°C durante toda la noche. Por otro lado, se prepararon placas de Petri con 1% triptona y 0,3% agar. Diversos trabajos han demostrado que éste es el medio óptimo para estudiar la movilidad del género *Yersinia spp.*^{46,616,618}. Las placas se inocularon con 2 µl de los cultivos bacterianos. Tras dejar las placas 24 h a temperatura ambiente, se midieron los halos de migración a partir del punto de inoculación. Las medidas se realizaron por duplicado en tres ocasiones independientes.

22. VIRULENCIA EN EL MODELO MURINO

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 20 g de peso divididos en grupos de 10 ratones por cada cepa. Los ratones se inocularon oralmente con 100 μ l de una suspensión bacteriana de *Y. enterocolitica* O:8 o de los mutantes *YeO8 Δ pmrF*, *YeO8 Δ pagP* y *YeO8 Δ pmrF- Δ pagP* que contenía 10⁸ ufc/ml. Para determinar el número exacto de bacterias inoculadas, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana y se plaquearon en placas de CIN-agar para *YeO8* y *YeO8 Δ pmrF* ó en placas de LB agar con 100 μ g/ml de Km para los mutantes *YeO8 Δ pagP* y *YeO8 Δ pmrF- Δ pagP*. A los 3 y 7 días se sacrificaron 5 ratones de cada grupo, se extrajeron las placas de Peyer, el hígado y el bazo, se pesaron los órganos extraídos y se homogeneizaron en 1 ml, 5 ml y 2 ml de PBS respectivamente. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de los distintos homogeneizados y se plaquearon en las correspondientes placas de CIN agar. Los resultados se expresaron como ufc por gramo de órgano.

23. ESTADÍSTICA

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) o mediante la *t* de Student empleando el programa informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor *P* era menor de 0,05.

RESULTADOS



1. ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES QUE DETERMINAN LA RESISTENCIA DE *Y. enterocolitica* O:8 FRENTE A LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

1.1 Efecto de la temperatura en la resistencia de *Y. enterocolitica* O:8 frente a los péptidos antimicrobianos.

En primer lugar, se realizaron ensayos de supervivencia para determinar la resistencia de YeO8 frente a dos PAs: la polimixina B (PxB) y la magainina II. Se seleccionaron estos dos agentes ya que ambos son utilizados como modelos de la acción bactericida de los PAs^{228,569}. Como se puede observar en la **Figura 23**, YeO8 fue más sensible a la PxB y a la magainina II cuando se creció a 37°C que a 21°C, resultados que concuerdan con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo⁴⁴. Además, se llevaron a cabo ensayos de difusión radial con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (**Tabla 2**). Para ambos péptidos, la CMI fue más elevada en el caso de las bacterias crecidas a 21°C que en aquellas crecidas a 37°C. Seguidamente, se comprobó si esta diferencia de sensibilidad dependiente de la temperatura también ocurría para otros PAs, en concreto HNP-1, magainina I y protamina. HPN-1 es la defensina producida por los neutrófilos y liberada al medio después de la degranulación¹⁹². La magainina I al igual que la II se aísla de la rana *Xenopus laevis*⁶²⁰. La protamina se produce en las células espermáticas del salmón o el arenque²⁶⁹. Para todos ellos, las CMIs fueron superiores cuando YeO8 se creció a 21°C (**Tabla 2**). Dado que todos los PAs probados no están estructuralmente relacionados, los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos de resistencia de YeO8 dependientes de la temperatura, son comunes a todos ellos.

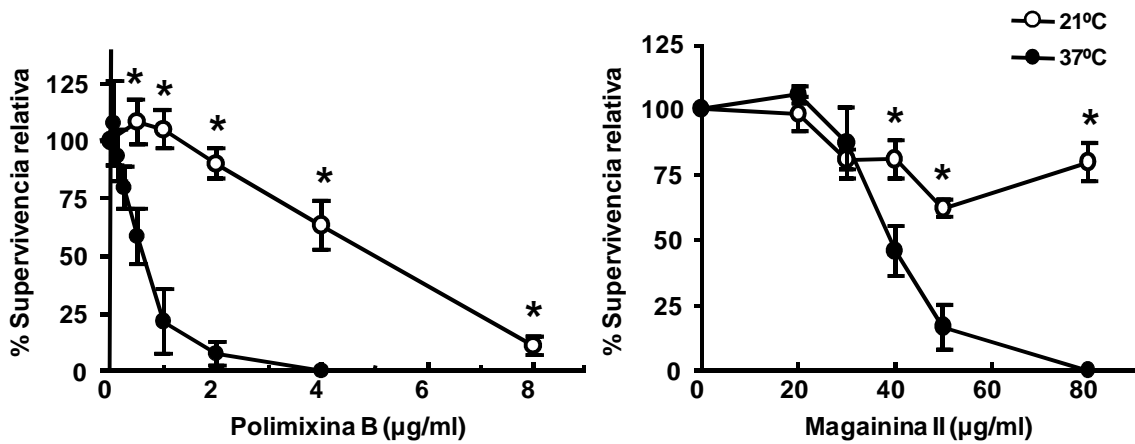


Figura 23. Sensibilidad de *Y. enterocolitica* O:8 dependiente de la temperatura frente a diferentes péptidos antimicrobianos. YeO8 fue crecida a 37°C (símbolos negros) y a 21°C (símbolos blancos) y fue expuesta a diferentes concentraciones de PxB y Magainina II. Cada punto de la gráfica representa la media y desviación estándar de ocho muestras procedentes de cuatro experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$; test *t* de Student de dos colas) en cuanto a supervivencia entre la bacteria crecida a 37°C y a 21°C

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de diferentes péptidos antimicrobianos para *Y. enterocolitica* O:8

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	CMI (µg/ml)	
	21°C	37°C
Polimixina B	3.2 ± 0.5	1.43 ± 0.2 *
Magainina II	45.4 ± 5.10	10.1 ± 3.0 *
HNP-1	27.10 ± 6.0	11.06 ± 0.07 *
Protamina	62.9 ± 12.2	8.11 ± 2.2 *
Magainina I	78.3 ± 1.5	6.5 ± 1.7 *

*, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) comparando las CMI de las dos temperaturas, para cada péptido ensayado.

1.2 Estructura del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 crecida a 21°C y a 37°C e identificación de los loci responsables de las modificaciones del lípido A.

Como se ha descrito en el apartado 2.2 de la Introducción, en el caso de las bacterias Gram negativas el primer paso en el mecanismo de acción antimicrobiana de los PAs consiste en la interacción electrostática entre ellos y las cargas negativas del LPS localizadas tanto en el lípido A como en el núcleo^{400,569}. Por lo tanto, no es de extrañar que las bacterias hayan desarrollado mecanismos de resistencia para evitar esta interacción⁴⁰³. Las estrategias mejor estudiadas son la presencia de cadena O^{103,430} y la adición de aminoarabinosa, fosfoetanolamina y palmitato al lípido A^{219,308,447,562,563}.

Por consiguiente, nos planteamos si cambios en la estructura del LPS explicarían la diferencia en susceptibilidad de YeO8 frente a los PAs según la temperatura. De hecho, estudios previos de nuestro laboratorio, ya demostraron que la expresión de la cadena O es menor a 37°C que a 21°C⁴⁷. Por consiguiente, pudiera ser que la temperatura también afectara a la expresión de las modificaciones del lípido A asociadas a la resistencia frente a los PAs. Con el fin de comprobar esta hipótesis, en primer lugar se caracterizaron los lípidos A de YeO8 crecida a 21°C y a 37°C mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Confirmando otros estudios realizados por nuestro grupo⁴²⁵, el lípido A de YeO8 crecida a 21°C contiene predominantemente una especie hexaacilada (m/z 1824) formada por dos glucosaminas, dos fosfatos, cuatro 3-OH-C14 como ácidos grasos principales, un C12 y un C16:1 (**Figura 24A**). El espectro de 21°C presenta otras especies de lípido A consistentes con la adición de aminoarabinosa (m/z 1955) y palmitato (m/z 2063) a la estructura hexaacilada mayoritaria (**Figura 24A**). A 37°C dichas modificaciones no están presentes (**Figura 24B**). A esta temperatura, el lípido A de YeO8 contiene una especie tetraacilada (m/z 1388) formada por dos glucosaminas, dos fosfatos, tres 3-OH-C14 como ácidos grasos principales y un C14 y una especie hexaacilada (m/z 1797) formada por dos glucosaminas, dos fosfatos, cuatro 3-OH-C14 como ácidos grasos principales, un C12 y un C14 (**Figura 24B**).

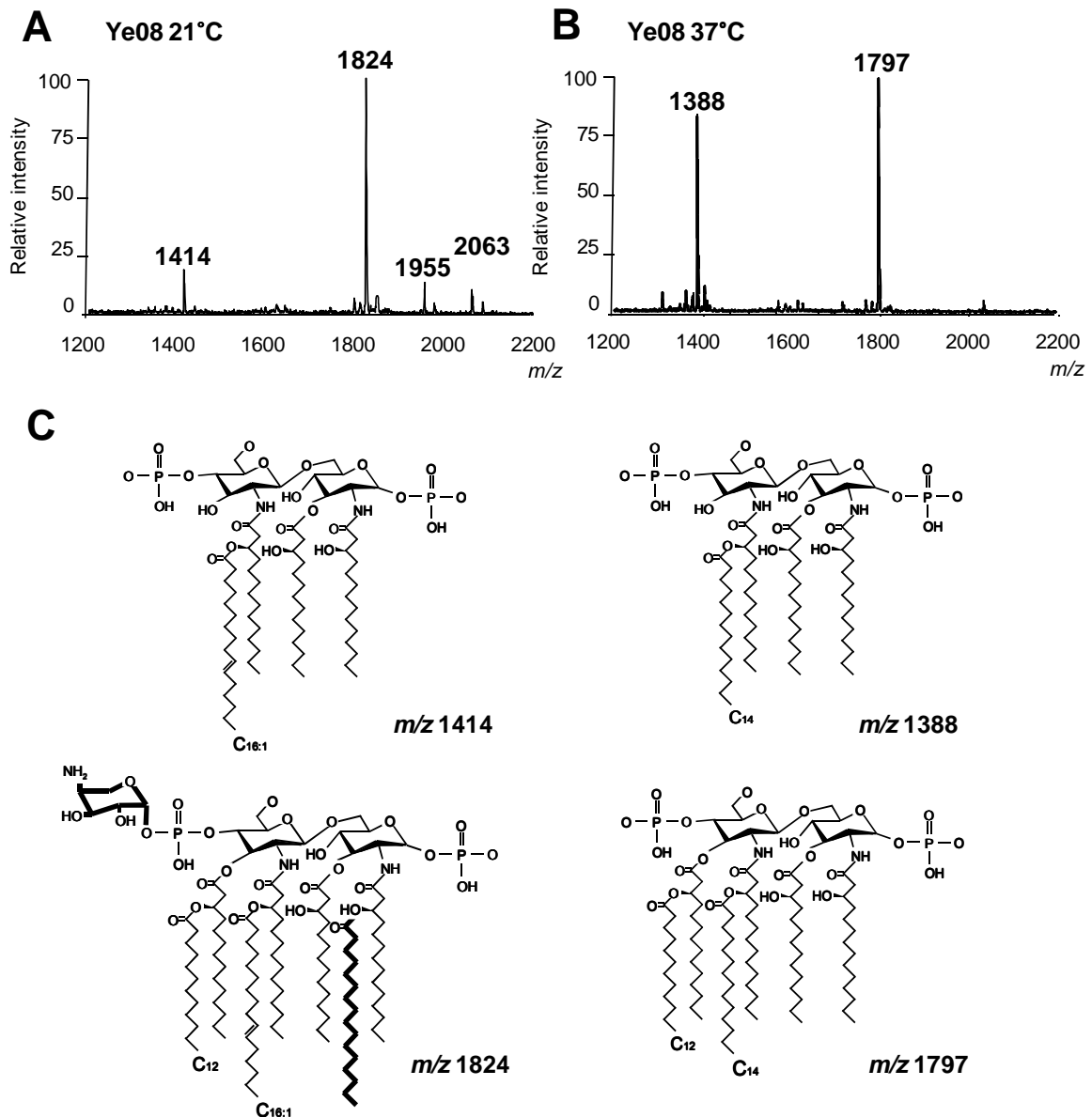


Figura 24. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído de *Y. enterocolitica* O:8 crecida a 21°C (A) y a 37°C (B). Los resultados en ambos paneles son representativos de tres extracciones independientes. (C) Representa las posibles estructuras de las especies principales de lípido A de los espectros. También se indica en negrita la posible adición de aminoarabinosa (m/z 131) y palmitato (m/z 239) a la especie hexaacilada (m/z 1824).

La adición de aminoarabinosa y palmitato aumenta la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos en diferentes bacterias⁴⁴⁷. La síntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A implica la actividad de las enzimas codificadas en el operón *pmrHFIJKLM* y el gen *ugd*⁵⁶³. El gen *pagP* es el que codifica la aciltransferasa que añade palmitato al lípido A²¹⁹. Para verificar si estos *loci*

eran los responsables de las modificaciones con aminoarabinosa y palmitato del lípido A de YeO8 a 21°C, se construyeron los mutantes *YeO8ΔpmrF*, *YeO8ΔpagP* y el doble mutante *YeO8ΔpmrF-ΔpagP* y se analizó la estructura de su lípido A a 21°C y a 37°C. Como se puede observar en la **Figura 25AC**, a 21°C los mutantes simples carecen de las especies de lípido A con aminoarabinosa y palmitato. El mutante doble, carece de las dos (**Figura 25E**). A 37°C (**Figura 25BDF**) los lípidos A de los mutantes son similares que aquel de YeO8 a la misma temperatura.

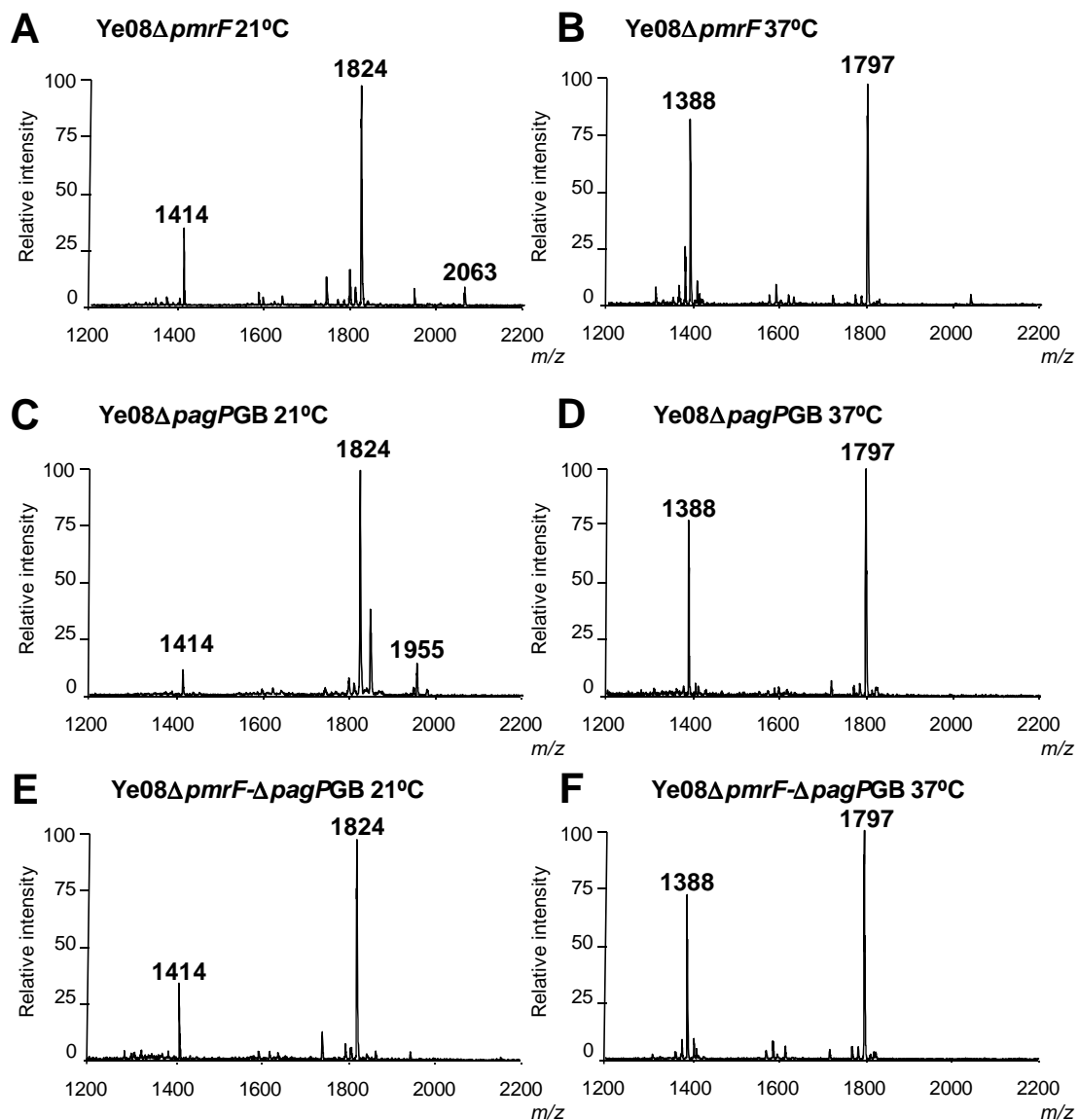


Figura 25. Estructura del lípido A de *YeO8ΔpmrF*, *YeO8ΔpagP* y *YeO8ΔpmrF-ΔpagP*. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído de *YeO8ΔpmrF* crecido a 21°C (**A**) y a 37°C (**B**), de *YeO8ΔpagP* crecido a 21°C (**C**) y a 37°C (**D**) y *YeO8ΔpmrF-ΔpagP* crecido a 21°C (**E**) y a 37°C (**F**). Los resultados de los paneles son representativos de tres extracciones independientes.

A continuación, se estudió si la temperatura regulaba la transcripción de los *loci* responsables de las modificaciones del lípido A. Para ello, se construyeron cuatro fusiones transcripcionales en las que el gen de la luciferasa se encontraba bajo el control de las regiones promotoras del operón *pmrH*, el gen *ugd* y el gen *pagP* (materiales y métodos apartado 4 y 13). Estas fusiones transcripcionales se introdujeron en el cromosoma de YeO8 y se midió la cantidad de luz producida al crecer la bacteria a 21°C y 37°C. La **Figura 26** muestra que el nivel de expresión de *pmrH*, *ugd* y *pagP* fue mayor a 21°C que a 37°C.

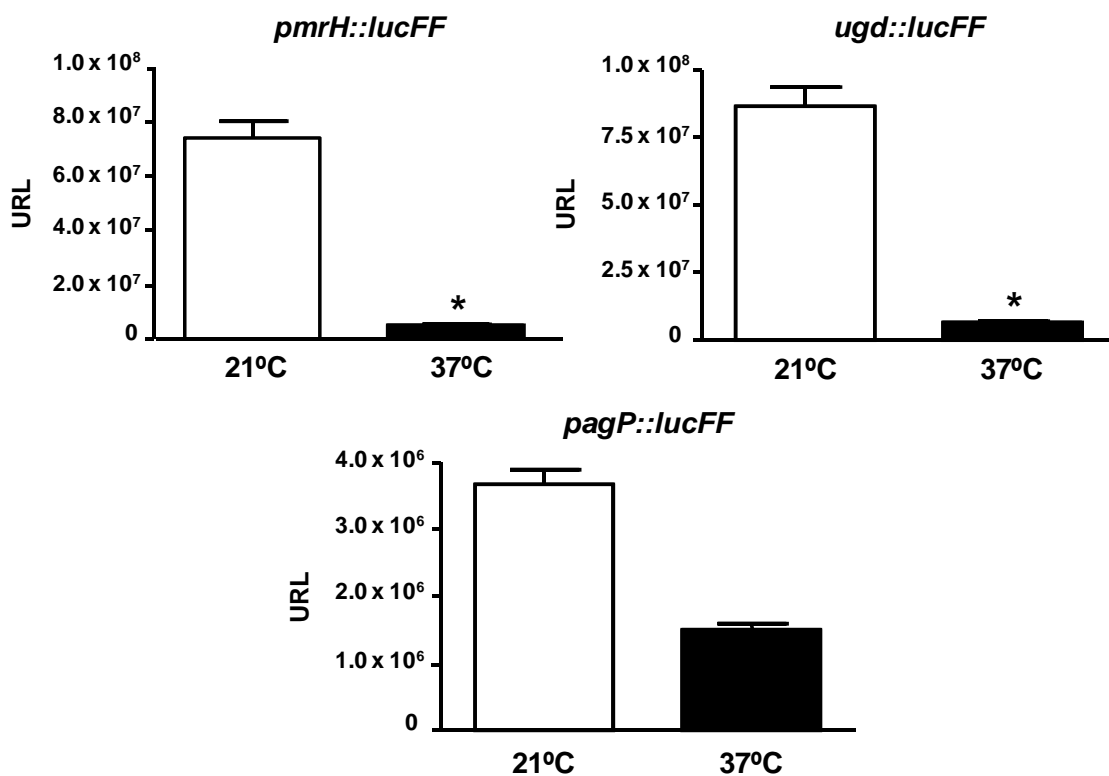


Figura 26. La expresión del operón *pmrH* y los genes *ugd* y *pagP* está regulada por la temperatura. Análisis de la expresión de los genes responsables de las modificaciones del lípido A midiendo la actividad luciferasa de las fusiones transcripcionales *pmrH:lucFF*, *ugd:lucFF* y *pagP:lucFF* en YeO8 crecida a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por quintuplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la bacteria crecida a 21°C.

1.3 Las variaciones de la estructura del LPS de *Y. enterocolitica* O:8 según la temperatura explican la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos.

Como se ha dicho anteriormente, la presencia cadena O es un factor implicado en la resistencia frente a los PAs debido al impedimento estérico que ésta representa en la accesibilidad del PAs a las dianas presentes en el núcleo y lípido A^{103,430}.

Con el objetivo de definir la contribución relativa de la cadena O y de las modificaciones del lípido A en la resistencia frente a los PAs, se realizaron ensayos de supervivencia a PxB con el mutante *YeO8ΔmanC* (carece de cadena O), el mutante *YeO8ΔpmrF* y el doble mutante *YeO8ΔmanC-ΔpmrF* a 21°C y a 37°C. Cuando las bacterias se crecieron a 21°C, los mutantes simples, *YeO8ΔpmrF* y *YeO8ΔmanC*, fueron más susceptibles que la cepa silvestre (**Figura 27A**). No se observaron diferencias significativas entre ambos mutantes. El doble mutante, *YeO8ΔmanC-ΔpmrF*, fue la cepa más sensible (**Figura 27A**). Cuando se crecieron las bacterias a 37°C, no se observaron diferencias significativas entre la cepa silvestre, el mutante *YeO8ΔpmrF* y el mutante *YeO8ΔmanC*. El doble mutante *YeO8ΔpmrF-ΔmanC*, sin embargo, fue el más sensible (**Figura 27B**) y su porcentaje de supervivencia fue menor a 37°C que a 21°C (**Figura 27C**).

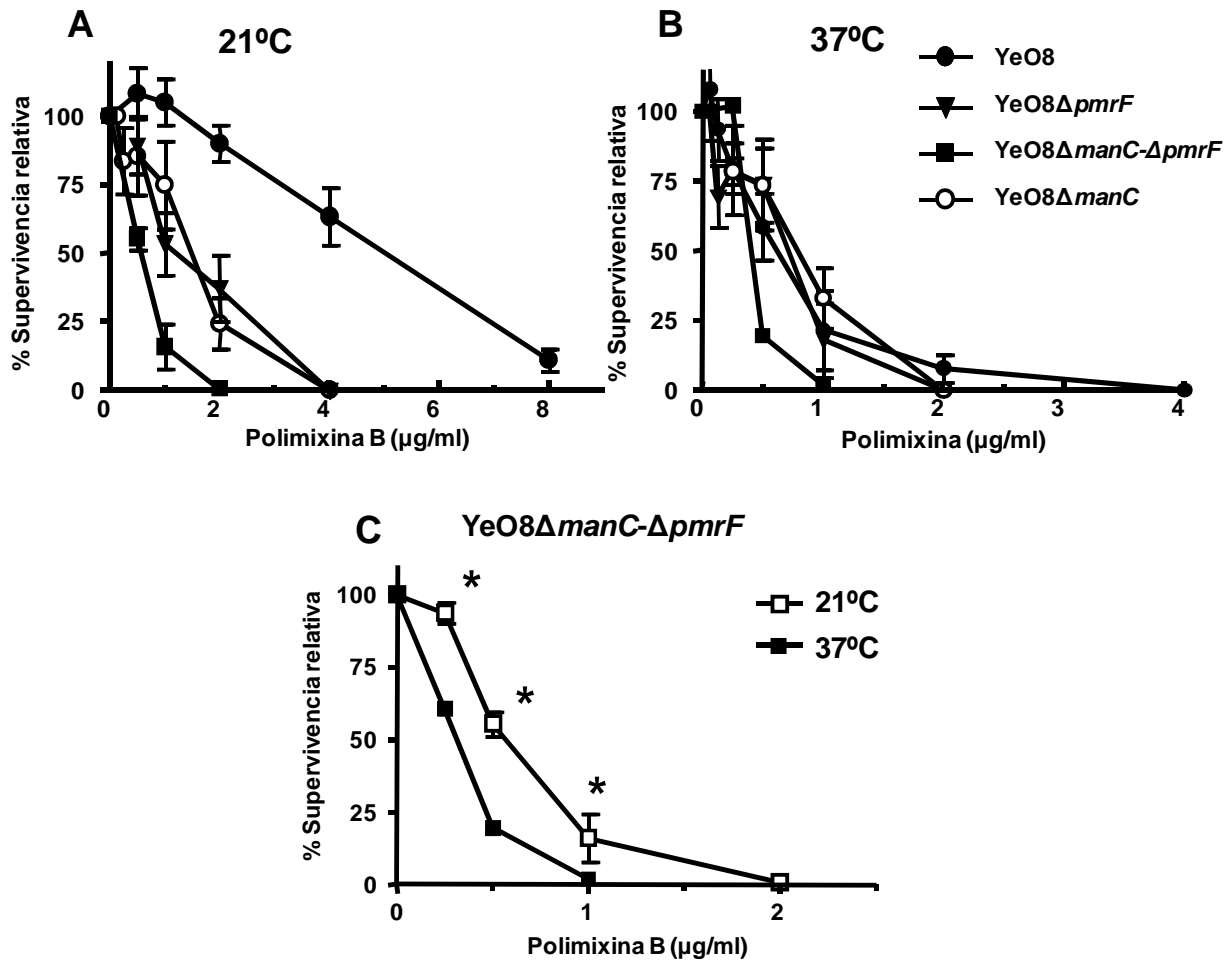


Figura 27. Papel de la cadena O y la adición de aminoarabinosa al lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 en la resistencia frente a la PxB. La cepa silvestre YeO8 (●) y los mutantes YeO8ΔmanC (○), YeO8ΔpmrF (▼) y YeO8ΔmanC-ΔpmrF (■) se crecieron a 21°C (A) y a 37°C (B) y fueron expuestos a diferentes concentraciones de PxB. Cada punto de la gráfica representa la media y desviación estándar de ocho muestras procedentes de cuatro experimentos independientes. (C) Mutante YeO8ΔmanC-ΔpmrF crecido a 21°C (símbolos blancos) y a 37°C (símbolos negros) expuesto a diferentes concentraciones de PxB. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test t de Student de dos colas) con respecto a la bacteria crecida a 21°C.

La adición de palmitato al lípido A no está implicada en la resistencia frente a la PxB^{219,317}. De hecho, en los ensayos de supervivencia con PxB, el mutante YeO8ΔpagP fue tan susceptible como la cepa silvestre, tanto a 21°C como a 37°C (resultados no mostrados). No obstante, esta modificación del lípido A sí juega un papel importante frente a otro tipo de péptidos como la magainina II²¹⁹. En los ensayos de supervivencia con magainina II, el mutante

YeO8 Δ pagP fue significativamente más sensible que YeO8 (**Figura 28**) a 21°C. La complementación del mutante YeO8 Δ pagP con pTMYepagP restauró la sensibilidad del mutante a niveles de la cepa silvestre (resultados no mostrados). Por su parte, el mutante YeO8 Δ manC también fue más sensible a la magainina II que YeO8. El doble mutante YeO8 Δ manC- Δ pagP fue la cepa más sensible (**Figura 28**). La complementación del doble mutante YeO8 Δ manC- Δ pagP con pTMYepagP restauró su sensibilidad a los niveles del mutante YeO8 Δ manC (resultados no mostrados). Cuando se crecieron las cepas a 37°C no se observaron diferencias significativas entre YeO8, el mutante YeO8 Δ pagP y el mutante YeO8 Δ manC. El mutante doble fue la cepa más sensible también a esta temperatura (**Figura 28**). La complementación del mutante YeO8 Δ manC- Δ pagP con pTMYepagP también restauró su sensibilidad a los niveles del mutante YeO8 Δ manC a 37°C (resultados no mostrados). Todas las cepas fueron más susceptibles frente a la magainina II a 37°C que a 21°C.

En resumen, todos estos resultados indican que tanto la presencia de cadena O como las modificaciones del lípido A tienen un papel en la resistencia dependiente de la temperatura de YeO8 frente a los PAs.

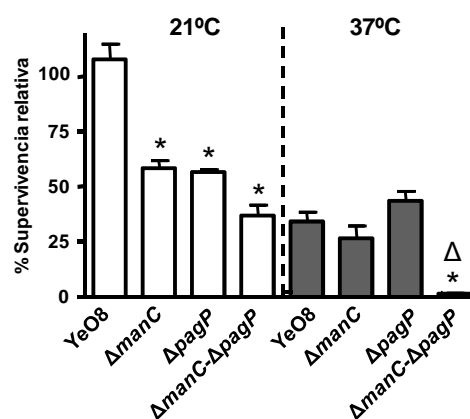


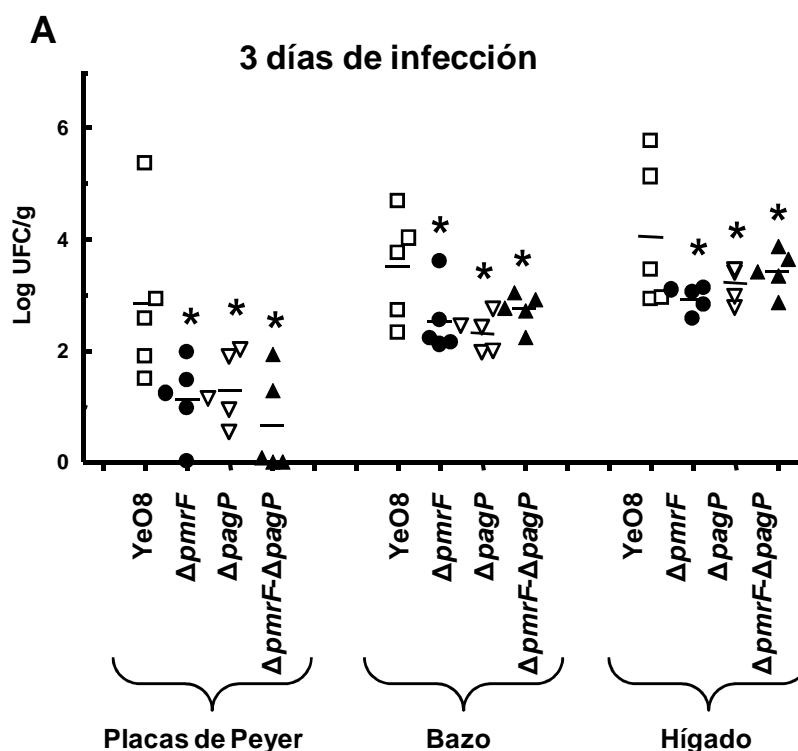
Figura 28. Papel de la cadena O y la adición de palmitato al lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 en la resistencia frente a magainina II. La cepa silvestre y los mutantes YeO8 Δ pagP, YeO8 Δ manC y YeO8 Δ manC- Δ pagP fueron crecidos a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras grises) y expuestos a una concentración de 40 μ g/ml de magainina II. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de cinco experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test t de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre a la misma temperatura. Δ , indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test t de Student de dos colas) con respecto a la misma cepa crecida a 21°C.

1.4 La adición de aminoarabinosa y palmitato al lípido A tienen un papel en la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8

Para analizar la implicación de las modificaciones del lípido A en la virulencia de YeO8 se infectaron oralmente ratones BALB/c con aproximadamente 3×10^7 ufc de las distintas cepas (6×10^7 ufc de YeO8, $2,2 \times 10^7$ de YeO8 $\Delta pmrF$, $4,1 \times 10^7$ de YeO8 $\Delta pagPGB$ y $3,5 \times 10^7$ de YeO8 $\Delta pmrF\Delta pagP$) y se determinó la carga bacteriana en las placas de Peyer, en el hígado y en el bazo a los tres y siete días post-infección.

A los tres días post-infección, todas las cepas colonizaron las placas de Peyer aunque la carga bacteriana de los mutantes fue menor que la de la cepa silvestre (**Figura 29A**). Este mismo hecho ocurrió tanto en el hígado como en el bazo. La carga bacteriana de los tres mutantes no fue significativamente diferente en cada tejido (**Figura 29A**).

A los siete días post-infección, la carga bacteriana de los tres mutantes del lípido A en las placas de Peyer, el hígado y el bazo fue significativamente menor que la carga de la cepa silvestre en los mismos órganos (**Figura 29B**). Los mutantes YeO8 $\Delta pmrF$ y YeO8 $\Delta pagGB$ presentaron cargas bacterianas no significativamente diferentes entre ellas, y sólo el mutante doble YeO8 $\Delta pmrF\Delta pagP$ presentó diferencias significativas con respecto a los demás mutantes en todos los tejidos.



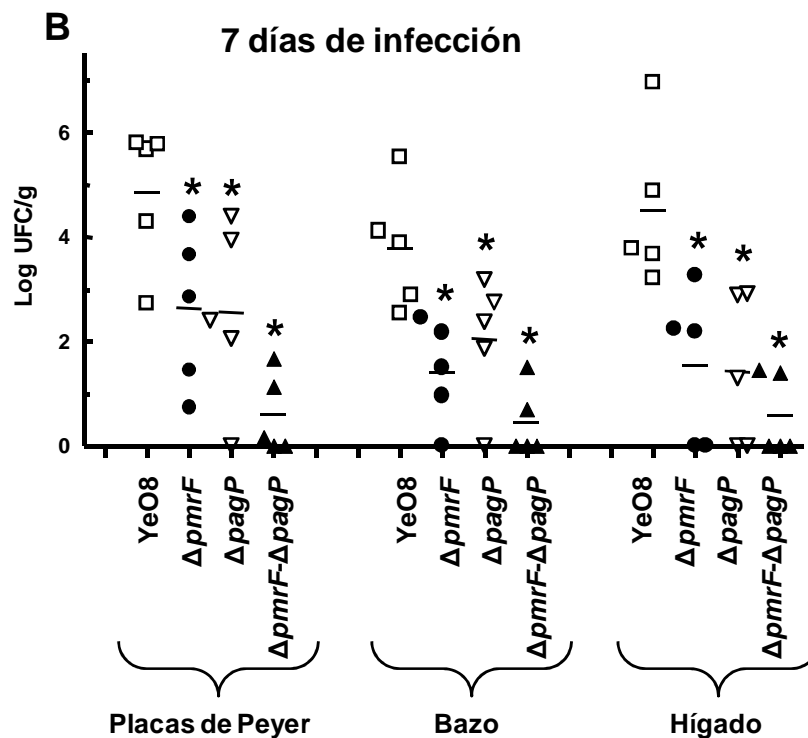


Figura 29. Virulencia de los mutantes de lípido A de *Y. enterocolitica* O:8. Presencia de bacterias en distintos órganos del ratón a los tres (A) y siete días (B) tras la infección oral. Los resultados están expresados como Log UFC por gramo de tejido (Log ufc/g) (YeO8, □), YeO8ΔpmrF (ΔpmrF, ●), YeO8ΔpagPGB (ΔpagP, ▽) y YeO8ΔpmrF-ΔpagPGB (ΔpmrF-ΔpagP, ▲). *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$ ANOVA de una cola) con respecto a la cepa silvestre para un mismo tejido.

1.5 Efecto de la temperatura sobre los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB los cuales regulan las modificaciones del lípido A.

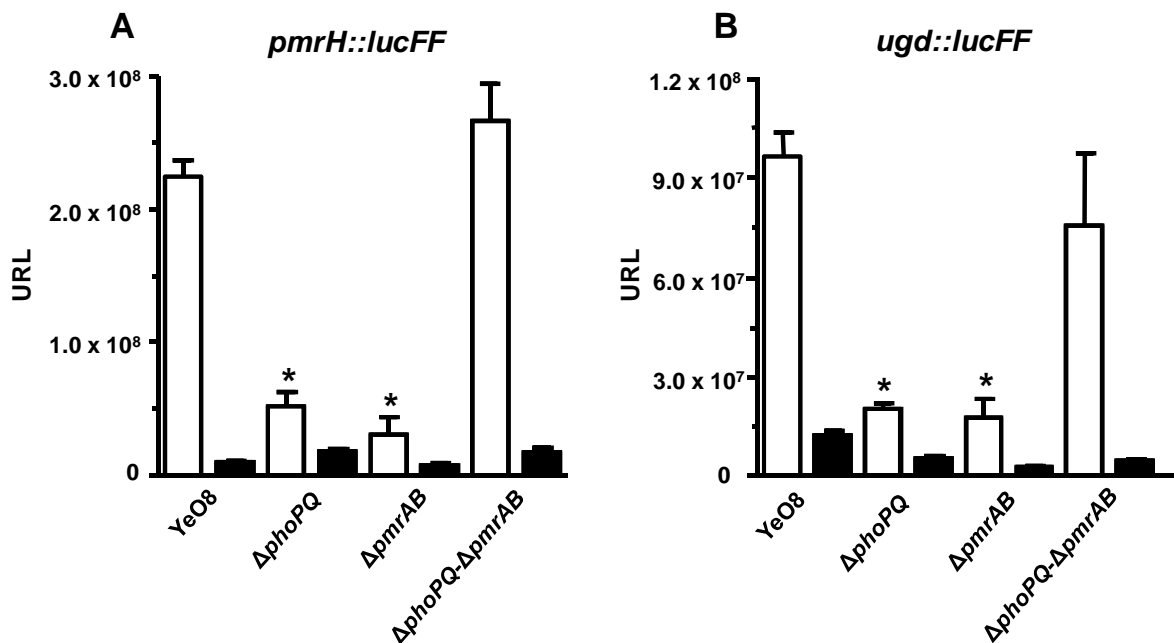
Con el fin de determinar los elementos implicados en la regulación de las modificaciones del lípido A por la temperatura, quisimos comprobar si los sistemas reguladores de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB jugaban algún papel. Ya ha sido descrito que estos sistemas regulan la expresión de *pagP*, *ugd* y del operón *pmrH* en *S. enterica* y *K. pneumoniae*^{199,217,219,299,317}.

Se identificaron en el genoma de YeO8⁵⁵⁴ los genes homólogos de *pmrAB* y *phoPQ* (YE0423-YE0422; YE1718-YE1717, respectivamente) (**Tabla 8, Anexo III**). En *Salmonella*, el sistema de regulación PmrA/PmrB está codificado en el operón *pmrCAB*. Su expresión se debe a la existencia de dos promotores, uno activado por PmrA situado antes del gen *pmrC* y otro promotor

constitutivo situado en la región codificante de *pmrC*⁶⁰³. Sin embargo, en *Yersinia*, los genes *pmrAB* se transcriben conjuntamente con el gen *dacB* localizado en dirección 5' del operón (en primera posición del operón)³³⁷.

Para estudiar si estos sistemas de regulación controlaban las modificaciones del lípido A en YeO8, se determinó la expresión del operón *pmrH* y los genes *ugd* y *pagP* en los mutantes YeO8 Δ *phoPQ*, YeO8 Δ *pmrAB*, y el doble mutante YeO8 Δ *phoPQ*- Δ *pmrAB*. A 21°C, la expresión de los tres *loci* fue menor en los mutantes YeO8 Δ *phoPQ*, YeO8 Δ *pmrAB* que en la cepa silvestre (**Figura 30A-C**). En cambio, sorprendentemente, la expresión de estas tres fusiones transcripcionales alcanzó los niveles de la cepa silvestre en el fondo genético del mutante doble YeO8 Δ *phoPQ*- Δ *pmrAB* (**Figura 30A-C**). A 37°C, la expresión de las tres fusiones fue similar en todas las cepas (**Figura 30A-C**).

Estos resultados sugieren que los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB ejercen una regulación positiva sobre la expresión del operón *pmrH*, el gen *ugd*, y el gen *pagP* sólo a 21°C.



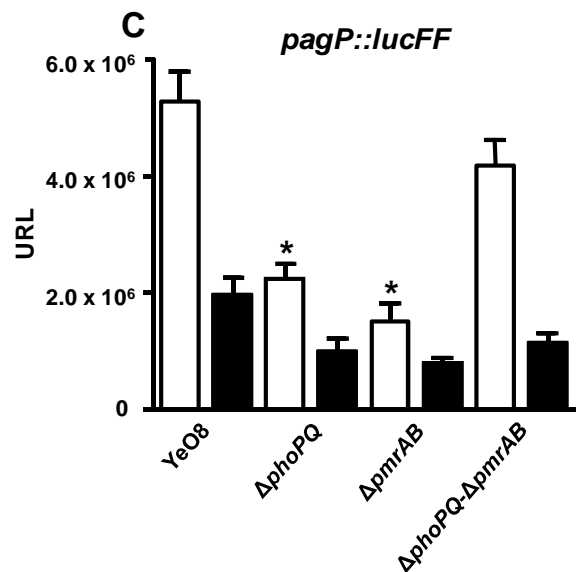


Figura 30. Regulación de la expresión de *pmrF*, *ugd* y *pagP* por parte de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB. Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales *pmrH::lucFF* (A), *ugd::lucFF* (B) y *pagP::lucFF* (C) en la cepa silvestre (YeO8), y los mutantes YeO8Δ*phoPQ* (Δ*phoPQ*), YeO8Δ*pmrAB* (Δ*pmrAB*), YeO8Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB* (Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB*). Las cepas fueron crecidas tanto a 21°C (barras blancas) como a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a la misma temperatura.

A continuación, se estudió si la expresión de los sistemas reguladores pudiera estar a su vez regulada por la temperatura. Para comprobarlo, se construyeron dos fusiones transcripcionales para medir la expresión de *phoPQ* y *dacB* en YeO8 crecida tanto a 21°C como a 37°C. Apoyando nuestra hipótesis, los dos sistemas reguladores están regulados por la temperatura, expresándose más a 21°C que a 37°C. (Figura 31 AB)

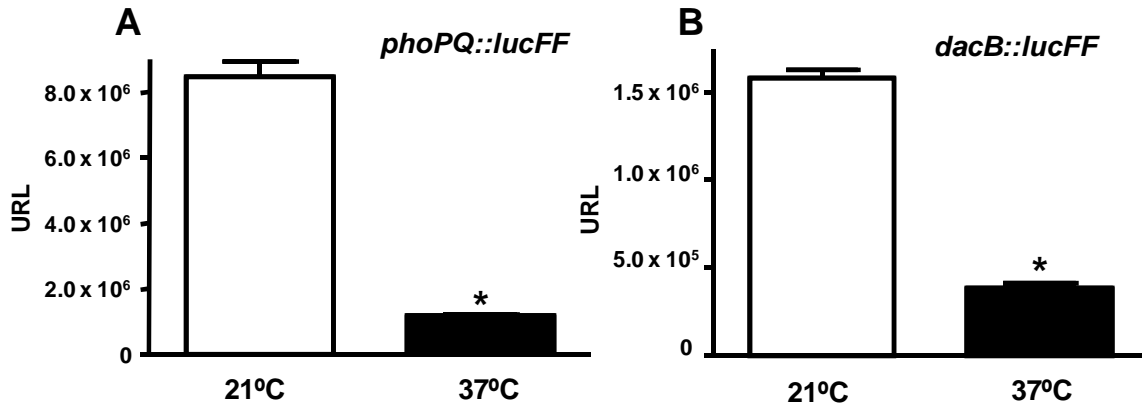


Figura 31. La expresión de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB está regulada por la temperatura. Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales *phoP::lucFF* (A), *dacB::lucFF* (B) en YeO8 crecida tanto a 21°C (barras blancas) como a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la bacteria crecida a 21°C.

1.6 RovA y H-NS regulan los loci necesarios para las modificaciones del lípido A.

El regulador transcripcional RovA es tal vez el regulador mejor estudiado en *Yersinia*. La evidencia indica que RovA actúa desplazando a H-NS de las regiones promotoras, aliviando, por tanto, la represión ejercida por H-NS³⁰⁶. Este modelo se ha descrito tanto en *Y. enterocolitica* como en *Y. pseudotuberculosis* siendo el paradigma la regulación de Invasin. A 37°C su expresión se encuentra inhibida por el complejo H-NS-YmoA, en cambio, a 21°C, RovA se expresa a un nivel suficiente para poder desplazar a H-NS-YmoA y unirse a la región promotora de *inv* activando su expresión^{170,240,387,398}. A su vez, la expresión de *rovA* está regulada por la temperatura siendo mayor a 21°C que a 37°C^{458,568}. Considerando todo esto, nos planteamos si la regulación por la temperatura de los *loci* responsables de las modificaciones del lípido A podría ser explicada de igual manera que en el caso de Invasin.

En primer lugar, se comprobó si RovA regulaba la expresión del operón *pmrH* y los genes *ugd* y *pagP*. Así, se introdujeron las respectivas fusiones transcripcionales en el mutante *rovA* y se midió la expresión a 21°C y a 37°C. Como se puede observar en la **Figura 32**, la expresión de todos los genes fue

significativamente menor en el mutante *rovA* comparado con YeO8. Además, también se determinó la expresión de los sistemas reguladores PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB en el mutante *rovA*. En ambos casos, la expresión fue inferior en el fondo genético del mutante *rovA* que en la cepa silvestre (**Figura 33**).

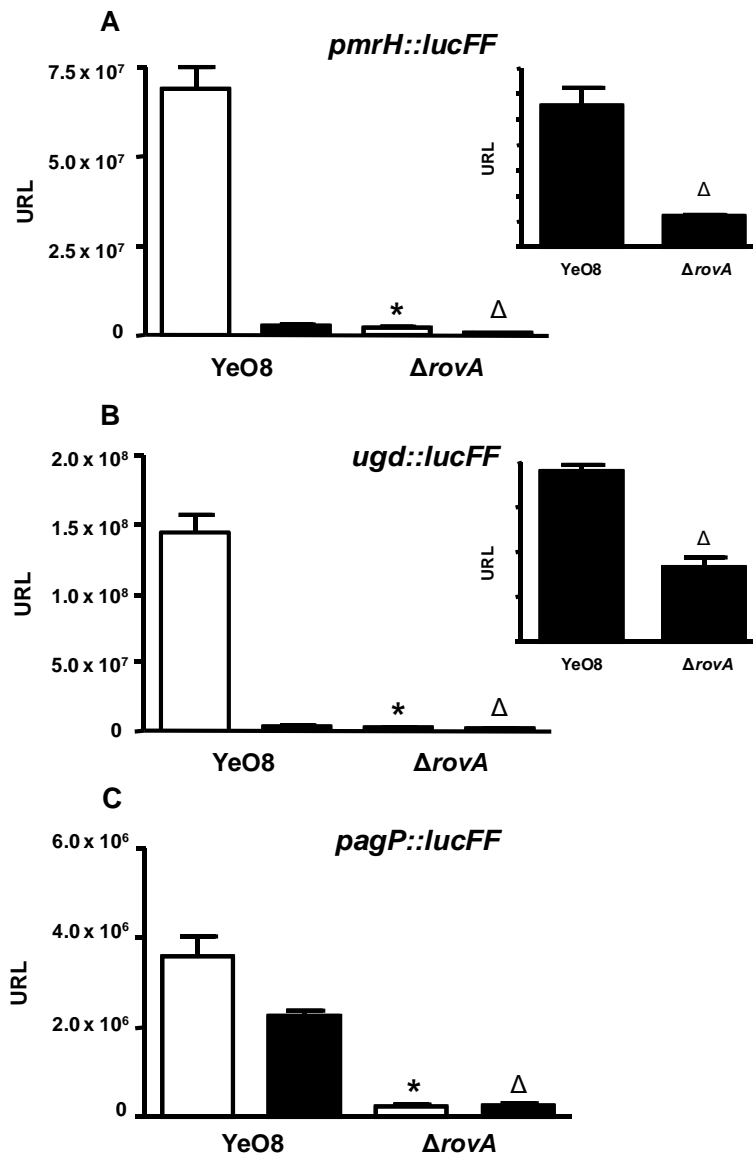


Figura 32. RovA regula los genes de *Y. enterocolitica* O:8 necesarios para las modificaciones del lípido A. Análisis de la expresión de *pmrH::lucFF* (A), *ugd::lucFF* (B) y *pagP::lucFF* (C) en YeO8 (YeO8) y en el mutante *rovA* (Δ rovA) crecidos a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a 21°C. Δ , indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a 37°C

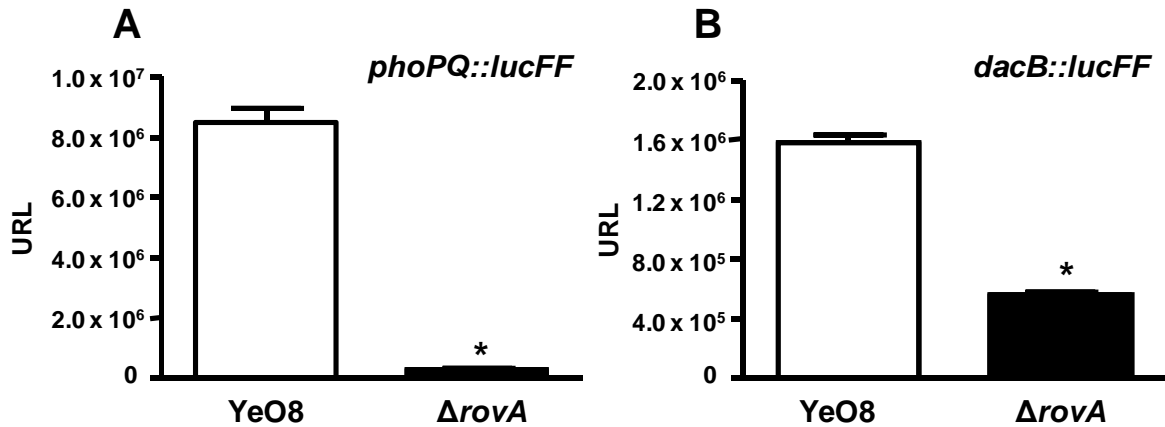
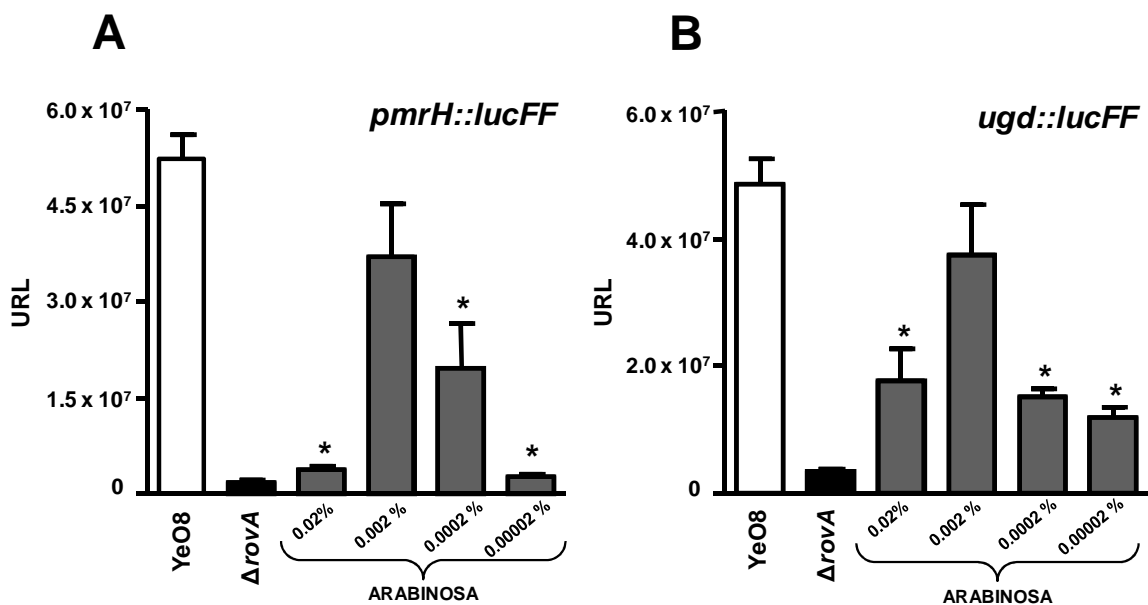


Figura 33. RovA regula la expresión de los sistemas de regulación PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB. Análisis de la expresión de *phoP::lucFF* (A), *dacB::lucFF* (B) en YeO8 (YeO8, barras blancas) y en el mutante *rovA* ($\Delta rovA$, barras negras). Las bacterias fueron crecidas a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a YeO8.

A continuación, se trató de complementar el mutante *rovA* con el plásmido pBAD_{RovA} (ver materiales y métodos página apartado 3.2). La inducción del promotor pBAD con arabinosa (0.002 % [peso/volumen]) restableció la expresión de todas las fusiones transcripcionales a los niveles de la cepa silvestre (**Figura 34**).



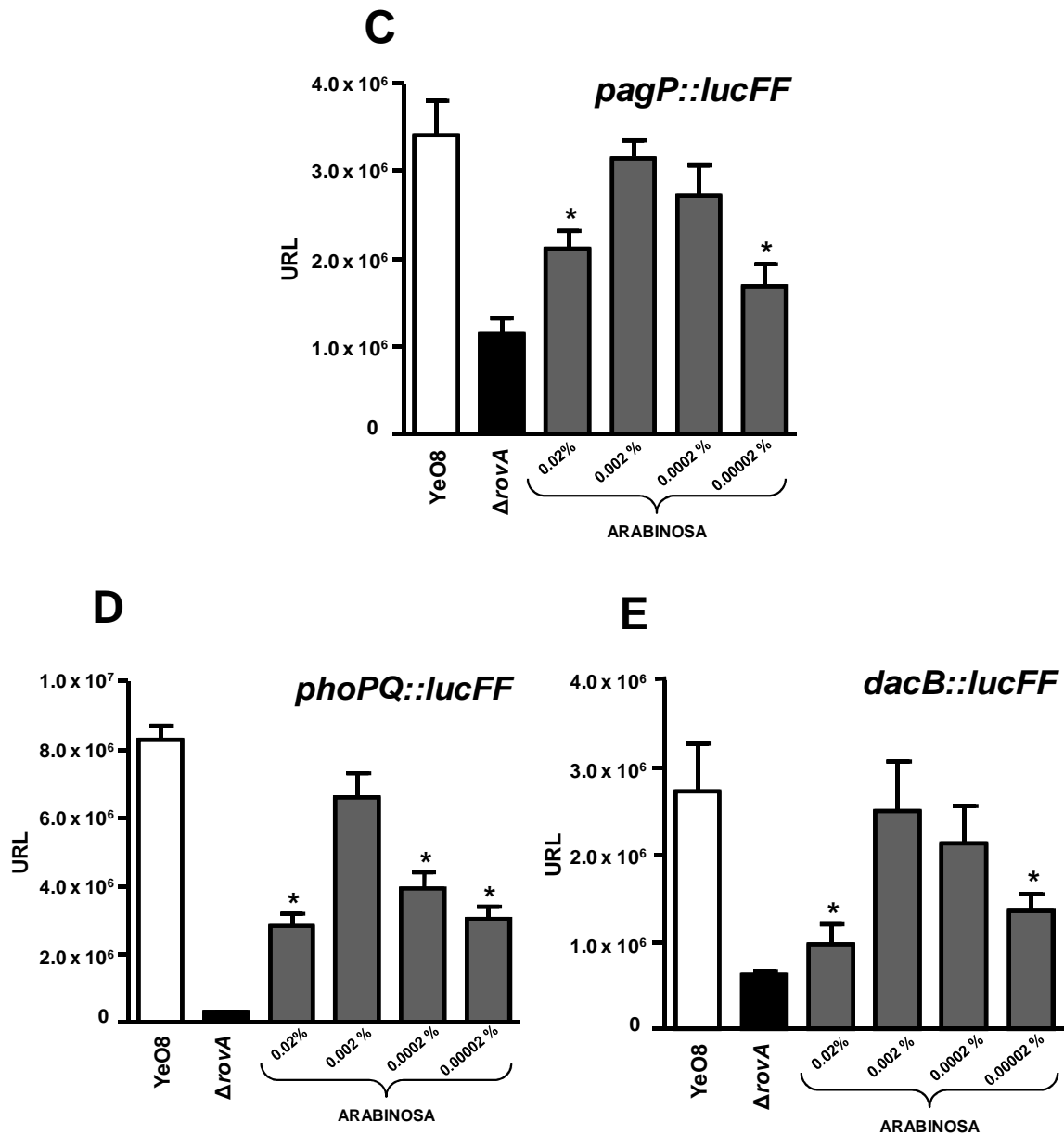


Figura 34. Complementación del mutante *rovA* con el plásmido pBADYeO8RovA. Se añadieron diferentes concentraciones de arabinosa (0.02%, 0.002%, 0.0002%, 0.00002% peso/volumen, barras grises) al cultivo y se analizó la expresión de *pmrH::lucFF*, *ugd::lucFF*, *pagP::lucFF*, *phoP::lucFF* y *dacB::lucFF* de la bacteria crecida a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a YeO8.

En su conjunto, todos estos resultados indican que RovA controla positivamente la expresión de los *loci* encargados de las modificaciones del lípido A incluyendo sus sistemas reguladores PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB.

Más aún, todos estos resultados concuerdan con el espectro de masas que presentaba el mutante *rovA* a 21°C (**Figura 35A**). Como se puede observar, las especies de lípido A substituidas con aminoarabinosa y palmitato están ausentes, lo que concuerda con los bajos niveles de expresión de los genes responsables de dichas modificaciones en el fondo genético del mutante *rovA*.

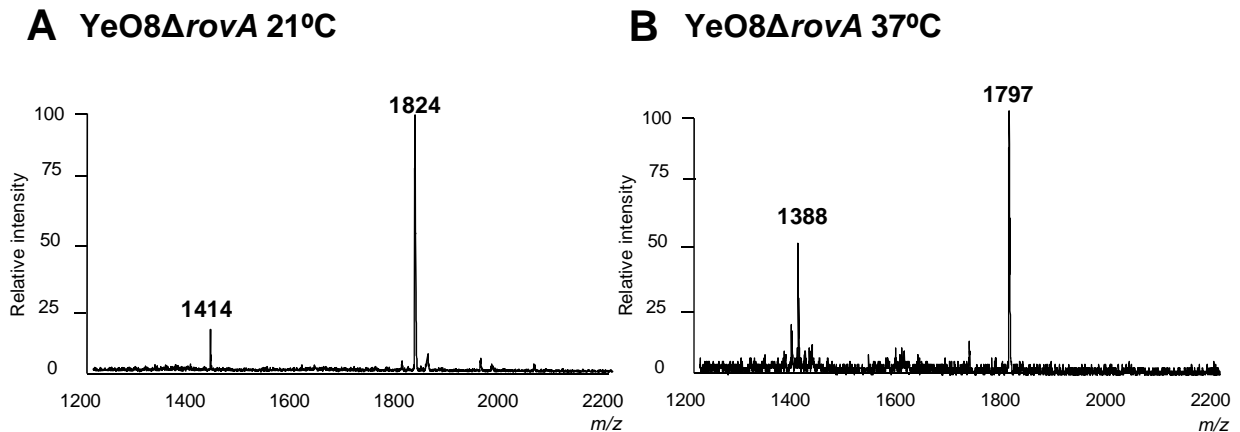


Figura 35. Estructura del lípido A del mutante *rovA*. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído del mutante *rovA* crecido a 21°C (**A**) y a 37°C (**B**). Los resultados de los dos paneles corresponden al análisis del lípido A de tres extracciones independientes.

Las CMI de la PxB y de la magainina II para el mutante *rovA* fueron significativamente menores que para YeO8 a 21°C (**Tabla 9 y 10**). En cambio, a 37°C todas las CMI fueron similares. La CMI de la PxB del mutante YeO8Δ*rovA*-Δ*pmrF* fue similar a la del mutante simple YeO8Δ*pmrF* (**Tabla 9**). Tampoco se encontraron diferencias entre en la CMI de la magainina II del doble mutante YeO8Δ*rovA*-Δ*pagP* y el simple YeO8Δ*pagP* (**Tabla 10**). Estos resultados sugieren que únicamente el operón *pmrH* y el gen *pagP*, ambos regulados por RovA, son los responsables de la mayor resistencia de YeO8 a la PxB y la magainina II.

Tabla 9. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de PxB para YeO8, YeO8 Δ rovA, YeO8 Δ pmrF y YeO8 Δ rovA- Δ pmrF

Cepas	CMI PxB (μ g/ml)	
	21°C	37°C
YeO8	3.2 \pm 0.5	1.43 \pm 0.4
YeO8 Δ rovA	1.8 \pm 0.4 *	1.3 \pm 0.5
YeO8 Δ pmrF	1.8 \pm 0.7 *	-
YeO8 Δ rovA- Δ pmrF	1.72 \pm 0.4 *	-

*, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) comparado con la cepa silvestre a la misma temperatura

Tabla 10. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de magainina II para YeO8, YeO8 Δ rovA, YeO8 Δ pagP y YeO8 Δ rovA- Δ pagP.

Cepas	CMI magainina II (μ g/ml)	
	21°C	37°C
YeO8	45.4 \pm 5.1	10.1 \pm 3
YeO8 Δ rovA	28.4 \pm 0.4 *	11.5 \pm 0.9
YeO8 Δ pagP	23.17 \pm 0.9 *	-
YeO8 Δ rovA- Δ pagP	26.01 \pm 0.4 *	-

*, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) comparado con la cepa silvestre a la misma temperatura.

Por otro lado, nos planteamos comprobar si los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB pudieran regular a RovA. Para abordar esta pregunta, se midió la expresión de la fusión transcripcional *rovA::lucFF* en los mutantes YeO8 Δ phoPQ, YeO8 Δ pmrAB y YeO8 Δ phoPQ- Δ pmrAB. En la **Figura 36** se

puede observar que la expresión de *rovA* está disminuida en los mutantes simples siendo en el mutante *YeO8ΔphoPQ* donde la expresión de *rovA* es más baja.

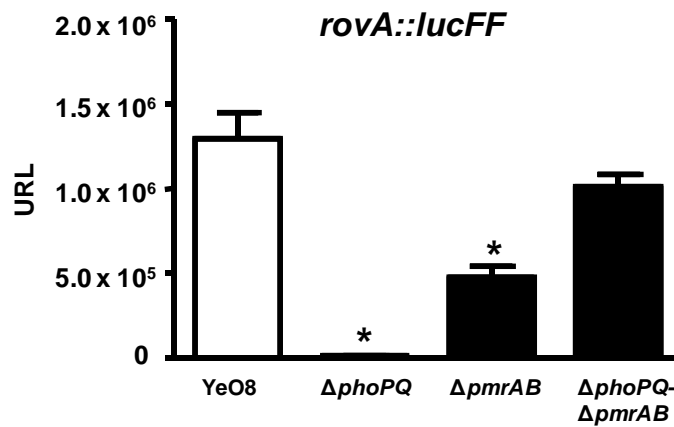


Figura 36. Los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB regulan la expresión de *rovA* en *Y. enterocolitica* O:8. Análisis de la expresión de *rovA* en *YeO8*, en *YeO8ΔphoPQ* ($\Delta phoPQ$), en *YeO8ΔpmrAB* ($\Delta pmrAB$) y en *YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB* ($\Delta phoPQ-\Delta pmrAB$) crecidos a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a *YeO8*.

Señalar que en el mutante doble *YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB* la expresión de *rovA* alcanzó niveles similares a los encontrados en la cepa silvestre. Por tanto, se planteó la posibilidad de que la elevada expresión de *rovA* en el mutante doble fuera la responsable de que el operón *pmrF* y los genes *ugd* y *pagP*, presentaran unos niveles de expresión elevados en este doble mutante, ya que *RovA* actúa como regulador positivo de los mismos. (Figura 32). Para confirmar esta hipótesis se construyó el triple mutante *YeO8ΔrovA-phoPQ-pmrAB* y se midió la expresión de *pmrH::lucFF*, *ugd::lucFF* y *pagP::lucFF*. Como se puede observar en la Figura 37, la expresión de los tres loci fue inferior en el triple mutante que en el mutante doble *phoPQ-pmrAB*. En el caso de *pmrH* y *pagP*, ambos loci presentaron unos niveles de expresión significativamente inferiores en el mutante triple comparado con el mutante simple *rovA* (Figura 37).

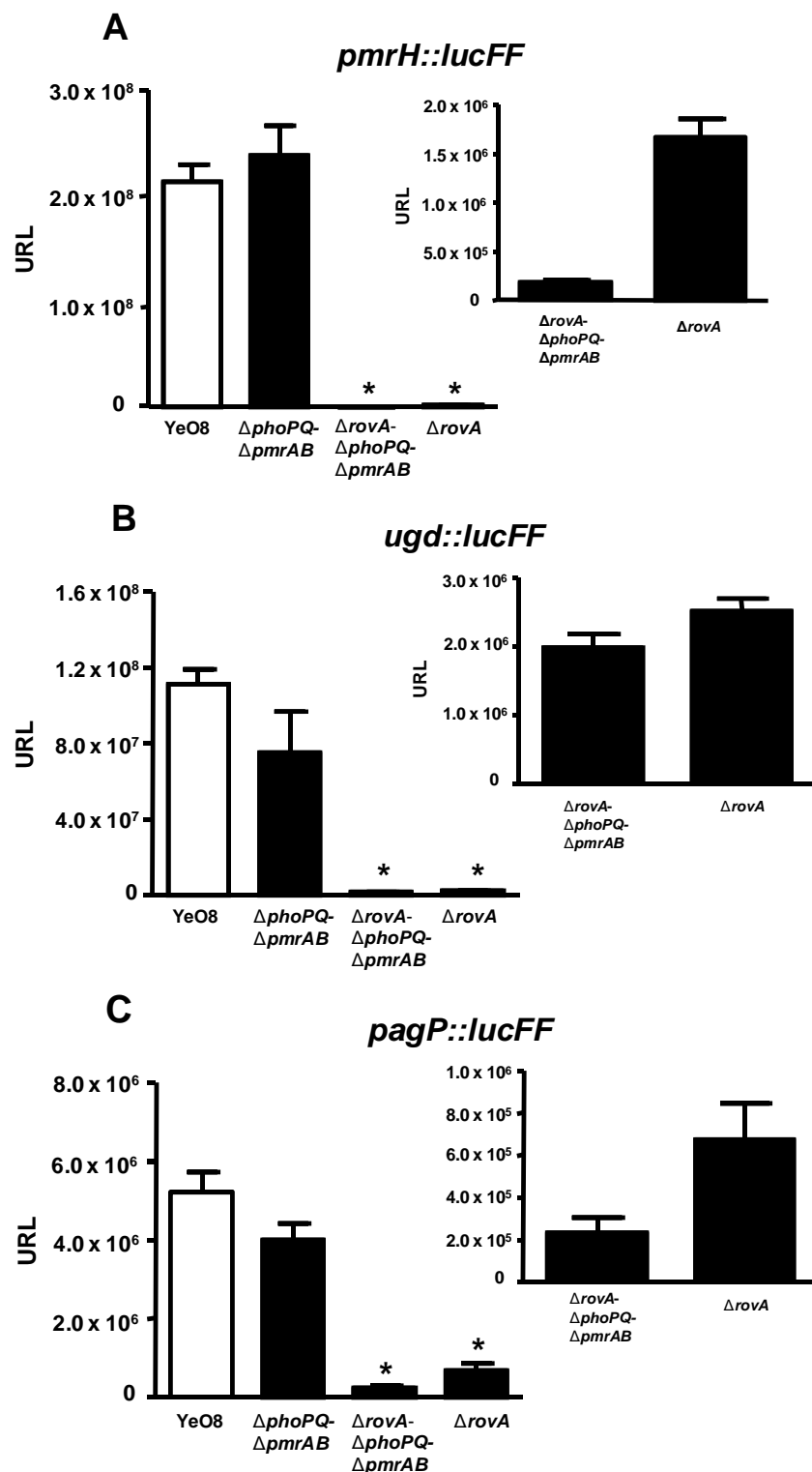
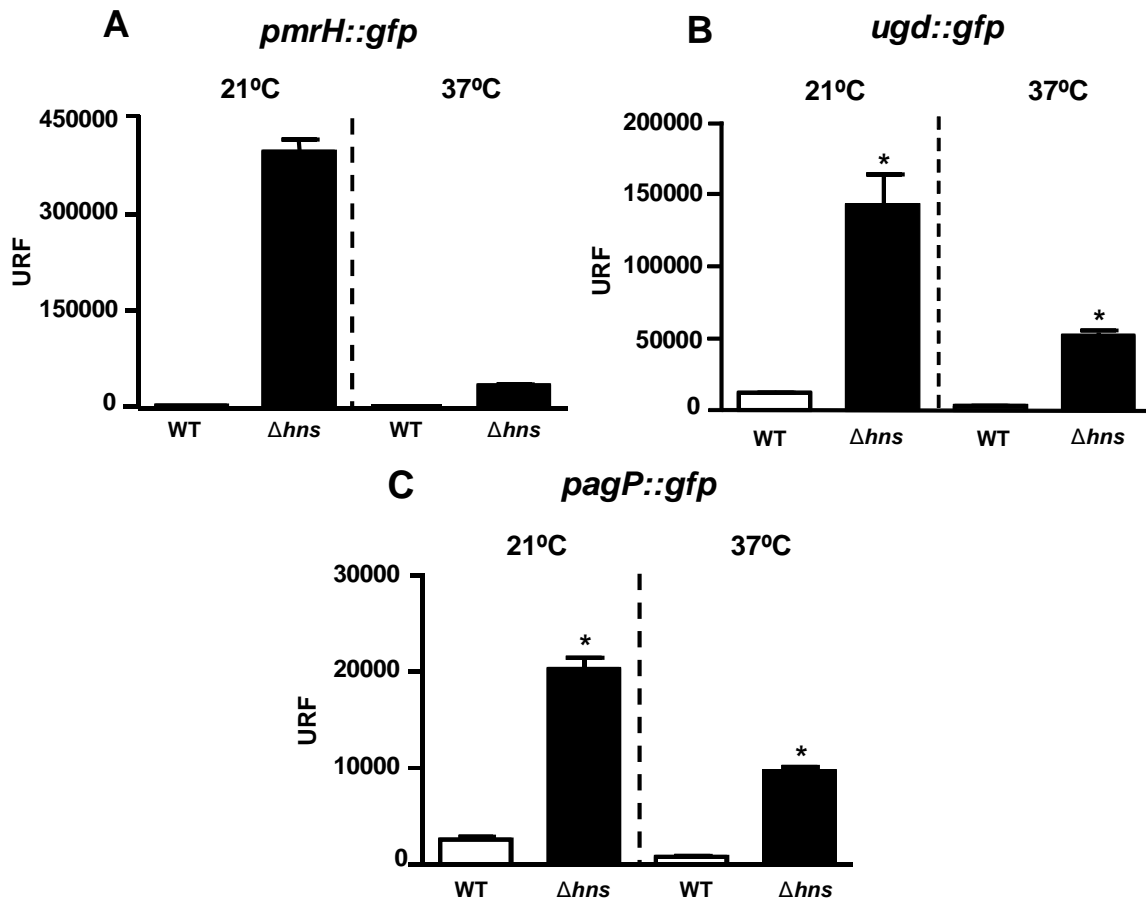


Figura 37. Los niveles altos de *rovA* en el mutante doble YeO8Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB* explican la elevada expresión del operón *pmrH* y los genes *ugd* y *pagP* en este mutante. Análisis de la expresión de *pmrH::lucFF* (A), *ugd::lucFF* (B) y *pagP::lucFF* (C) en YeO8, y en los mutantes YeO8*rovA* (*rovA*), YeO8Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB* (*phoPQ-pmrAB*), y YeO8*rovA*-Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB* (*rovA-phoPQ-pmrAB*) crecidos a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a YeO8.

Dado que RovA regula positivamente la expresión de los *loci* estudiados, quisimos comprobar si H-NS actúa como represor. Varios grupos hemos demostrado que *hns* es un gen esencial de YeO8^{170,240,426}. Por consiguiente, se analizó la expresión de los *loci* en las cepas de *E. coli* BSN26 y BSN27, cepas silvestre y mutante *hns* respectivamente²⁷⁰. Esta estrategia ha sido empleada por otros grupos de investigación incluyendo el nuestro^{170,240,270,426}.

Para estos experimentos, las regiones promotoras de los distintos *loci* se clonaron en el plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Las medidas de fluorescencia determinaron que la expresión de todos los genes fue superior en BSN27, que no expresa *hns*, que en la cepa silvestre BSN26 y esto, tanto a 21°C como a 37°C (**Figura 38**). Aunque estas diferencias se observaran a ambas temperaturas, las diferencias relativas de fluorescencia entre el mutante *hns* y la cepa silvestre fueron mayores a 21°C.

Estos resultados indican que H-NS, y/o otra proteína regulada por H-NS, controla negativamente la expresión de *pmrH*, *ugd*, *pagP*, *phoPQ* y *pmrAB*



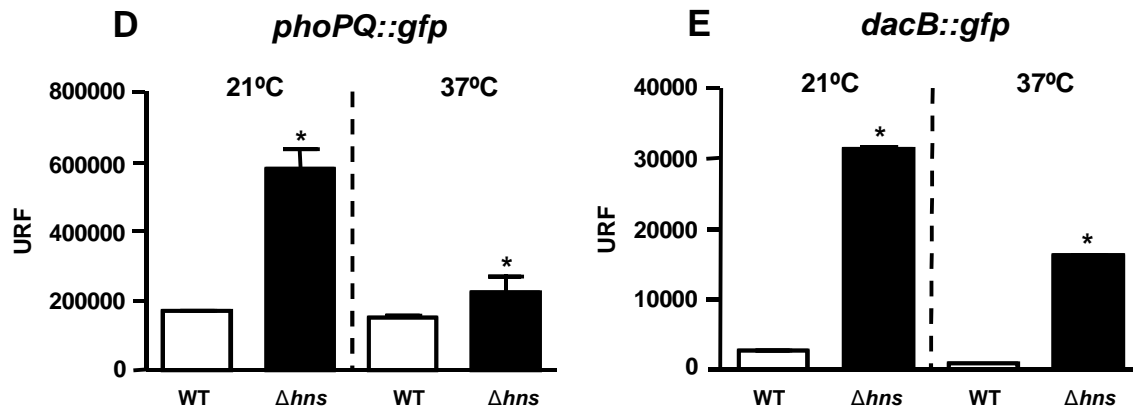
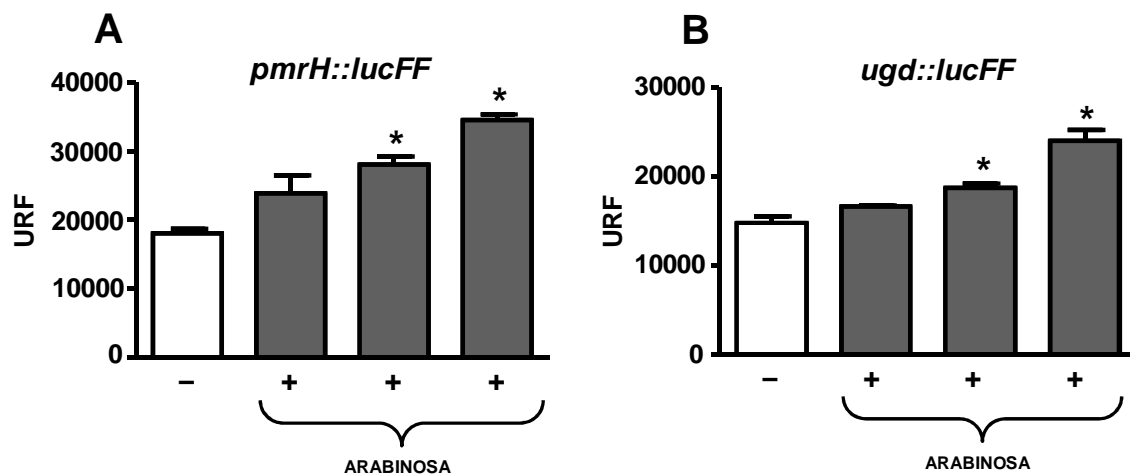


Figura 38. H-NS regula negativamente la expresión de los genes necesarios para las modificaciones del lípido A en *Y. enterocolitica* O:8. Análisis de la expresión de *pmrH*, *ugd*, *pagP*, *phoP* y *dacB* en la cepa silvestre de *E. coli* (barras blancas) y en un mutante isogénico que no expresa H-NS (barras negras), mediante la medición de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *pmrH::gfp* (A), *ugd::gfp* (B), *pagP::gfp* (C), *phoP::gfp* (D) y *dacB::gfp* (E). Las cepas se crecieron tanto a 21°C como a 37°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a la misma temperatura.

Por último, analizamos si RovA pudiera aliviar la represión ejercida por H-NS. *E. coli* no tiene el gen *rovA* por lo que se introdujo el plásmido pBADYeO8RovA en la cepa silvestre BSN26 que contenía las diferentes fusiones transcripcionales *pmrH::gfp*, *ugd::gfp*, *pagP::gfp*, *phoPQ::gfp* y *dacB::gfp* y se midió la cantidad de fluorescencia a 21°C. En todos los casos, se observó un incremento en la expresión de las fusiones transcripcionales tras inducir la expresión del promotor pBAD con arabinosa (Figura 39).



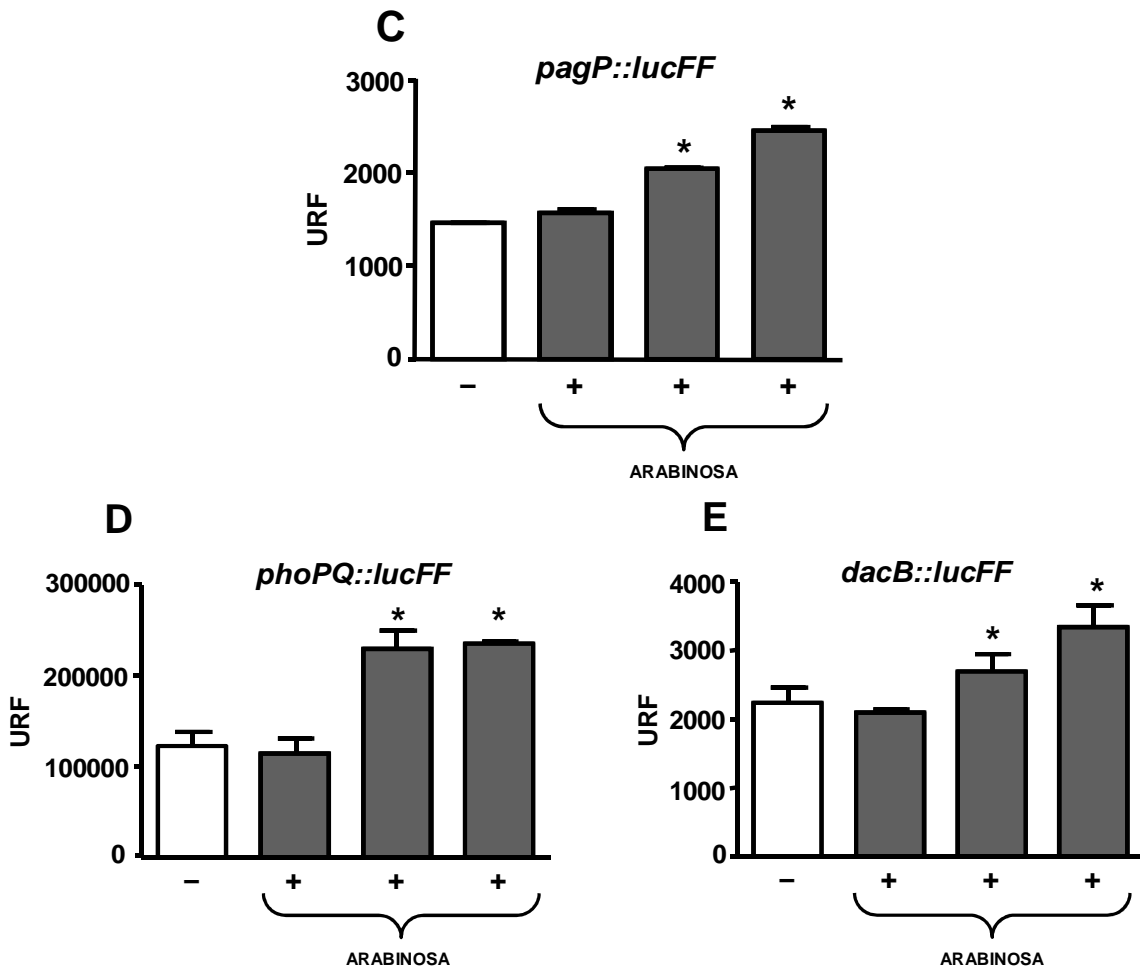


Figura 39. RovA alivia la represión de H-NS a 21°C. Análisis de la expresión de *pmrH* (A), *ugd* (B), *pagP* (C), *phoP* (D) y *dacB* (E) en la cepa silvestre de *E.coli* expresando RovA de *Y. enterocolitica* mediante la introducción del plásmido inducible pBADYeO8RovA. Se añadieron diferentes concentraciones de arabinosa (0.00002%, 0.0002%, 0.002%, peso/volumen, barras grises) en el medio de cultivo para inducir la expresión de *rovA*. Las bacterias se crecieron a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre de *E.coli* sin inducir (barras blancas).

2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN *pmrC*, RESPONSABLE DE LA ADICIÓN DE FOSFOETANOLAMINA AL LÍPIDO A DE *Y. enterocolitica* O:8

En el espectro del lípido A del mutante *YeO8ΔpmrF* crecido a 21°C se observa un pico (m/z 1948) que no aparece en el espectro de la cepa silvestre *YeO8* a la misma temperatura (**Figura 25A**). Este pico es consistente con la adición de una molécula de fosfoetanolamina a la especie hexaacilada principal (m/z 1824 + m/z 124). En *S. enterica*, PmrC es la enzima responsable de la incorporación de fosfoetanolamina al lípido A³⁰⁸. En esta bacteria, el gen *pmrC* se encuentra en el operón *pmrCAB* que codifica también el regulador PmrA y el sensor PmrB del sistema de dos componentes PmrA/PmrB²¹⁴. Hasta el momento, no existe ningún estudio en el que se identifique el gen responsable de la adición de fosfoetanolamina al lípido A de las especies de *Yersinia*. De hecho, se ha descrito que en *Yersinia* los genes *pmrA* y *pmrB* no están asociados a *pmrC* formando el operón *pmrCAB* y se daba por hecho que el gen *pmrC* estaba ausente en el genoma de *Yersinia*¹¹⁴. Sin embargo, nuestros análisis del lípido A indicaban que *YeO8* sí pudiera codificar un homólogo de *pmrC*. Confirmando esta hipótesis, encontramos un *locus*, YE2150, en el genoma de *Y. enterocolitica* O:8⁵⁵⁴ que presenta una homología del 49% con *pmrC* de *Salmonella*. Homólogos de este *locus* también se encuentran en los genomas de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* (**Tabla 8, Anexo III**).

Con el objetivo de comprobar si YE2150 (*pmrC*) era el responsable de la adición de fosfoetanolamina al lípido A de *YeO8* a 21°C se construyó un doble mutante *YeO8ΔpmrF-ΔpmrC* y se analizó la estructura de su lípido A. Como se puede observar en la **Figura 40**, en el doble mutante desaparece el pico m/z 1948, confirmando que el *locus* identificado es el responsable de la adición de fosfoetanolamina al lípido A de *YeO8* y, por tanto, lo denominamos *pmrC*. Se complementó el mutante *YeO8ΔpmrF-ΔpmrC* mediante la inserción del transposón mini-Tn7TKm-*pmrC* en el genoma (materiales y métodos apartado 3.2). La estructura del lípido A de esta cepa fue igual que la del mutante simple *YeO8ΔpmrF* a 21°C (**Figura 40**).

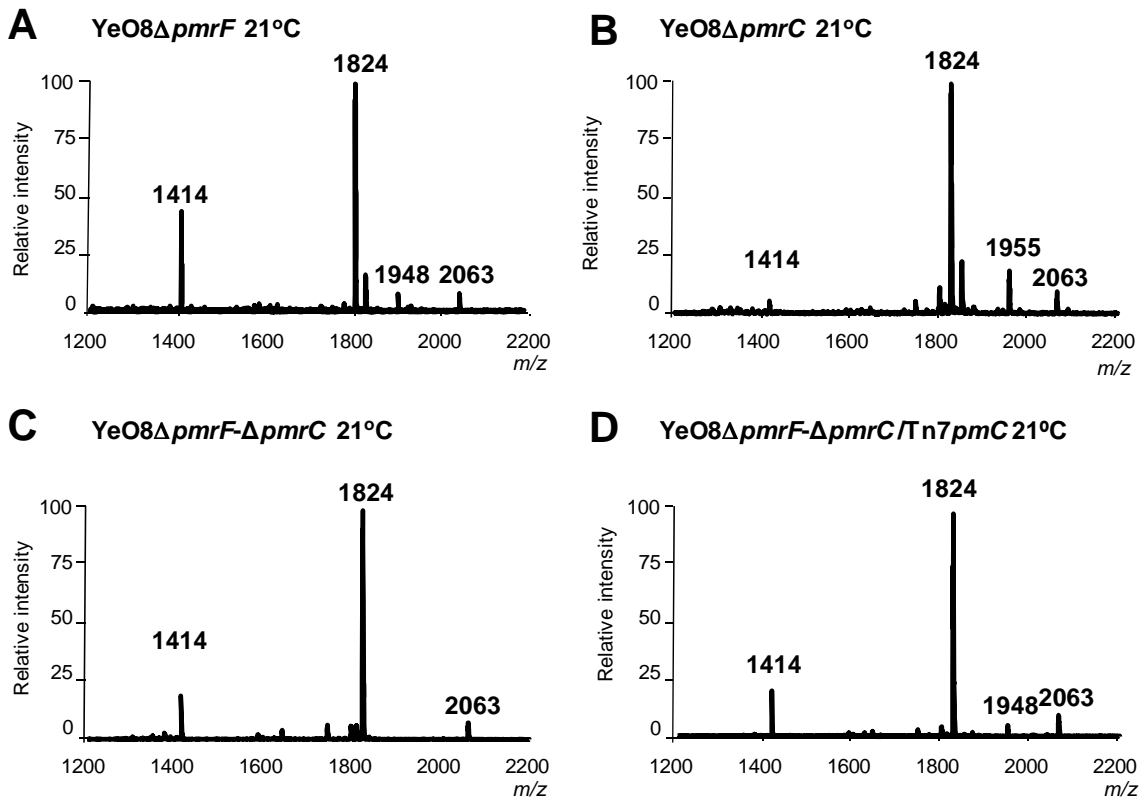


Figura 40. Estructura del lípido A de los mutantes *YeO8ΔpmrF*, *YeO8ΔpmrC* y *YeO8ΔpmrF-ΔpmrC*. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído de *YeO8ΔpmrF* (A), *YeO8ΔpmrC* (B), *YeO8ΔpmrF-ΔpmrC* (C) crecidos a 21°C y del mutante *YeO8ΔpmrF-ΔpmrC* complementado con el plásmido pUC18R6KTmini-Tn7TKm-*pmrC* (D). Los resultados mostrados son representativos de tres extracciones independientes.

El hecho de que el pico correspondiente a la adición de fosfoetanolamina al lípido A sólo aparezca en el mutante *YeO8ΔpmrF*, nos llevó a comprobar si la transcripción del gen *pmrC* estaba alterada en este fondo genético. Para ello, se construyó una fusión transcripcional en la que el gen de la luciferasa se encontraba bajo el control de la región promotora del gen *pmrC* (materiales y métodos apartado 4). Esta fusión se introdujo en el cromosoma de *YeO8* y del mutante *YeO8ΔpmrF* y se midió la cantidad de luz producida a 21°C. La expresión de la fusión *pmrC::lucFF* fue superior en el mutante *pmrF* que en la cepa silvestre (Figura 41) lo que sugiere que la presencia de aminoarabinosa en el lípido A actúa negativamente sobre la transcripción del gen *pmrC*.

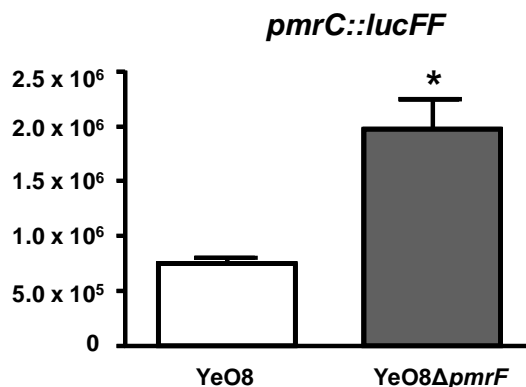


Figura 41. Expresión de *pmrC* en el mutante YeO8Δ*pmrF*. Análisis de la expresión del gen *pmrC* en YeO8 (barra blanca) y en el mutante YeO8Δ*pmrF* (barra gris). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por quintuplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

2.1 Implicación de la adición de fosfoetanolamina al lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 en la resistencia frente a los PAs

Tanto en *S. enterica* como en *A. baumannii* la adición de fosfoetanolamina al lípido A es necesaria para la resistencia frente a la PxB^{39,308}. Para comprobar si en YeO8 la adición de fosfoetanolamina confería resistencia frente a la PxB, se realizaron ensayos de supervivencia. Como se puede observar en la **Figura 42**, el mutante YeO8Δ*pmrC* presentó una sensibilidad similar a la cepa silvestre, lo que concuerda con los resultados del análisis del lípido A que demuestran que el lípido A del mutante Δ*pmrC* es igual al de la cepa silvestre (**Figura 40**). Sin embargo, la supervivencia del mutante doble YeO8Δ*pmrF*-Δ*pmrC* fue significativamente menor que los dos mutantes simples YeO8Δ*pmrC* y YeO8Δ*pmrF* ($P < 0.05$; por el test *t* de Student de una cola). El transposón mini-Tn7TK*mpmrC* restauró la sensibilidad del mutante doble YeO8Δ*pmrF*-Δ*pmrC* a los niveles del mutante simple YeO8Δ*pmrF* (significativamente diferente con respecto a la cepa silvestre, $P < 0.05$; por el test *t* de Student de una cola) (**Figura 42**).

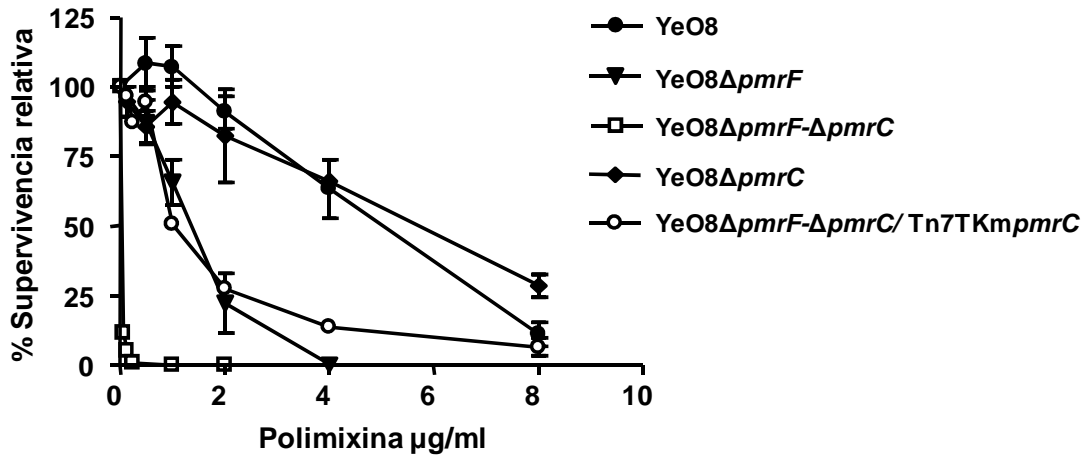


Figura 42. Papel de la adición de fosfoetanolamina al lípido A en la resistencia frente a la PxB. La cepa silvestre YeO8 (●), los mutantes YeO8ΔpmrF (▼) YeO8ΔpmrC (◆) y YeO8ΔpmrF-ΔpmrC (□) y la cepa complementada YeO8ΔpmrF-ΔpmrC/pUC18R6KTmini-Tn7TKmpmrC (○) se crecieron a 21°C y fueron expuestos a diferentes concentraciones de PxB. Cada punto de la gráfica representa la media y desviación estándar de ocho muestras procedentes de cuatro tandas de experimentos independientes.

2.2 Regulación de la expresión de *pmrC*

Comparando los espectros del mutante YeO8ΔpmrF a 21°C y a 37°C (Figura 25 A y B), se observó que el pico correspondiente a la adición de fosfoetanolamina sólo aparecía a 21°C. Por consiguiente, nos planteamos analizar si la transcripción de *pmrC* también estaba regulada por la temperatura al igual que las otras modificaciones del lípido A. En la Figura 43 se muestra que la expresión de *pmrC* fue mayor a 21°C que a 37°C.

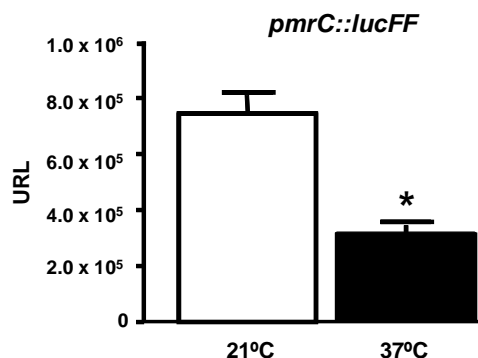


Figura 43. La expresión del gen *pmrC* está regulada por la temperatura. Análisis de la expresión del gen *pmrC* midiendo la actividad luciferasa de la fusión transcripcional *pmrC:lucFF* en YeO8 crecida a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por quintuplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la bacteria crecida a 21°C.

A continuación, nos propusimos identificar los sistemas implicados en la regulación de *pmrC*. En *S. enterica* y *A. baumannii* se ha descrito que el sistema PmrA/PmrB regula la adición de fosfoetanolamina al lípido A^{22,308}. En consecuencia, y teniendo en cuenta los resultados del apartado 1 en los que demostramos que la expresión de los genes implicados en la modificación del lípido A están regulados por PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB y RovA (**Figura 30 y 32**), se comprobó si estos reguladores controlaban la expresión de *pmrC*. Para ello, se determinó la expresión de la fusión transcripcional *pmrC::lucFF* en los mutantes YeO8Δ*phoPQ*, YeO8Δ*pmrAB*, YeO8Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB*, y YeO8Δ*rovA* a 21°C y 37°C (**Figura 44**). A 21°C, los niveles de expresión de *pmrC* en los mutantes YeO8Δ*phoPQ*, YeO8Δ*pmrAB* y YeO8Δ*phoPQ*-Δ*pmrA* fueron muy similares a los que presentaba la cepa silvestre (**Figura 44**). Por otra parte a 37°C, la expresión de *pmrC* fue inferior en los mutantes YeO8Δ*phoPQ* y YeO8Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB* con respecto a la cepa silvestre. A 21°C la expresión de *pmrC* en el mutante YeO8Δ*rovA* fue inferior que la encontrada en la cepa silvestre. Por el contrario, a 37°C la expresión de *pmrC* fue superior en el mutante *rovA* que en la cepa silvestre (**Figura 44**).

El sistema Rcs (Regulator of capsule synthesis) es un sistema de respuesta adaptativa poco común, compuesto por tres proteínas: el sensor RcsC, el regulador RcsB y el intermediario RcsD³²⁹. Está conservado en la familia de las enterobacterias^{251,429} y, tanto en *Salmonella* como en *K. pneumoniae*, controla la expresión de las modificaciones del lípido A dependientes de PhoP/PhoQ^{193,317}. La expresión de *pmrC* sí fue superior en el mutante YeO8Δ*rscD* que en el resto de cepas y tanto a 21 como a 37°C (**Figura 44**).

En resumen, todos estos resultados sugerían que el sistema RcsCDB controla negativamente la expresión de *pmrC*. RovA controla de forma positiva la expresión de *pmrC* únicamente a 21°C mientras que el sistema PhoP/PhoQ lo hace a 37°C.

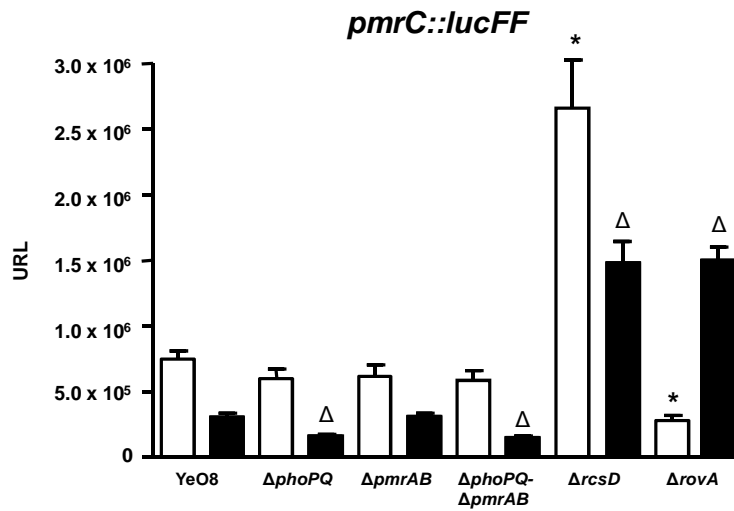
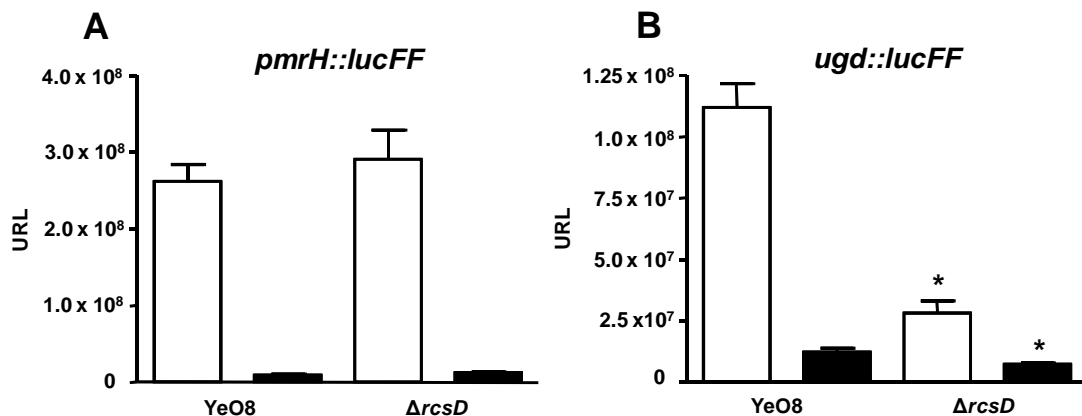


Figura 44. Regulación de la expresión de *pmrC*. Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *pmrC::lucFF* en la cepa silvestre (YeO8), y los mutantes YeO8Δ*phoPQ* (Δ*phoPQ*), YeO8Δ*pmrAB* (Δ*pmrAB*), YeO8Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB* (Δ*phoPQ*-Δ*pmrAB*), YeO8Δ*rovA* (Δ*rovA*) y YeO8Δ*rcsCDB* (Δ*rcsD*) crecidos a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a 21°C. Δ, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a 37°C.

Se determinó también si el sistema RcsCDB ejercía algún tipo de regulación sobre las otras modificaciones del lípido estudiadas en este trabajo. Los niveles de expresión de *pmrH::lucFF* y *pagP::lucFF* no estaban afectados en el fondo genético del mutante YeO8Δ*rcsD* (Figura 45). Sin embargo, la expresión del gen *ugd* si estaba disminuida (Figura 45).



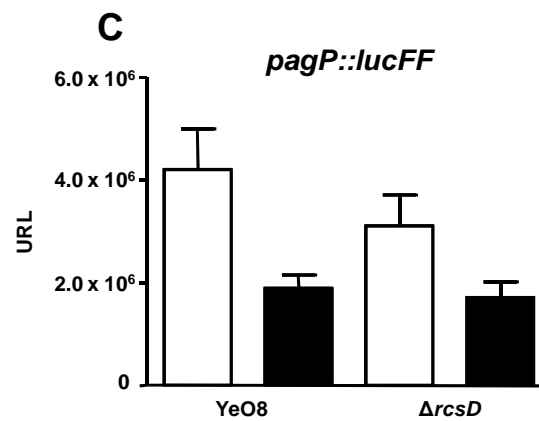


Figura 45. Expresión de *pmrH*, *ugd* y *pagP* en el mutante *YeO8ΔrcsD*. Análisis de la expresión de *pmrH::lucFF* (A), *ugd::lucFF* (B) y *pagP::lucFF* (C) en la cepa silvestre (YeO8) y en el mutante *YeO8ΔrcsD* ($\Delta rc s D$) crecidos a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre a la misma temperatura.

Seguidamente, se determinó si el sistema RcsCDB estaba regulado por la temperatura, al igual que lo estaban los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB. Para ello, se introdujo la fusión transcripcional *rcsC::lucFF* en la cepa silvestre y se midió la cantidad de luz producida creciendo la bacteria a 21°C y a 37°C. Como se puede observar en la **Figura 46**, el sistema RcsCDB está regulado por la temperatura, siendo su expresión mayor a 21°C que a 37°C.

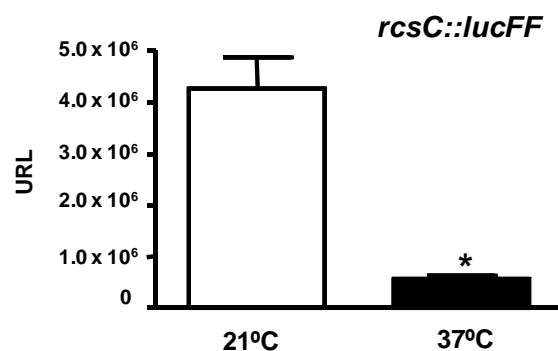


Figura 46. La expresión del sistema RcsCDB está regulada por la temperatura. Análisis de la expresión de *rcsC::lucFF* en YeO8 crecida tanto a 21°C (barras blancas) como a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la bacteria crecida a 21°C.

A continuación se valoró si la expresión de algunos de los reguladores de la expresión de *pmrC* estaba alterada en el mutante *YeO8ΔpmrF* de tal

manera que se explicaran los elevados niveles de *pmrC* en este fondo genético. Para ello, se introdujeron las fusiones transcripcionales de los reguladores *dacB::lucFF*, *phoP::lucFF*, *rovA::lucFF* y *rscC::lucFF* en el mutante YeO8 Δ *pmrF* y se midió la cantidad de luz creciendo la bacteria tanto a 21°C como a 37°C.

Como se puede observar en la **Figura 47A**, a 21°C únicamente la expresión de RovA y RcsCDB estaban alteradas en el mutante siendo estas inferiores que las encontradas en la cepa silvestre (**Figura 47A**). Por otro lado, a 37°C tanto la expresión de *phoP* como la de *rovA* fueron inferiores en YeO8 Δ *pmrF* respecto a las observadas en YeO8 (**Figura 47B**).

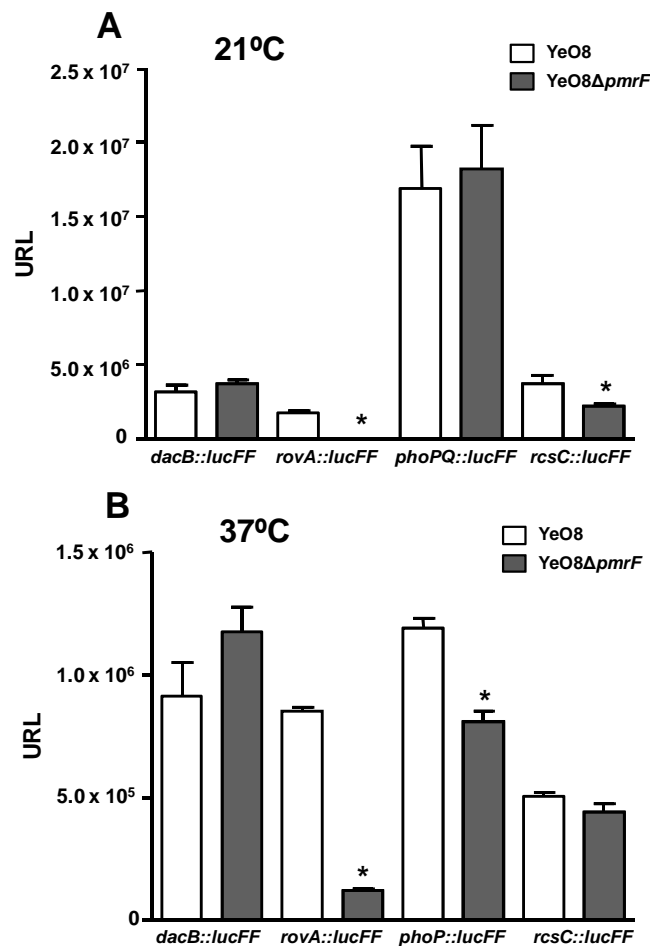


Figura 47. Análisis de la expresión de los reguladores en un mutante que no tiene aminoarabinosa en el lípido A. Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales *dacB::lucFF*, *rovA::lucFF*, *phoPQ::LucFF* y *rscC::lucFF* en la cepa silvestre (barras blancas), y en el mutante YeO8 Δ *pmrF* (barras grises) crecidos a 21°C (**A**) y a 37°C (**B**). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) para cada fusión transcripcional con respecto a la cepa silvestre.

Estos resultados indican que la expresión de *pmrC* podría estar más elevada en el mutante *YeO8ΔpmrF* debido a que su regulador negativo *rscC* está menos expresado en este mismo fondo genético.

Para explorar esta idea en más detalle, se construyeron los mutantes dobles *YeO8ΔpmrF-ΔphoPQ*, *YeO8ΔpmrF-ΔrovA* y *YeO8ΔpmrF-ΔrcsD* y se estudió la expresión de *pmrC* en estos fondos genéticos a 21°C (**Figura 48**). La expresión de *pmrC* fue similar en el mutante *YeO8ΔpmrF-ΔphoPQ* y *YeO8ΔpmrF*. Sin embargo, la expresión de *pmrC* fue más elevada en el mutante *YeO8ΔpmrF-ΔrcsD* que en los mutantes simples *YeO8ΔpmrF* y *YeO8ΔrcsD*, lo que sugería otra vez que el sistema RcsCDB actúa como regulador negativo. En el mutante *YeO8ΔpmrF-ΔrovA* la expresión de *pmrC* fue significativamente más elevada que aquella encontrada en la cepa silvestre y el mutante simple *YeO8ΔpmrF*.

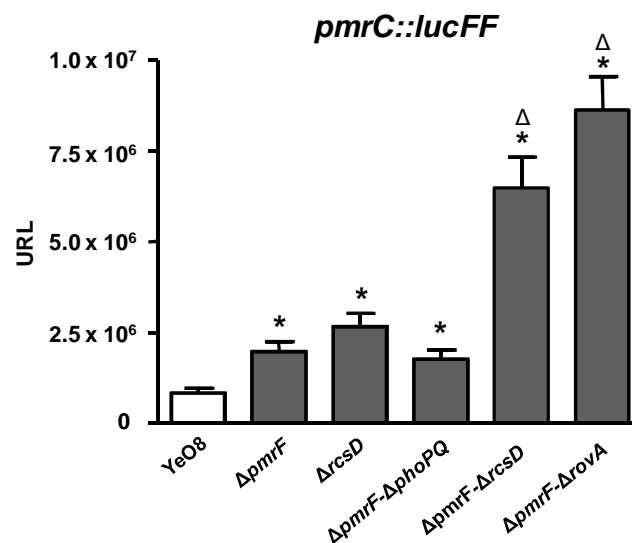


Figura 48. Análisis de la expresión de *pmrC* en la cepa silvestre (*YeO8*), y en los mutantes *YeO8ΔpmrF* ($\Delta pmrF$), *YeO8ΔrcsD* ($\Delta rcsD$), *YeO8ΔpmrF-ΔphoPQ* ($\Delta pmrF-Δ phoPQ$), *YeO8ΔpmrF-ΔrcsD* ($\Delta pmrF-Δ rcsD$) y *YeO8ΔpmrF-ΔrovA* ($\Delta pmrF-Δ rovA$) crecidos a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a *YeO8*. Δ, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la expresión en el mutante simple *YeO8ΔpmrF*.

A continuación se determinó la expresión de algunos de los reguladores de la expresión de *pmrC* en el mutante *YeO8ΔrcsD* ya que en este fondo genético, los niveles de expresión de *pmrC* se encontraban elevados con respecto a la cepa silvestre (**Figura 44 y 48**). Para ello, se introdujeron las fusiones transcripcionales de los reguladores *dacB::lucFF*, *phoP::lucFF*, *rovA::lucFF* y *rscC::lucFF* en el mutante *YeO8ΔrcsD* y se midió la cantidad de luz creciendo la bacteria a 21°C.

Como se puede observar en la **Figura 49**, la expresión de *RovA* y *RcsC* estaban alteradas en el mutante, siendo superiores que las encontradas en la cepa silvestre. La expresión de *PhoP/PhoQ* fue inferior en el mutante con respecto a la cepa silvestre (**Figura 49**).

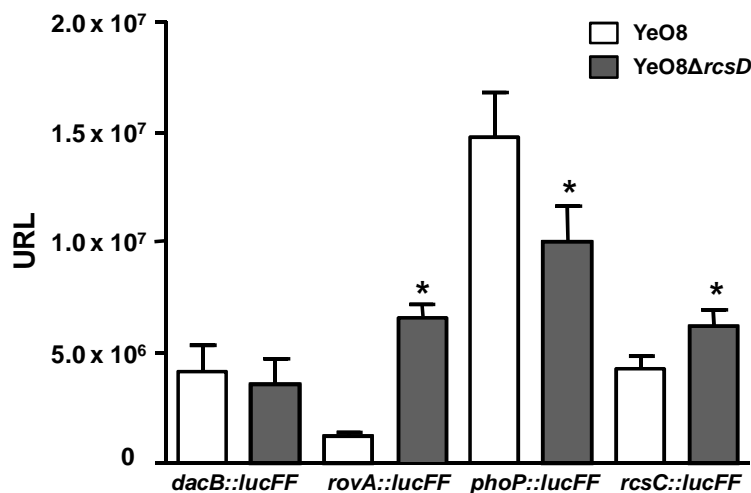


Figura 49. Análisis de la expresión de los reguladores en un mutante *YeO8ΔrcsD*. Análisis de la expresión de la fusiones transcripcionales *dacB::lucFF*, *rovA::lucFF*, *phoP::LucFF* y *rscC::lucFF* en la cepa silvestre (barras blancas), y en el mutante *YeO8ΔrcsD* (barras grises) crecidos a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) para cada fusión transcripcional con respecto a la cepa silvestre.

A continuación, se comprobó la expresión de *rovA*, sugerido como regulador positivo de la expresión de *pmrC*, en los fondos genéticos de *YeO8ΔrcsD*, *YeO8ΔpmrF* y *YeO8ΔpmrF-ΔrcsD* donde la expresión de *pmrC* está elevada (**Figura 48**). En el mutante *YeO8ΔrcsD* la expresión de *rovA* fue significativamente más elevada que en la cepa silvestre (**Figura 50**). En el mutante *YeO8ΔpmrF-ΔrcsD* los niveles de expresión de *rovA* fueron inferiores

con respecto a la cepa silvestre, aunque no llegaron a los bajos niveles que presentaba el mutante simple *YeO8ΔpmrF* (Figura 50).

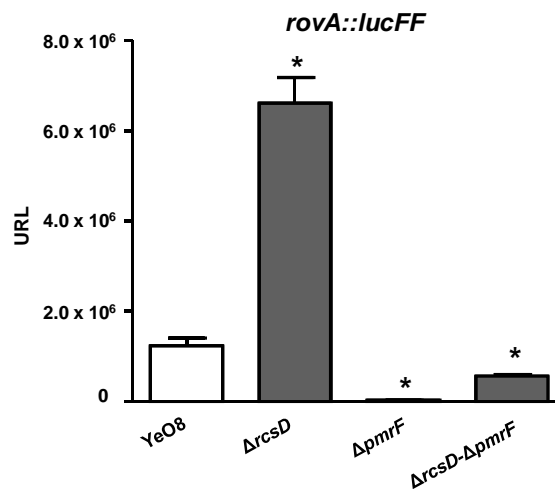


Figura 50. Análisis de la expresión de *rovA* en la cepa silvestre (*YeO8*), y en los mutantes *YeO8ΔrcsD* ($\Delta rcsD$), *YeO8ΔpmrF* ($\Delta pmrF$) y *YeO8ΔpmrF-ΔrcsD* ($\Delta pmrF-\Delta rcsD$) crecidos a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a *YeO8*.

Ante este resultado, se planteó la posibilidad de que la elevada expresión de *rovA* en el mutante *rcsD* fuera la responsable de que *pmrC* presentara unos niveles de expresión elevados en este mutante (Figura 44 y 48). Para confirmar esta hipótesis se construyó el doble mutante *YeO8ΔrovA-ΔrcsD* y se midió la expresión de *pmrC*. En el doble mutante los niveles de expresión de *pmrC* fueron inferiores a los obtenidos en el mutante simple *YeO8ΔrcsD* y comparables con los obtenidos en el mutante *YeO8ΔrovA* (Figura 51). Estos resultados sugieren, que *RovA* o una proteína regulada por *RovA* contribuyen a la activación de *pmrC* en el mutante *YeO8ΔrcsD*.

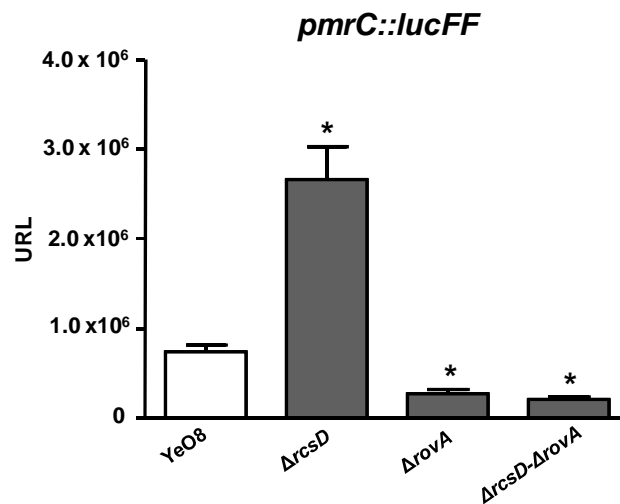


Figura 51. Los niveles altos de *rovA* en el mutante *YeO8ΔrcsD* explican la elevada expresión del gen *pmrC* en este mutante. Análisis de la expresión de *pmrC* en la cepa silvestre (*YeO8*), y en los mutantes *YeO8ΔrcsD* ($\Delta rcsD$), *YeO8ΔrovA* ($\Delta rovA$) y *YeO8ΔrcsD-ΔrovA* ($\Delta rcsD-\Delta rovA$) crecidos a 21°C. Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a *YeO8*.

3. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE ACILACIÓN DEL LÍPIDO A DE *Y. enterocolitica* O:8 a 37°C

3.1 Identificación de la 3'-O-deacilasa del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8

Varios grupos hemos descrito que YeO8 presenta una estructura tetraacilada característica en el lípido A de bacterias crecidas a 37°C, consistente con la existencia de una posible actividad deacilasa^{24,406,425,455}. Esta actividad deacilasa se ha descrito en *S. enterica* serovar *typhimurium* y *H. pylori*^{460,538}. Para ambos patógenos se identificó una hidrolasa llamada LpxR encargada de eliminar el residuo aciloxiacil de la posición 3' del lípido A^{460,538} (Figura 52).

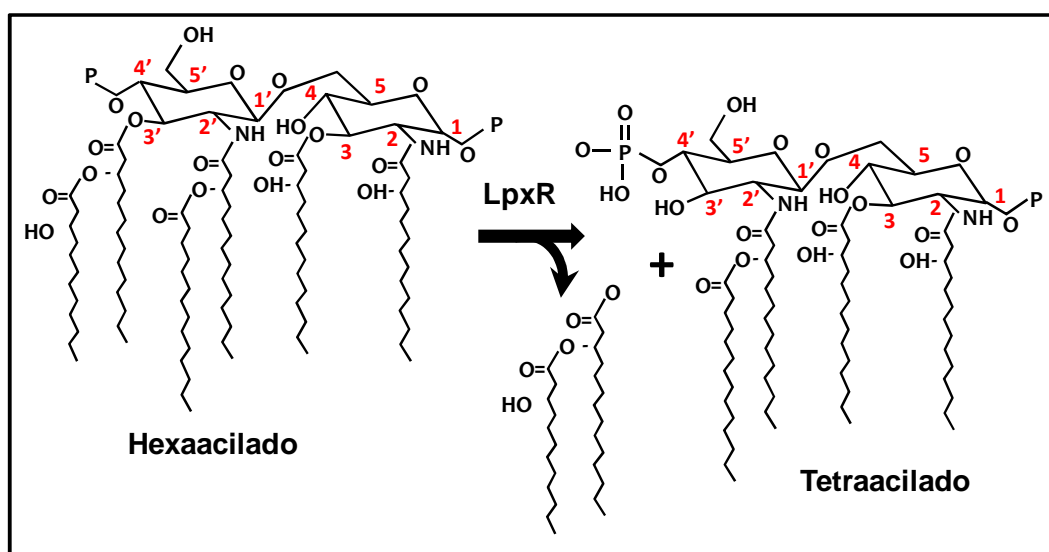


Figura 52. Esquema de la actividad de la enzima LpxR en *S. enterica* y *H. pylori*.

Un análisis *in silico* del genoma de YeO8 (Thomson *et. al* 2006) nos permitió identificar un *locus* (YE3039) que presentaba un 73% y un 20% de homología con la enzima LpxR de *S. enterica* y *H. pylori*, respectivamente. Este mismo *locus* se encontró en los genomas de *Y. enterocolitica* Y11 serotipo O:3 (Y11_05741) y *Y. enterocolitica* Y105 serotipo O:9 (YE105_C2442), siendo 100% idénticos a YE3039 (Tabla 8, Anexo III). Ni en *Y. pestis* ni en *Y. pseudotuberculosis* se encontró un *locus* similar (Tabla 8, Anexo III).

Para determinar si efectivamente YE3039 codifica la enzima responsable de la eliminación del residuo 3'-O-aciloxiacil del lípido A se construyó un mutante por doble recombinación homóloga. A continuación se analizó la estructura del lípido A mediante espectrometría de masas MALDI-TOF del mutante crecido tanto a 21°C como a 37°C.

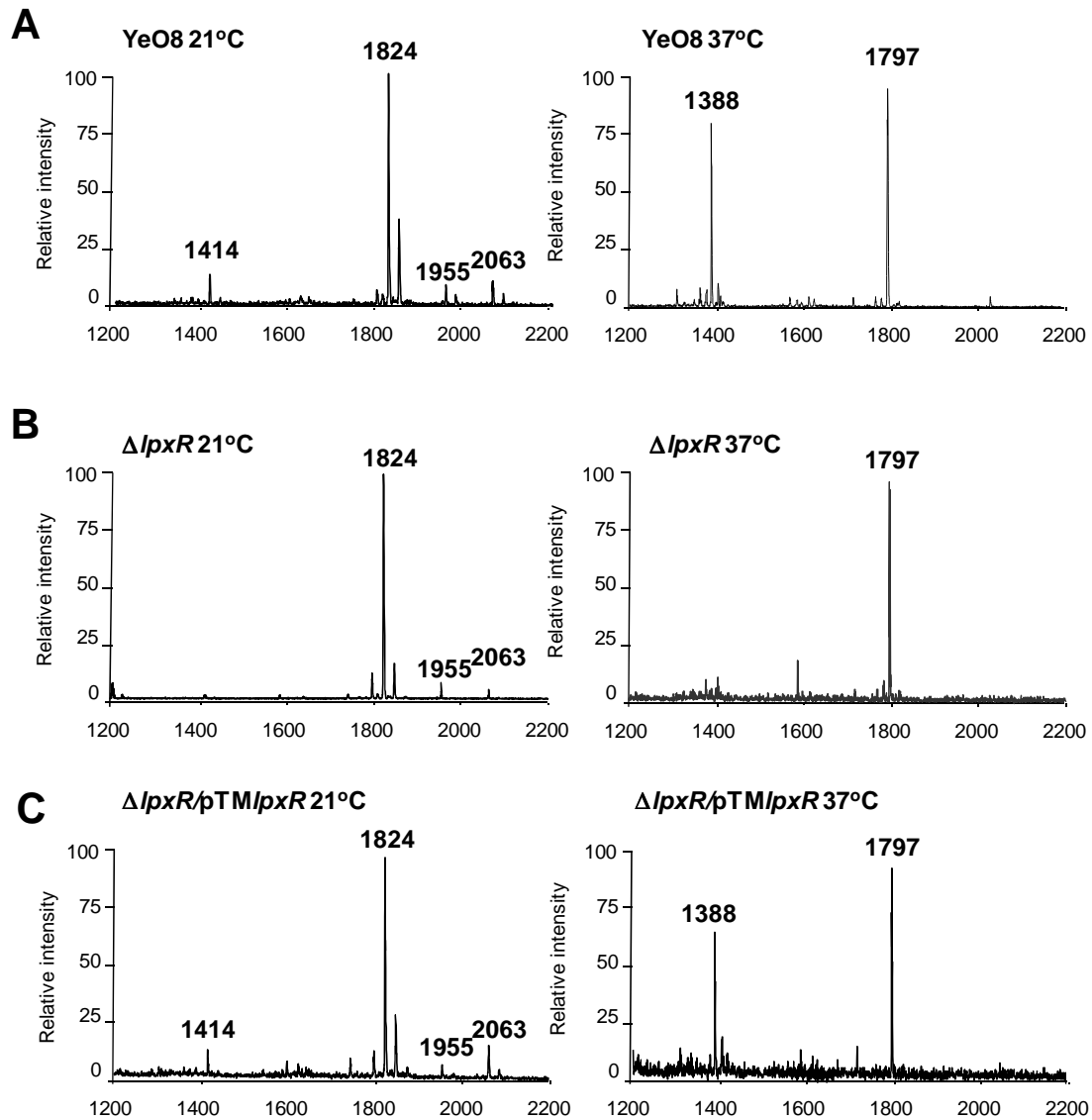


Figura 53. Estructura del lípido A del mutante $YeO8\Delta lpxR$ crecido a 21°C y a 37°C. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído de la cepa silvestre ($YeO8$) (A), del mutante $YeO8\Delta lpxR$ ($\Delta lpxR$) (B) y del mutante $YeO8\Delta lpxR$ complementado con el plásmido $pTMlpxR$ ($\Delta lpxR/pTMlpxR$) (C) crecidos a 21°C y a 37°C. Los resultados son representativos de tres extracciones independientes.

El mutante *lpxR* (YeO8Δ*lpxR*) crecido a 37°C presentaba la misma forma hexaacilada que se encuentra en la cepa silvestre (*m/z* 1797), formada por cuatro ácidos grasos principales (3-OH-C₁₄) laureato (C₁₂) y miristato (C₁₄), sin embargo, no presentaba la especie tetraacilada (*m/z* 1388) (**Figura 53**). A 21°C también desapareció en el mutante *lpxR* el pico minoritario que corresponde a la especie tetraacilada (*m/z* 1414) (**Figura 53**). Este pico ya fue identificado anteriormente por Rebeil y colaboradores⁴⁵⁵ y también más recientemente por nuestro grupo y se corresponde con un lípido A tetraacilado formado por tres ácidos grasos principales 3-OH-C₁₄ y un C_{16:1}. Por último se complementó el mutante YeO8Δ*lpxR* con el plásmido pTML*lpxR* y como se puede observar en la **Figura 53** en el espectro de la cepa complementada volvían a aparecer las formas tetraaciladas de la cepa silvestre.

Por tanto, todos estos resultados indican que YE3039 codifica la enzima encargada de deacilar el lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 en la posición 3' y, por consiguiente, lo denominamos *lpxR*.

3.2 La expresión de *lpxR* está regulada por la temperatura

Los datos anteriores muestran que la deacilación del lípido A de YeO8 es más evidente cuando la bacteria se crece a 37°C que a 21°C. Por lo tanto, es razonable plantear que la expresión y/o la función de *LpxR* podría estar regulada por la temperatura siendo mayor a 37°C que a 21°C. Para abordar esta cuestión, se midió la expresión de *lpxR* mediante la introducción en YeO8 de la fusión transcripcional en la que el gen de la luciferasa se encontraba bajo el control de la región promotora del gen *lpxR*. A 21°C, los niveles de expresión de *lpxR* fueron 6 veces superiores que a 37°C (**Figura 54A**).

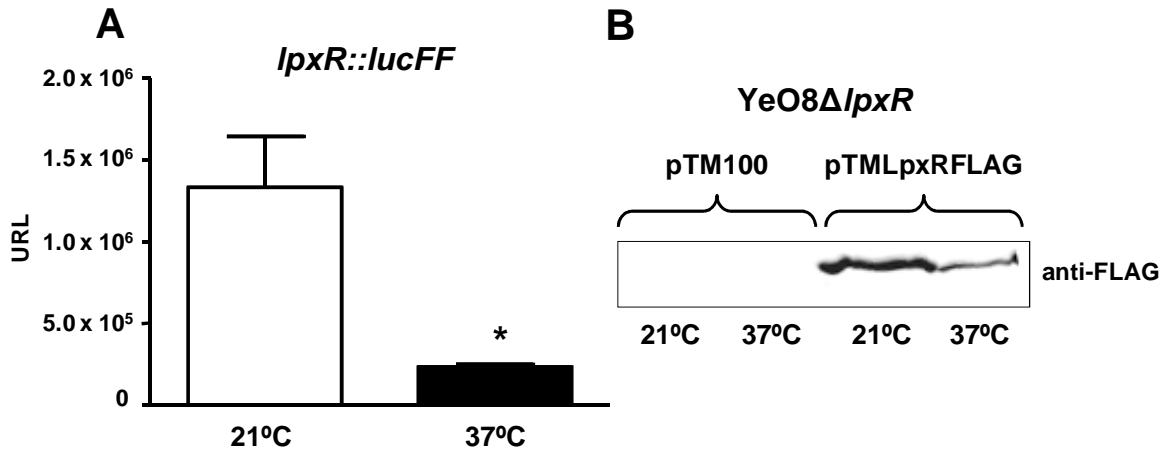


Figura 54. La expresión de *lpxR* está regulada por la temperatura. (A) Análisis de la expresión de *lpxR* midiendo la actividad luciferasa de la fusión transcripcional *lpxR:lucFF* en YeO8 crecida a 21°C y a 37°C. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la bacteria crecida a 21°C. **(B)** Análisis por Western blot de la cantidad de LpxR en la membrana externa por el mutante *YeO8ΔlpxR* transformado con el plásmido pTM/*lpxRFLAG* a 21°C y a 37°C.

A continuación se evaluaron los niveles de proteína LpxR en la membrana externa donde ejerce su actividad. Para ello se marcó la proteína con un epitopo FLAG en su extremo C-terminal y se clonó con su propio promotor en el plásmido de media copia pTM100, obteniendo pTM/*lpxRFLAG*. Esta construcción se introdujo en el mutante *YeO8ΔlpxR*, se realizó una extracción de la membrana externa y se analizaron los niveles de LpxR mediante Western Blot. Señalar que este plásmido también restauró las formas tetraaciladas (m/z 1414 y m/z 1388) típicas de la cepa silvestre (resultados no mostrados). Los resultados mostrados en la **Figura 54B** demuestran que los niveles de proteína fueron más elevados en las membranas de bacterias crecidas a 21°C que en aquellas de bacterias crecidas a 37°C.

En su conjunto, estos resultados indican que efectivamente la expresión de *lpxR* está regulada por la temperatura pero, al contrario de lo que planteábamos, la expresión de LpxR es mayor a 21°C que a 37°C.

Hasta el momento los resultados obtenidos parecían ser contradictorios. Los resultados de la espectrometría de masas mostraban que la actividad de LpxR era más aparente a 37°C que a 21°C. Sin embargo, los

niveles de LpxR eran más elevados a 21°C que a 37°C. Esta aparente contradicción nos llevó a comprobar si la temperatura pudiera afectar la propia actividad de la enzima. Para ello, introdujimos el plásmido pTM/lpxR utilizado para complementar el mutante YeO8ΔlpxR, en *E. coli* MG1655 y se analizó la estructura de su lípido A creciendo la bacteria tanto a 21°C como a 37°C. Esta cepa de *E. coli* ya se utilizó anteriormente para caracterizar la función de LpxR de *Salmonella*⁴⁶⁰. En la **Figura 55** se demuestra que LpxR de *Y. enterocolitica* O:8 es capaz de deacilar el lípido A de *E. coli* crecida tanto a 21°C como a 37°C ya que se detectó el pico correspondiente a la especie deacilada (m/z 1362). Este pico también aparece en el espectro del lípido A de *E. coli* que expresa LpxR de *Salmonella*⁴⁶⁰. A 21°C también se detectó el pico de m/z 1414 que corresponde a la deacilación de las especies de m/z 1862 que contienen C_{16:1} en lugar de C₁₂ (**Figura 55**). La aciltransferasa LpxP es la responsable de la adición del grupo C_{16:1} en *E. coli* a bajas temperaturas^{109,448}.

Todos estos resultados indican que la ausencia de especies deaciladas a 21°C, no se puede atribuir a una grave disfunción de LpxR a 21°C.

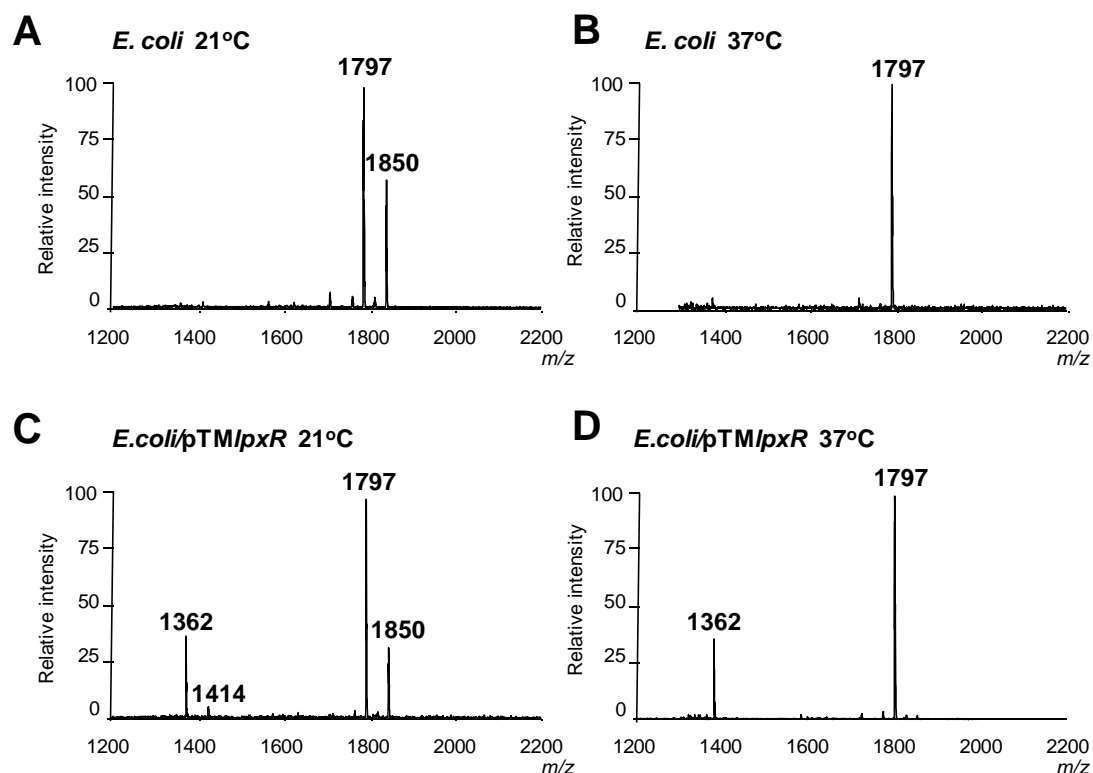


Figura 55. Estructura del lípido A extraído de *E. coli* MG1655 expresando LpxR. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído de *E. coli* MG1655 crecida a 21°C (**A**) y a 37°C (**B**) y *E. coli* MG1655 con el plásmido pTM/lpxR crecida a 21°C (**C**) y 37°C (**D**). Los resultados mostrados son representativos de tres extracciones independientes.

3.3 La presencia de aminoarabinosa en el lípido A impide la deacilación del lípido A dependiente de LpxR

Para determinar por qué no se observaba la actividad de LpxR en YeO8 crecida a 21°C aún estando la enzima presente en la membrana, en primer lugar planteamos que fuera posible que el lípido A de YeO8 presentara unas características únicas a 21°C que impiden la actividad de la enzima. Más aún, estas características debían estar ausentes en el lípido A de *E.coli* porque a 21°C se detectó actividad de LpxR (**Figura 55**). Las características más evidentes que diferencian los lípidos A de *E. coli* y YeO8 son la presencia de aminoarabinosa y palmitato (m/z 1955 y 2063, respectivamente) en esta última y sólo cuando se crece a 21°C. Por consiguiente, se exploró la posibilidad de que algunas de estas modificaciones afectaran a la actividad de LpxR a 21°C.

Así, se analizó la estructura del lípido A del mutante YeO8 Δ *pagP* y YeO8 Δ *pmrF*. El espectro del mutante YeO8 Δ *pagP* crecido a 21°C fue igual que el de la cepa silvestre pero sin la especie heptaacilada (m/z 2063) (**Figura 56A**). Sin embargo, en el espectro del lípido A del mutante YeO8 Δ *pmrF* crecido a 21°C, el pico correspondiente a la especie deacilada (m/z 1414) aumentó (**Figura 56C**). Posteriormente, se confirmó que esta deacilación era dependiente de LpxR porque en el espectro a 21°C del doble mutante YeO8 Δ *pmrF*- Δ *lpxR* el pico estaba ausente. A 37°C ambos mutantes YeO8 Δ *pmrF* y YeO8 Δ *pagP* presentaban el pico m/z 1388 correspondiente a las especies deaciladas por el enzima LpxR, iguales a los de la cepa silvestre (**Figura 56**).

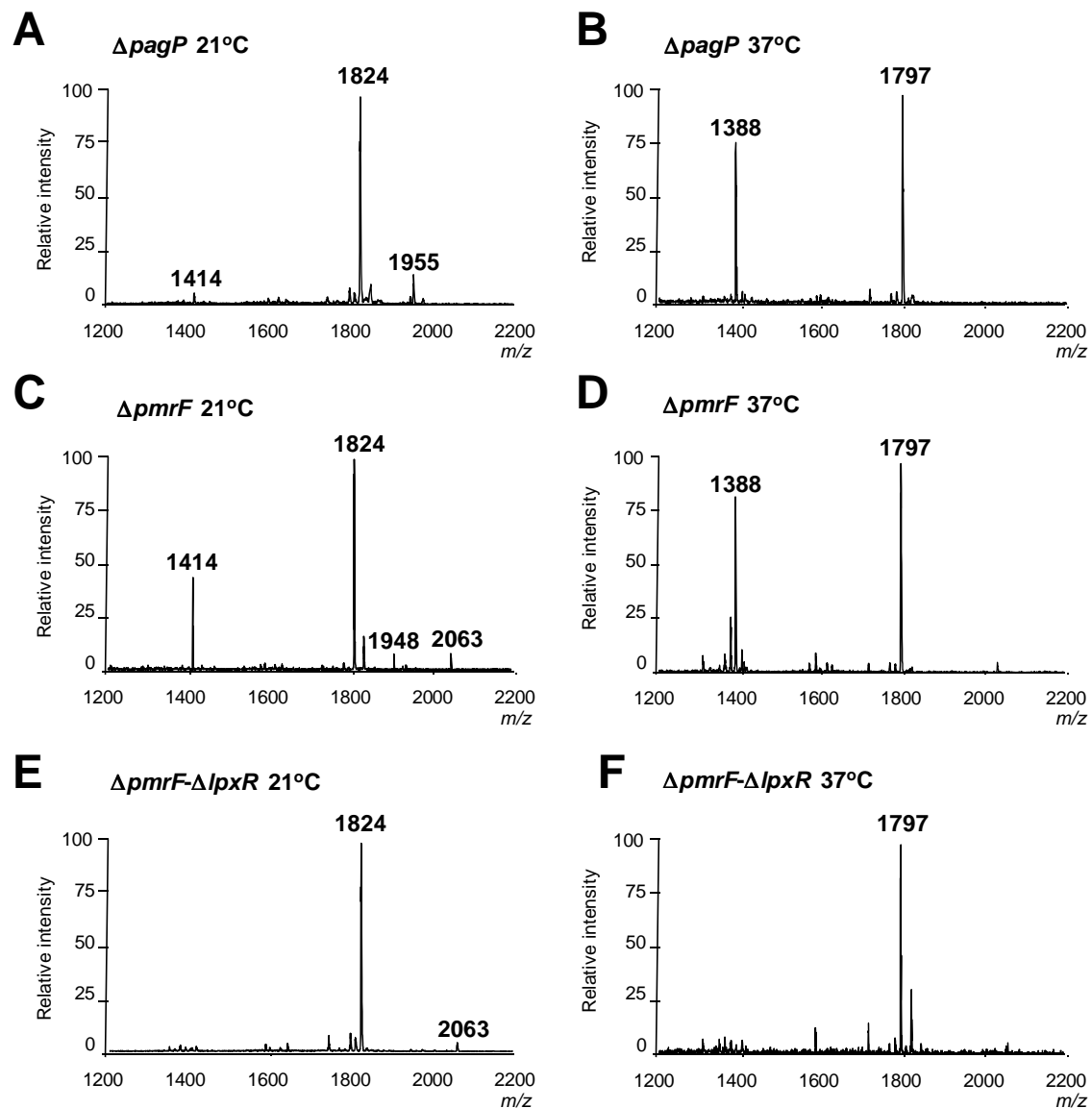


Figura 56. Estructura del lípido A de los mutantes *YeO8 $\Delta pagP$* , *YeO8 $\Delta pmrF$* y *YeO8 $\Delta pmrF-\Delta lpxR$* . Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído del mutante *YeO8 $\Delta pagP$* ($\Delta pagP$) a 21°C (A) y a 37°C (B), del mutante *YeO8 $\Delta pmrF$* ($\Delta pmrF$) a 21°C (C) y a 37°C (D) y del mutante doble *YeO8 $\Delta pmrF-\Delta lpxR$* ($\Delta pmrF-\Delta lpxR$) a 21°C (E) y a 37°C (F). Los resultados son representativos de tres extracciones independientes.

A continuación se comprobó si la mayor deacilación encontrada en el mutante *pmrF* era debida a una mayor expresión de *lpxR* en este mutante. Para ello, se midió la cantidad de luz producida por la fusión transcripcional *lpxR::lucFF* en el mutante *YeO8 $\Delta pmrF$* . No se observaron diferencias significativas con respecto a su expresión en la cepa silvestre, tanto a 21°C como a 37°C (Figura 57).

Estos resultados sugieren que la modificación del lípido A de YeO8 con aminoarabinosa a 21°C está asociada a una menor actividad de la enzima LpxR a esta temperatura.

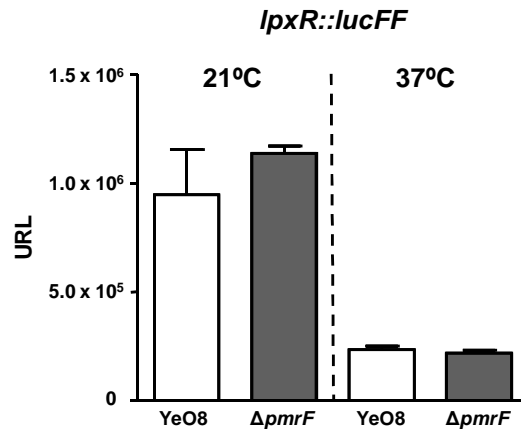


Figura 57. La expresión de *lpxR* no está alterada en el mutante YeO8 $\Delta pmrF$. Análisis de la expresión de *lpxR* midiendo la actividad luciferasa de la fusión transcripcional *lpxR:lucFF* en la cepa silvestre (YeO8, barras blancas) y en el mutante YeO8 $\Delta pmrF$ ($\Delta pmrF$, barras grises) crecidos a 21°C y a 37°C. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por quintuplicado.

3.4 Modelaje de la proteína LpxR

Los resultados anteriores sugerían claramente que el contenido de aminoarabinosa en la membrana externa inactivaba directamente la actividad deacilasa de LpxR a 21°C. Otra posibilidad, no necesariamente excluyente, es que la modificación del lípido A con aminoarabinosa dificultara la entrada de la molécula del lípido A en el sitio activo de la enzima. La estructura molecular de LpxR de *Salmonella* ya ha sido determinada y el sitio activo caracterizado a nivel molecular⁴⁷⁶. En colaboración con el grupo de Tiina Salminen (Abo Akademi, Turku, Finlandia) se realizó el modelaje de LpxR de YeO8 lo que nos permitió confirmar que la estructura molecular es prácticamente idéntica. Más aún, los aminoácidos claves del sitio activo ya identificados por Rutten y colaboradores⁴⁷⁶ están presentes en la misma posición en nuestra enzima. Sin embargo, en la cavidad del sitio activo de la enzima de YeO8 se encuentra una D (ácido aspártico) mientras que en la enzima de *Salmonella* aparece una G (glicina). Significativamente, los estudios de modelaje realizados por el grupo

de Tiina Salminen demostraron que la presencia de ácido aspártico en la cavidad del sitio activo impide la entrada de un lípido A que contenga aminoarabinosa.

Para confirmar las predicciones de los resultados del modelaje de la proteína, se mutaron diferentes residuos de LpxR (**Tabla 11**) mediante mutagénesis dirigida (material y métodos apartado 5). En primer lugar, los plásmidos que contenían los alelos mutados de LpxR se introdujeron en *E. coli* MG1655. A continuación, se analizó la estructura del lípido A mediante MALDI-TOF de todos los transformantes a 37°C para comprobar si la actividad de LpxR estaba afectada por la mutación. La mayoría de los transformantes presentaron la especie de lípido A deaacilada (m/z 1362) (**Tabla 11**). Sin embargo, los transformantes con mutaciones en los residuos LpxR(N9A), LpxR(D10A), LpxR(T34A), LpxR(H122A) y LpxR(Q118) no deacilaron el lípido A de *E. coli* MG1655. Estos resultados corroboran los obtenidos por Rutten y colaboradores⁴⁷⁶ ya que los residuos N9A, D10A, T34A y H122A son esenciales para ejercer la actividad de LpxR. Señalar que estos residuos están conservados en todas las LpxR homólogas⁴⁷⁶.

Tabla 11. Efecto de las mutaciones en *lpxR* sobre la deacilación del lípido A

Mutaciones	Deacilación del lípido A	
	<i>E. coli</i> (37°C)	<i>Y. enterocolitica</i> (21°C)
	m/z 1362	m/z 1414
N9A	No	No
D10A	No	n.r.
S34A	No	n.r.
H122A	No	n.r.
Q118A	No	No
Q57A	Si	No
Y133A	Si	No
G36A	Si	No

F79A	Si	No
P62A	Si	No
W133A	Si	No
D53G	Si	Si

n.r.; no realizado

A continuación, se introdujeron en el mutante *YeO8ΔlpxR* sólo aquellos alelos que habían deacilado el lípido A de *E.coli* MG1655 y se analizó la estructura del lípido A de todos los transformantes crecidos tanto a 21°C como a 37°C. Todos los alelos mutantes de LpxR restauraron las especies tetraaciladas de lípido A típicas de la cepa silvestre *YeO8* a 37°C, presentando en sus espectros el pico (*m/z* 1388) (**Tabla 11**). Sin embargo a 21°C, ningún transformante presentaba especies deaciladas de lípido A excepto el transformante con el residuo LpxR (D53G) que sí presentó deacilación en la estructura de su lípido A a 21°C (**Figura 58**). Señalar la detección de la especie modificada con aminoarabinosa (*m/z* 1954).

Todos estos resultados confirman, en primer lugar, los resultados obtenidos por Rutten y colaboradores caracterizando el centro catalítico conservado de LpxR y en segundo lugar, la predicción realizada por Tiina Salminen en los estudios de modelaje.

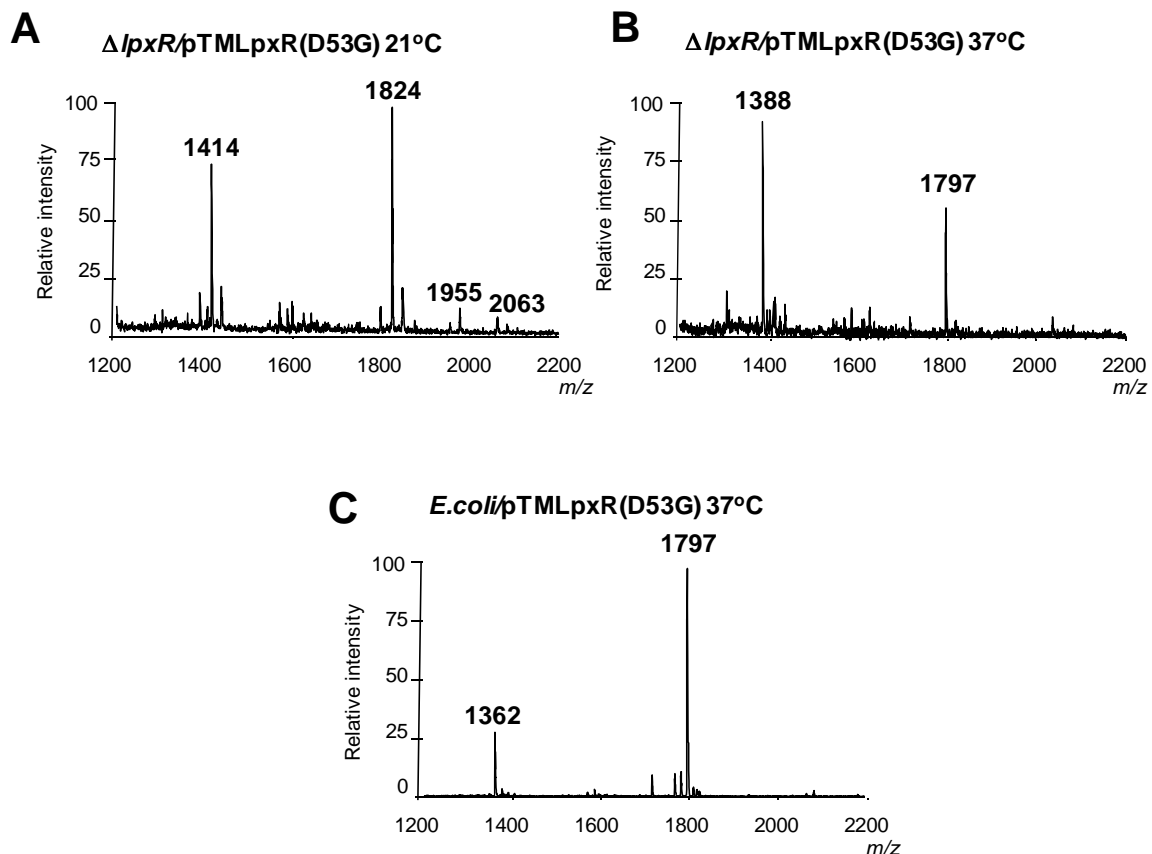


Figura 58. El mutante $YeO8\Delta lpxR$ en el residuo LpxR (D53G) presenta especies deaciladas de lípido A a 21°C. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído del mutante $YeO8\Delta lpxR/ptMLlpxR(D53G)$ a 21°C (A) y a 37°C (B) y *E.coli/ptMLlpxR(D53G)* crecido a 37°C como control de deacilación. Los resultados son representativos de tres extracciones independientes.

3.5 Regulación de la expresión de *lpxR*

Hasta el momento, todos los resultados indican que existe una correlación inversa entre la adición de aminoarabinosa al lípido A de *YeO8* y la deacilación del mismo. En consecuencia, se planteó la posibilidad de que los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB que regulan positivamente la biosíntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A pudieran ejercer una regulación negativa sobre la expresión de *lpxR*.

Para abordar esta hipótesis, se introdujo la fusión transcripcional *lpxR::lucFF* anteriormente descrita en los mutantes $YeO8\Delta phoPQ$, $YeO8\Delta pmrAB$ y $YeO8\Delta phoPQ-\Delta pmrAB$ y se midió la cantidad de luz. La expresión de *lpxR* fue significativamente más elevada en los mutantes simples $YeO8\Delta phoPQ$ y $YeO8\Delta pmrAB$ que en la cepa silvestre, y esto tanto creciendo

las bacterias a 21°C como a 37°C (**Figura 59 A y B**). No obstante, la expresión de *lpxR* en el mutante doble *YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB* fue igual que en la cepa silvestre (**Figura 59 A y B**).

Pero dado que RovA también regula la modificación del lípido A con aminoarabinosa (ver apartado 1.6 de Resultados) también es posible que este regulador controle negativamente la expresión de *lpxR*. En este sentido hay que señalar que la propia expresión de *rovA* cambia en los fondos genéticos de *phoPQ* y *pmrAB* siendo menor que en la cepa silvestre en los mutante simples y exactamente igual que en la cepa silvestre en el mutante doble *YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB* (**Figura 36 apartado 1 de resultados**). Curiosamente, los resultados para *lpxR* siguen este mismo patrón.

Para comprobar el papel de RovA en la regulación de *lpxR* se midió la expresión de *lpxR::lucFF* en el mutante *YeO8ΔrovA* a 21°C y a 37°C. Como se puede observar en la **Figura 59 A y B** la expresión de *lpxR* fue significativamente mayor en el mutante *YeO8ΔrovA* que en la cepa silvestre y además sus niveles de expresión fueron similares a los del mutante *YeO8ΔphoPQ* a ambas temperaturas (**Figura 59 A y B**). No obstante, a 21°C en el mutante doble *YeO8ΔrovA-ΔphoPQ* los niveles de expresión de *lpxR* siguen siendo elevados pero menores que en los mutantes simples *YeO8ΔrovA* y *YeO8ΔphoPQ* (**Figura 59A**). A 37°C, la expresión de *lpxR* en este doble mutante fue significativamente menor que en los mutantes simples *YeO8ΔrovA* y *YeO8ΔphoPQ* aunque mayor que en la cepa silvestre (**Figura 59B**). En el mutante doble *YeO8ΔrovA-ΔphoPQ* la expresión de *lpxR* deja de estar regulada por la temperatura (**Figura 59C**). Comparando los resultados de la expresión de *lpxR* en el doble mutante *YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB*, en el doble mutante *YeO8Δrova-ΔphoPQ* y en el triple mutante *YeO8ΔrovA-ΔphoPQ-ΔpmrAB* crecidos a 21°C, se observa que en ausencia del regulador negativo RovA, el sistema de dos componentes PmrA/PmrB y/o una proteína regulada por PmrA/PmrB parece ejercer una regulación positiva sobre la expresión de *lpxR*, ya que en el mutante triple *YeO8ΔrovA-ΔphoPQ-ΔpmrAB* los niveles de expresión de *lpxR* son incluso inferiores que en la cepa silvestre *YeO8* (**Figura 59A**). En cambio a 37°C, la expresión de *lpxR* en el triple mutante no fue

significativamente diferente con respecto a la cepa silvestre y al mutante *YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB* (Figura 59B).

En resumen, todos estos resultados indican que la expresión de *lpxR* se encuentra negativamente regulada por los mismos reguladores que activan los genes necesarios para modificar el lípido A de *YeO8* con aminoarabinosa.

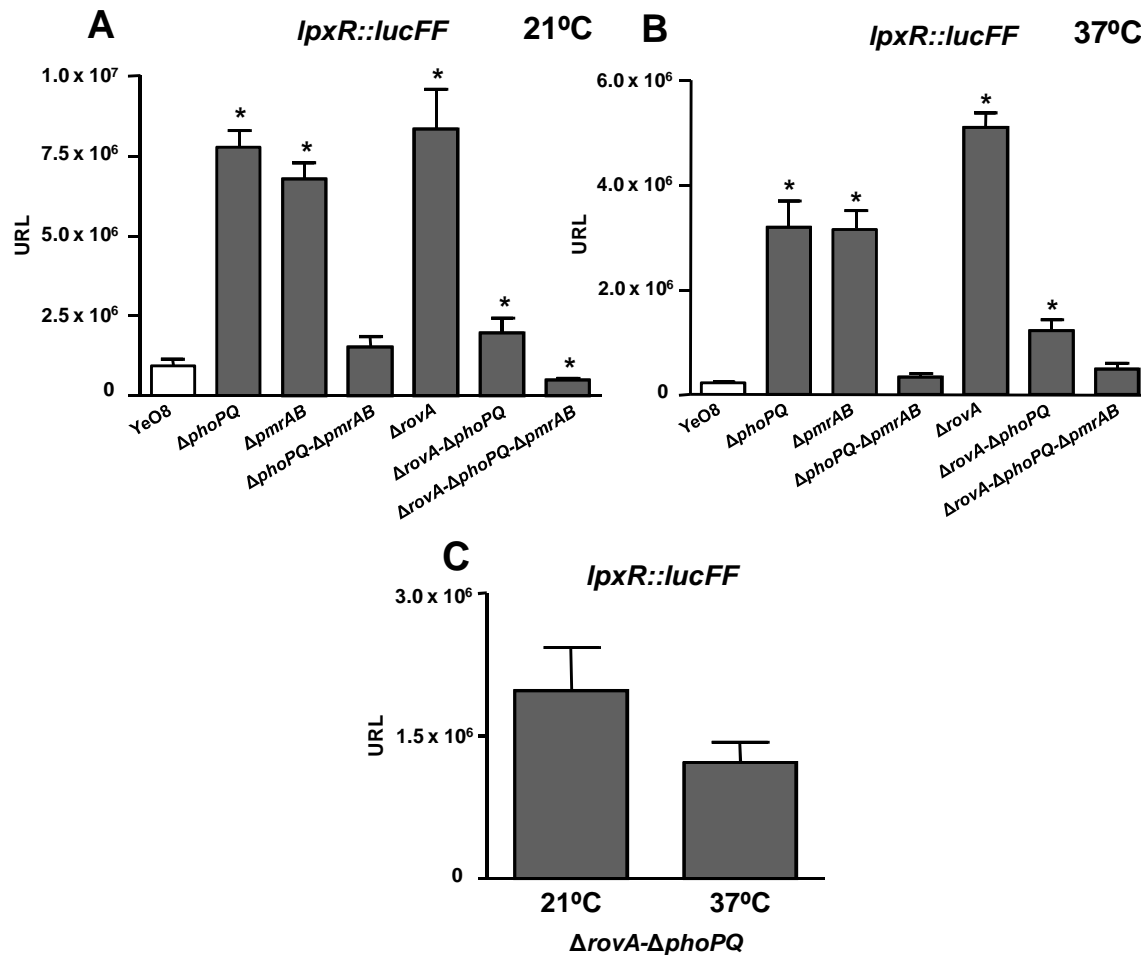


Figura 59. Regulación de la expresión de *lpxR*. Análisis de la expresión de *lpxR* midiendo la actividad luciferasa de la fusión transcripcional *lpxR:lucFF* en la cepa silvestre (*YeO8*, barras blancas), y en los mutantes (barras grises) *YeO8ΔphoPQ* (*ΔphoPQ*), *YeO8ΔpmrAB* (*ΔpmrAB*), *YeO8ΔphoPQ-ΔpmrAB* (*ΔphoPQ-ΔpmrAB*), *YeO8ΔrovA* (*ΔrovA*), *YeO8ΔrovA-ΔphoPQ* (*ΔrovA-ΔphoPQ*) y *YeO8ΔrovA-ΔphoPQ-ΔpmrAB* (*ΔrovA-ΔphoPQ-ΔpmrAB*), crecidos a 21°C (A) y a 37°C (B). La expresión de *lpxR* en el mutante doble *YeO8ΔrovA-ΔphoPQ* (*ΔrovA-ΔphoPQ*) no está regulada por la temperatura (C). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre *YeO8*.

3.6 Relación entre la acilación del lípido A y la expresión de factores de virulencia de *Y. enterocolitica* O:8

3.6.1 Movilidad y análisis del regulón flagelar

Como se ha explicado en la Introducción, *Y. enterocolitica* presenta movilidad únicamente en un rango de temperatura de 21 a 29°C^{280,402,617,618}. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que los mutantes de las aciltransferasas del lípido A, *YeO8ΔmsbB* y *YeO8ΔlpxPGB*, presentaban una menor movilidad con respecto a la cepa silvestre⁴²⁵. Por tanto, se analizó si el mutante *YeO8ΔlpxR* presentaba una movilidad alterada. Para ello, se cuantificó la migración de la cepa silvestre y del mutante *YeO8ΔlpxR* tras crecerlas a 21°C en el medio 1% triptona-0,3% agar⁶¹⁸. Se puede observar en **Figura 60** que el mutante *YeO8ΔlpxR* presentó menor movilidad que *YeO8*.

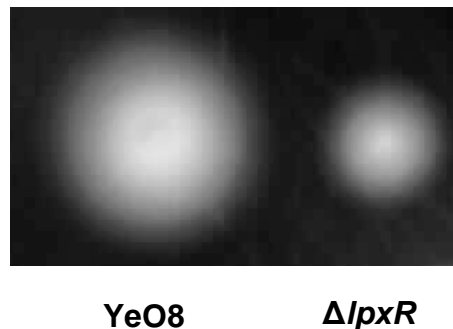


Figura 60. Movilidad de las cepas *YeO8* y *YeO8ΔlpxR* ($\Delta lpxR$) crecidas a 21°C

Varios trabajos han demostrado que existe una perfecta correlación entre movilidad, los niveles de producción de flagelina, y la expresión de *flhDC* (genes tipo I) que codifica el principal complejo de regulación del flagelo^{46,618}. Por consiguiente, la menor movilidad del mutante *YeO8ΔlpxR* podría ser debida a una menor expresión del operón *flhDC*. Para comprobarlo, se introdujo la fusión transcripcional *flhDC::lucFF*⁴⁶ en la cepa silvestre y el mutante *YeO8ΔlpxR* y se determinó la cantidad de luz. A 21°C, el nivel de expresión de *flhDC* fue menor en la cepa mutante que en la cepa silvestre (**Figura 61A**). El plásmido *pTMlpxR* restauró la expresión de *flhDC* a los niveles

de la cepa silvestre. Por otro lado, también se estudió la expresión de *flhDC* a 37°C. La **Figura 61B** muestra que no se observaron diferencias entre cepas.

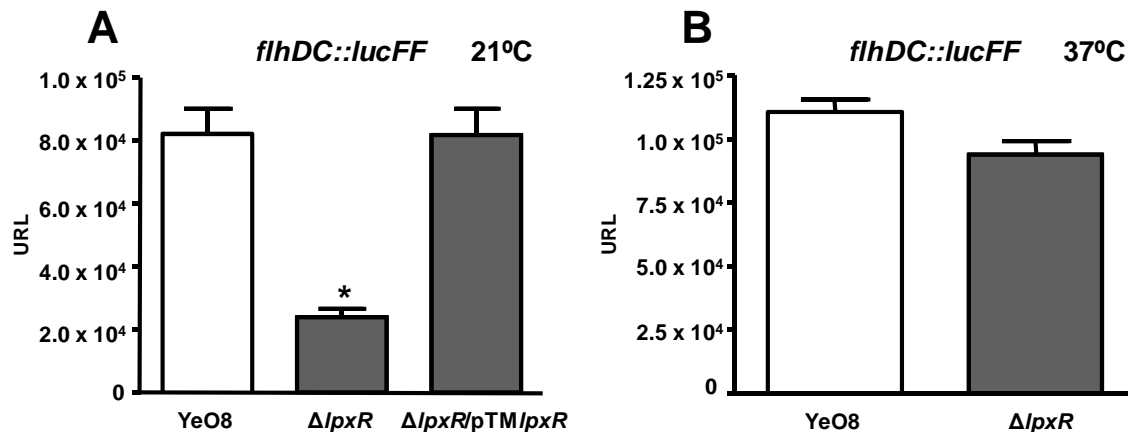


Figura 61. La expresión de *flhDC*, el principal complejo de regulación del flagelo, está disminuida en el mutante YeO8ΔlpxR. Análisis de la expresión de *flhDC* midiendo la actividad luciferasa de la fusión transcripcional *flhDC:lucFF* en la cepa silvestre (YeO8, barras blancas) y en el mutante YeO8ΔlpxR (ΔlpxR, barras grises) crecidos a 21°C y a 37°C. El plásmido pTMlpxR restauró los niveles de *flhDC* a niveles de la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test t de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre YeO8.

flhDC también regula otro factor de virulencia de YeO8, la fosfolipasa A, YplA⁴⁹⁰. YplA forma parte del regulón del flagelo y es secretada a 26°C por el sistema tipo III del flagelo^{491,617}. Considerando que la expresión de *flhDC* está disminuida en el mutante YeO8ΔlpxR se estudió si la expresión de *yplA* también estaba alterada en este mutante. Para ello, se introdujo la fusión *yplA::lacZYA*⁴⁹¹ mediante recombinación homóloga en la cepa silvestre YeO8 y en el mutante YeO8ΔlpxR y se cuantificó la actividad β-galactosidasa. Tal y como esperábamos, la **Figura 62** muestra que la expresión de *yplA* fue inferior en el mutante YeO8ΔlpxR que en la cepa silvestre. El plásmido pTMlpxR restauró la expresión de *yplA::lacZYA* a los niveles de la cepa silvestre.

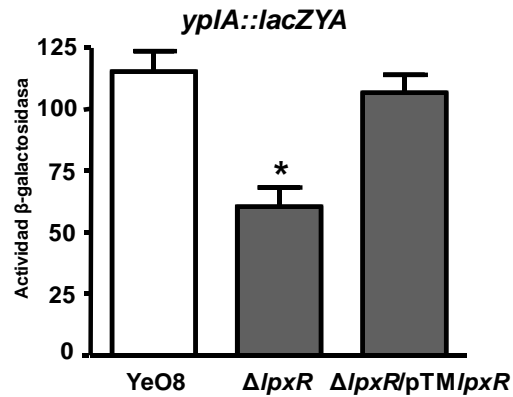


Figura 62. La expresión de *yplA* está disminuida en el mutante **YeO8Δ*lpxR***. Análisis de la expresión de *yplA* en la cepa silvestre YeO8 y en el mutante YeO8Δ*lpxR* (Δ*lpxR*) crecidas a 21°C. El plásmido pTM*lpxR* restauró los niveles de *yplA* a niveles de la cepa silvestre. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto a la cepa silvestre.

Todos estos resultados indican que la expresión del regulón del flagelo está disminuido en el mutante YeO8Δ*lpxR*, lo que se traduce en una menor motilidad y una reducción en la expresión de *yplA*.

3.6.2 Invasin y la acilación del lípido A

Invasin (Inv) es una proteína de membrana externa y es el factor de invasión primario de *Y. enterocolitica* en el epitelio intestinal^{422,619}. Inv es importante en las primeras fases del proceso de infección. Un muntante *inv* no coloniza eficientemente las placas de Peyer en los primeros estadíos de la infección⁴²². Estudios previos de nuestro laboratorio, demostraron que el grado de acilación del lípido A afecta a la expresión de *inv*⁴²⁵. Por consiguiente, se decidió analizar si la expresión de *inv* estaba alterada en el mutante YeO8Δ*lpxR*. Para ello, se introdujo la fusión *inv:phoA*⁴¹⁹ en la cepa silvestre y en el mutante YeO8Δ*lpxR* y se determinó la actividad fosfatasa alcalina. Los resultados de la **Figura 63A** muestran que la expresión de *inv* fue menor en el mutante YeO8Δ*lpxR* que en la cepa silvestre. El plásmido pTM*Ye**lpxR* restauró la expresión de *inv* a los niveles de cepa silvestre (**Figura 63A**). Con el fin de confirmar si esta menor expresión se correlaciona con una menor invasión de células eucariotas, se realizó un ensayo de invasión de células HeLa. El porcentaje de invasión de las células HeLa fue un 55% menor cuando las

células fueron infectadas con el mutante YeO8 Δ pxR comparado con la cepa silvestre (**Figura 63B**).

Tanto en *Y. enterocolitica* como en *Y. pseudotuberculosis* se ha demostrado que RovA es el activador transcripcional de *inv*^{387,458}. Por consiguiente, se planteó si la disminución de la expresión de *inv* en el mutante YeO8 Δ pxR se debía, al menos en parte, a la disminución de la expresión de *rovA*. Para comprobarlo, se introdujo la fusión transcripcional *rovA::lucFF* en la cepa silvestre y en el mutante YeO8 Δ pxR y se midió la actividad luciferasa. La expresión de *rovA* fue inferior en el mutante YeO8 Δ pxR que en la cepa silvestre (**Figura 63C**). El plásmido pTM/pxR restauró la expresión de *rovA* a los niveles de la cepa silvestre.

Todos estos resultados indican que la expresión de *inv* está disminuida en el mutante YeO8 Δ pxR debido muy probablemente a que la expresión de su activador transcripcional RovA se encuentra también disminuida en este mutante.

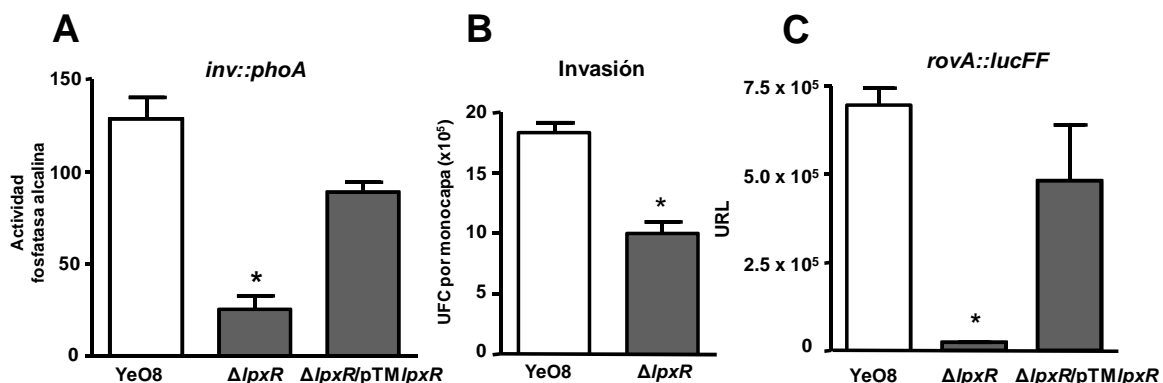


Figura 63. Análisis de la expresión de *inv* y *rovA* en el mutante YeO8- Δ pxR y análisis de la invasión en células eucariotas del mutante YeO8- Δ pxR . Expresión de *inv* en YeO8 y YeO8 Δ pxR (Δ pxR) (**A**). Ensayo de invasión de células HeLa de YeO8 y el mutante YeO8 Δ pxR (Δ pxR) (**B**). Expresión de *rovA* en YeO8 y YeO8- Δ pxR (Δ pxR) (**C**). El plásmido pTM/pxR restauró los niveles de *inv* y *rovA* a niveles de la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

3.6.3 Factores de virulencia codificados en el plásmido pYV y la acilación del lípido A

Nosotros y otros autores hemos demostrado que cambios en la estructura del LPS afectan a la expresión de los sistemas tipo III de secreción y que existe una co-regulación de ambos factores de virulencia^{23,46,426}. Por consiguiente, se estudió si el sistema tipo III de secreción, codificado en el plásmido de virulencia de YeO8, estaba alterado en el mutante YeO8Δ*lpxR*. A 37°C y en concentraciones bajas de calcio, este sistema secreta una serie de proteínas efectoras denominadas Yops que permiten a la bacteria multiplicarse extracelularmente en los tejidos linfoides^{135,139}. Se analizó la secreción de Yops en el mutante YeO8Δ*lpxR* y como se puede observar en la **Figura 64A**, el mutante secretó la misma cantidad de Yops que la cepa silvestre.

Seguidamente se determinó si la translocación de Yops al citosol de las células eucariotas estaba afectada en el mutante YeO8Δ*lpxR*. La inyección de YopE en el citosol de células A549 por parte de YeO8 induce la disrupción y condensación de la estructura de los microfilamentos de actina de las células^{471,579}. Este fenómeno recibe el nombre de citotoxicidad y es una de las formas más sensibles para detectar la translocación de YopE al citosol de la célula eucariota⁴⁷². La translocación de YopE en células A549 no estaba afectada en el mutante YeO8Δ*lpxR* (**Figura 64C**) y, tal y como esperábamos, el mutante *lpxR* alteró el citoesqueleto de las células A549 de la misma manera que la cepa silvestre (**Figura 64B**). Como control, las células se infectaron con el mutante YeO8Δ*yopE* y, en este caso, no se detectó citotoxicidad (**Figura 64B**).

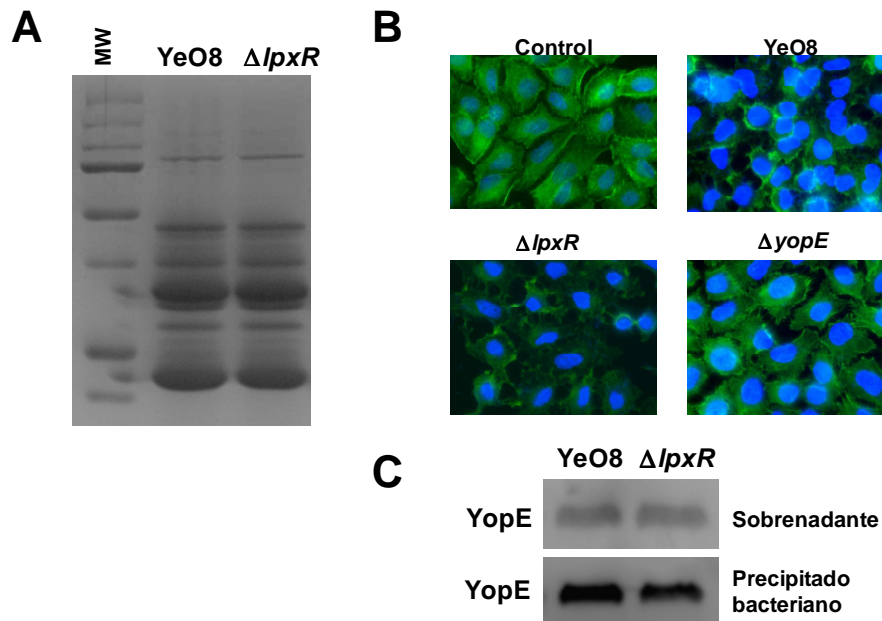


Figura 64. Análisis de la secreción de Yops, la translocación de YopE y el efecto citotóxico del mutante YeO8ΔlpxR. (A) Electroforesis de las proteínas Yops presentes en los sobrenadantes de cultivos de YeO8 y YeO8ΔlpxR en condiciones de restricción de Ca²⁺ analizados mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. **(B)** Análisis del efecto citotóxico de YeO8, YeO8ΔlpxR y YeO8ΔyopE en células A549. Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia. **(C)** Análisis por Western Blot de la translocación de YopE al citosol de las células epiteliales A549 (sobrenadante) Los resultados en todos los paneles son representativos de tres experimentos independientes.

yadA es también un factor de virulencia codificado en el plásmido pYV y sólo se expresa a 37°C⁵¹⁹. *YadA* es una proteína localizada en la membrana externa de la bacteria y está implicada en la virulencia, en la adhesión a células eucariotas, en la unión a moléculas de la matriz extracelular como el colágeno- α 1 y en la resistencia al complemento¹⁶⁷. La expresión de *YadA* se analizó mediante SDS-PAGE seguido de una tinción con Azul de Coomasie y los resultados muestran que el mutante YeO8ΔlpxR expresó la misma cantidad de proteína en su membrana que la cepa silvestre (**Figura 65A**). Para analizar si la funcionalidad de *YadA* estaba alterada en el mutante YeO8ΔlpxR, se determinó su adherencia al colágeno tipo I, proceso dependiente de *YadA*. Se analizó por inmunofluorescencia y se utilizó como control negativo la cepa silvestre sin plásmido de virulencia (YeO8c). El mutante YeO8ΔlpxR y la cepa silvestre YeO8 se adhirieron al colágeno de forma similar (**Figura 65B**).

En resumen, estos resultados indican que tanto la producción como la función de los factores de virulencia codificados en el plásmido pYV (YadA y Yops) no están afectadas en el mutante *YeO8Δ/pxR*.

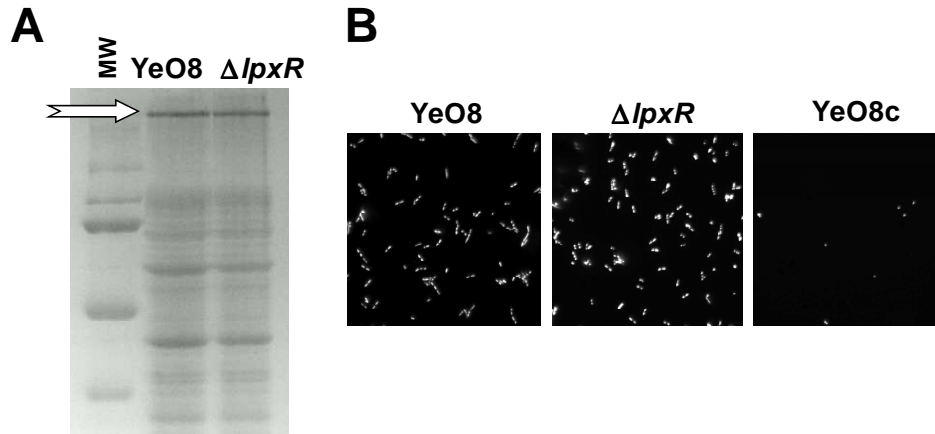


Figura 65. Análisis de la expresión de YadA en YeO8 y YeO8Δ/pxR (Δ/pxR). Análisis por SDS-PAGE de las bacterias lisadas crecidas a 37°C en RPMI1640. La proteína YadA se indica con una flecha (A). Análisis por inmunofluorescencia de la adherencia de YeO8, YeO8c y el mutante *YeO8Δ/pxR* al colágeno I (B).

3.7 Acilación del lípido A y el sistema inmune innato

Los péptidos antimicrobianos (PAs) son componentes del sistema inmune innato los cuales son la primera barrera defensiva frente a las infecciones. Considerando que una de las principales estrategias de las bacterias Gram negativas para resistir frente a los PAs es la modificación de su lípido A^{87,397,403}, se evaluó la susceptibilidad del mutante *YeO8Δ/pxR* frente a la PxB. Los resultados mostrados en la **Figura 66** demuestran que el mutante *YeO8Δ/pxR* fue tan susceptible como la cepa silvestre frente a la PxB, tanto a 21°C como a 37°C. Ambas cepas fueron más sensibles al péptido a 37°C que a 21°C.

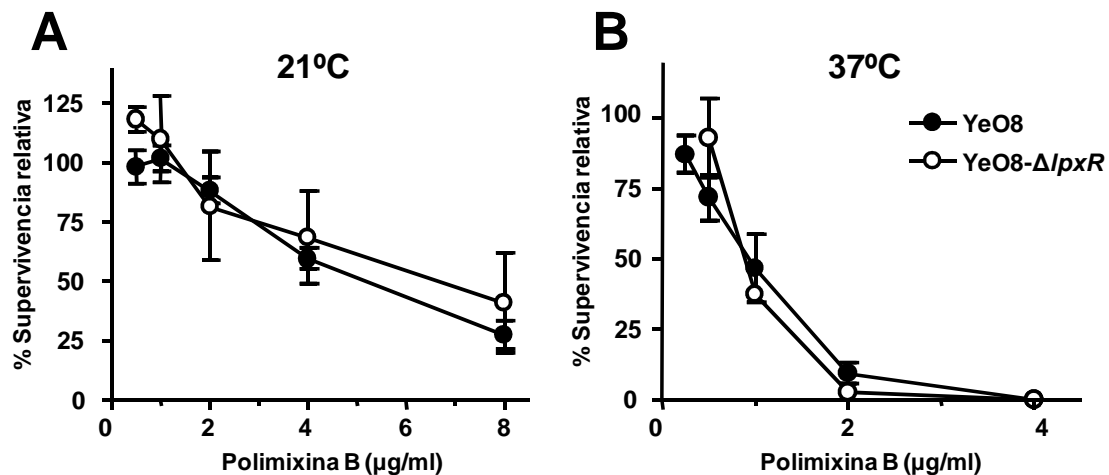


Figura 66. Sensibilidad del mutante YeO8ΔlpxR frente a la PxB. La cepa silvestre YeO8 (●) y el mutante YeO8ΔlpxR (○) se crecieron a 21°C (A) y a 37°C (B) y fueron expuestos a diferentes concentraciones de PxB. Cada punto de la gráfica representa la media y desviación estándar de ocho muestras procedentes de cuatro experimentos independientes.

Como se ha resumido en el apartado 2.1 de la Introducción el LPS es reconocido por el sistema inmune vía un complejo receptor que incluye al TLR4^{125,249} y desencadena la secreción de citoquinas pro-inflamatorias que provocan un reclutamiento de células del sistema inmune en el lugar de la infección. Las peculiaridades estructurales del lípido A, entre las que se encuentran la posición y tipo del ácido graso, determinan la conformación que adopta el LPS y, por tanto, la capacidad de activar este tipo de respuesta celular⁵⁶⁴. Considerando los cambios en cuanto a acilación del lípido A que presenta el mutante YeO8ΔlpxR a 37°C, se evaluaron las propiedades inmunoestimuladoras del mutante YeO8ΔlpxR. Para ello, se determinaron los niveles de secreción de TNFα por parte de macrófagos infectados con la cepa silvestre o con el mutante YeO8ΔlpxR crecidos tanto a 21°C como a 37°C. En primer lugar, los resultados muestran que YeO8 induce más secreción de TNFα a 37°C que al crecerla a 21°C. Los mismos resultados se encontraron para el mutante *lpxR*. A 37°C YeO8 inyecta YopP que es una proteína efectora anti-inflamatoria^{74,413}. De hecho como muestra la figura 67, el mutante *yopP* crecido a 37°C induce la misma cantidad de TNFα que la cepa silvestre YeO8 crecida a 21°C. Por consiguiente, se planteó la posibilidad de que YopP contrarrestara la respuesta inflamatoria provocada por el mutante YeO8ΔlpxR. De hecho, el mutante doble YeO8ΔyopP-ΔlpxR fue la cepa que provocó la mayor secreción

de TNF α en macrófagos (**Figura 67**). Además, el mutante YeO8 Δ *lpxR* sin plásmido de virulencia pYV, y por lo tanto sin YopP, crecido a 37°C provocó una secreción de TNF α mayor que aquella inducida por la cepa silvestre sin plásmido de virulencia a la misma temperatura. Señalar que los niveles de TNF α inducidos por el mutante *lpxR* a 37°C sin plásmido de virulencia fueron iguales de aquellos inducidos por el mutante YeO8 Δ *yopP*- Δ *lpxR* (**Figura 67**). Finalmente, los niveles de secreción de TNF α por parte de la cepa silvestre sin plásmido de virulencia crecida a 37°C fueron significativamente menores comparando con los niveles inducidos por la cepa silvestre crecida a 21°C, cuando YeO8 presenta un lípido A hexaacilado.

Todos estos resultados reflejan la importancia del nivel de acilación del lípido A en las propiedades inmunoestimuladoras de YeO8.

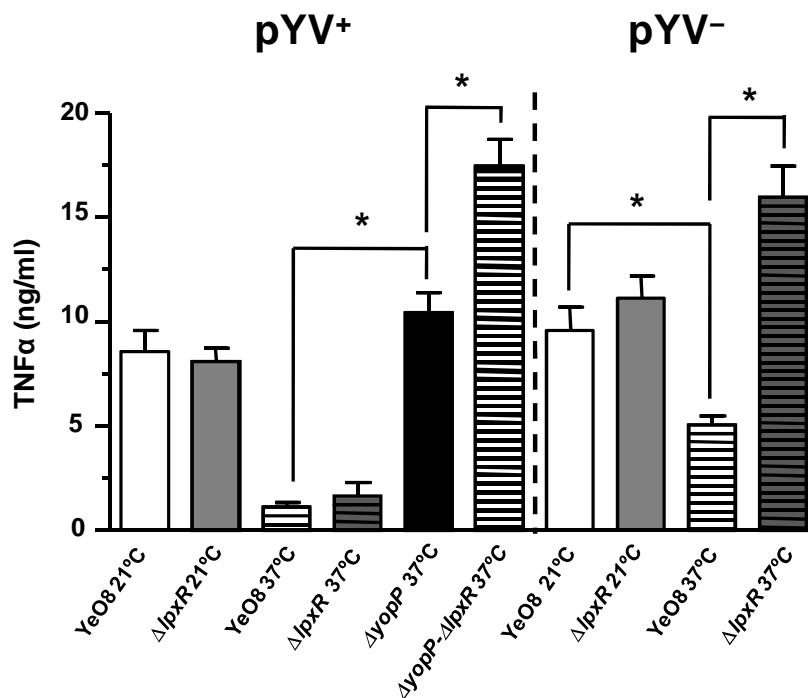


Figura 67. Efecto de la acilación del lípido A de YeO8 sobre la secreción de citoquinas por parte de macrófagos de ratón RAW-264.7. Análisis de la cantidad de TNF- α secretado por los macrófagos RAW al sobrenadante al ponerlos en contacto con YeO8 y el mutante YeO8 Δ *lpxR* con y sin plásmido de virulencia pYV (pYV⁺, pYV⁻) a 21°C y 37°C. El efecto de YopP se analizó únicamente a 37°C. La cantidad de TNF- α se determinó mediante ELISA (Bender MedSystems). Los resultados corresponden a cinco experimentos independientes realizados por duplicado. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa indicada.

4. PAPEL DE Hfq EN LA REGULACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL LÍPIDO A DE *Y. enterocolitica* O:8

Las secuencias de ARN no-codificantes (sRNAs) participan en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, normalmente afectando a la traducción de proteínas, a la estabilidad del transcrito y/o a la actividad de la proteína. Para realizar correctamente su función, algunos sRNAs dependen de la chaperona Hfq, que media la interacción del sRNA con su diana de RNA mensajero¹¹⁵. Estudios recientes han demostrado que Hfq contribuye en la patogénesis de un gran número de bacterias, sugiriendo que los ARNs juegan un papel esencial en la regulación de la virulencia^{126,176,194,300,354,464,509}.

En el género *Yersinia*, se ha demostrado que en *Y. pestis* y en *Y. pseudotuberculosis* Hfq contribuye a su virulencia en el modelo de ratón¹⁹⁴. Además en *Y. pseudotuberculosis* se ha demostrado que Hfq participa en la regulación de la motilidad, la supervivencia intracelular y la producción de Yops²⁹⁶. En *Y. enterocolitica* no existe ningún estudio que defina la función de Hfq en la virulencia de la bacteria. No obstante, sí se ha descrito que Hfq regula positivamente la secreción de la enterotoxina Yst³⁹¹.

Teniendo en cuenta todo el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral y debido a la importancia de Hfq como regulador post-transcripcional, nos planteamos analizar si Hfq desempeña algún papel en la regulación de las modificaciones del lípido A.

Análisis *in silico* del genoma de YeO8 (Accession number AM286415)⁵⁵⁴ permitió identificar el gen homólogo de *hfq*, anotado como YE0377 (**Tabla 8, Anexo III**). Se construyó el mutante YeO8 Δ *hfq* y se analizó su estructura del lípido A creciendo la bacteria tanto a 21°C como a 37°C (**Figura 68**). A 21°C, aparecen las mismas especies de lípido A que en el espectro de la cepa silvestre. No obstante, el pico correspondiente a la estructura del lípido A heptaacilada es más prominente en el mutante YeO8 Δ *hfq* (**Figura 68**). En el apartado 1.2 de Resultados de este trabajo, se ha demostrado que el gen responsable de la adición de un séptimo ácido graso al lípido A de YeO8 es *pagP*. A 37°C, aparecen también los mismos picos que en la cepa silvestre pero además un pico de *m/z* 1824 que es consistente con una especie

hexaacilada con un C_{16:1} en lugar de un C₁₄ en la posición 2'-3-OH-C14 del lípido A.

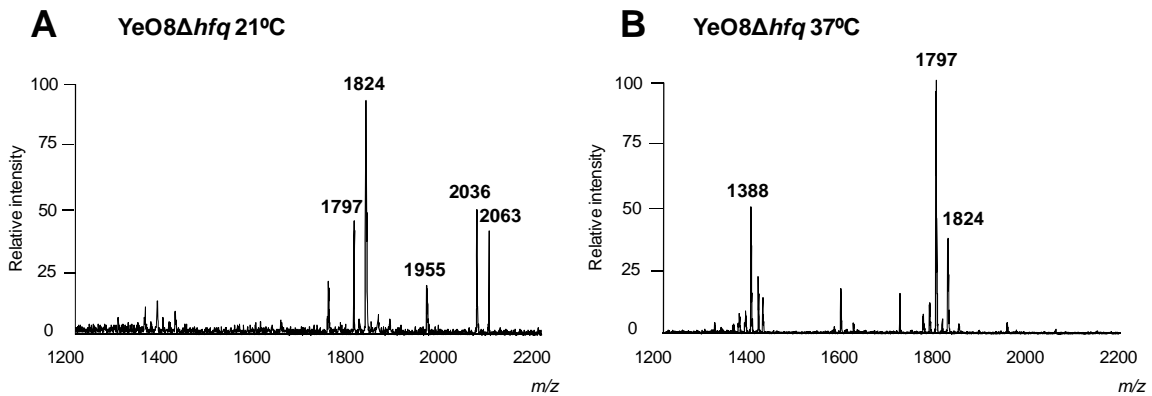


Figura 68. Estructura del lípido A del mutante *YeO8Δhfq* crecido a 21°C y a 37°C. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído del mutante *YeO8Δhfq* crecido a 21°C (A) y a 37°C (B). Los resultados en ambos paneles son representativos de tres extracciones independientes.

Nuestro grupo describió que LpxP es la aciltransferasa responsable de la adición a 21°C de C_{16:1} al lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 en lugar de C₁₄⁴²⁵. Además, se demostró que en *YeO8* la expresión de *lpxP* está regulada por la temperatura, expresándose más a 21°C que a 37°C, como también ocurría en *Y. pestis*^{425,456}. Por lo tanto, fue sorprendente observar que a 37°C pudiera actuar la aciltransferasa LpxP en el fondo genético del mutante *hfq*.

Para comprobar que efectivamente la especie de lípido A de m/z 1822 presente en el espectro de 37°C del mutante *YeO8Δhfq* era debida a la actividad inusual de LpxP a 37°C, se construyó el doble mutante *YeO8Δhfq-ΔlpxP* y se analizó la estructura de su lípido A a 21°C y a 37°C. Como se puede observar en la **Figura 69** el pico m/z 1822 desaparece en el doble mutante *YeO8Δhfq-ΔlpxP*, confirmando que la aciltransferasa LpxP era la responsable de la adición de un C_{16:1} a 37°C.

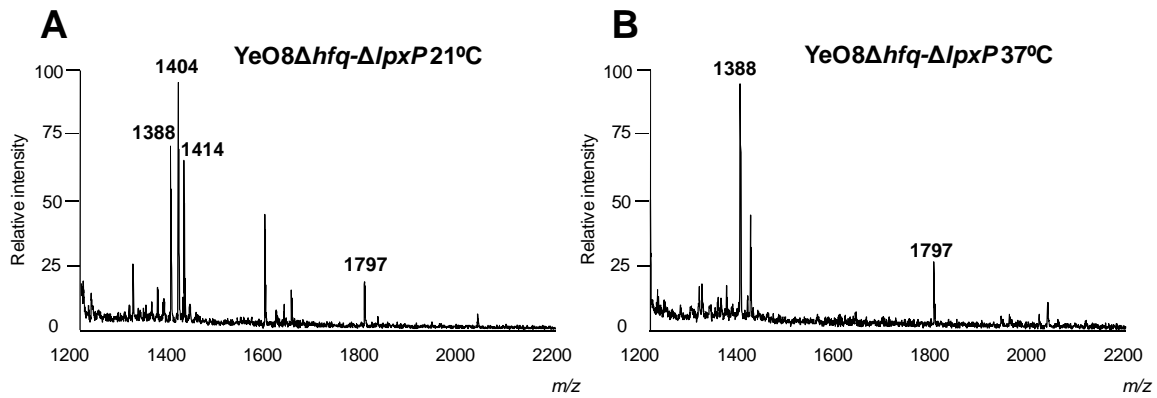


Figura 69. Estructura del lípido A del mutante *YeO8Δhfq-ΔlpxP* crecido a 21°C y a 37°C. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído del doble mutante *YeO8Δhfq-ΔlpxP* crecido a 21°C (A) y a 37°C (B). Los resultados en ambos paneles son representativos de tres extracciones independientes.

Las características más llamativas de la estructura del lípido A del mutante *YeO8Δhfq*, fue la mayor heptaacilación a 21°C y la adición inusual de un $C_{16:1}$ a 37°C. Por consiguiente, nos planteamos si la expresión de los genes responsables de estas modificaciones estaba aumentada en el fondo genético del mutante *YeO8Δhfq*. Para comprobarlo, se midió la expresión de *pagP::lucFF* y *lpxP::lucFF* en la cepa silvestre y en el mutante *YeO8Δhfq*. En la **Figura 70 A y B** se demuestra que en el mutante *YeO8Δhfq* la expresión de *pagP* está aumentada tanto a 21°C como a 37°C mientras que la de *lpxP* sólo fue superior a 37°C.

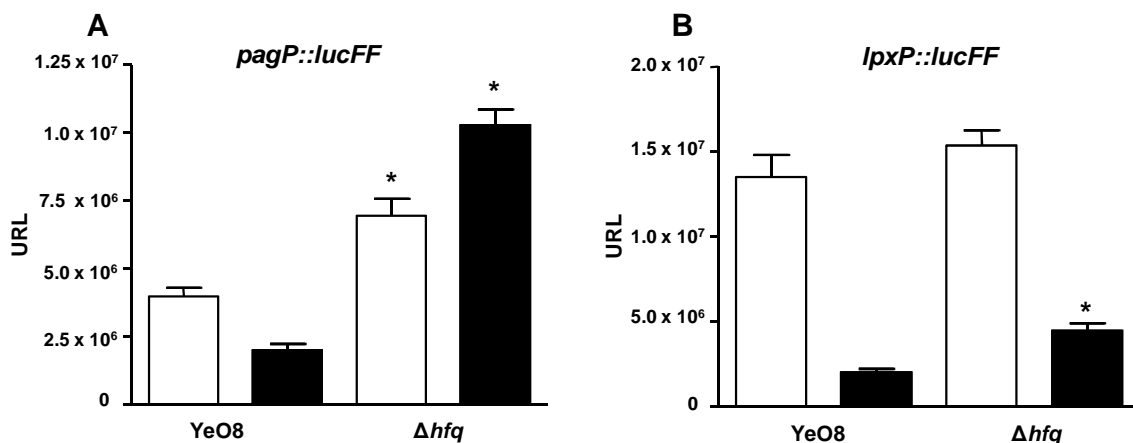


Figura 70. Análisis de la expresión de *pagP* y *lpxP* en el mutante *YeO8Δhfq*. Análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales *pagP::lucFF* (A) y *lpxP::lucFF* (B) en la cepa silvestre (*YeO8*), y en el mutante *YeO8Δhfq* (Δhfq) crecidos a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test t de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a la misma temperatura.

En el apartado 1.5 de los Resultados de este trabajo, se ha demostrado que el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ regula la expresión de *pagP*. Por consiguiente, nos planteamos si este sistema también regulaba la expresión de la aciltransferasa LpxP. Para ello, se midió la actividad luciferasa de la fusión transcripcional *lpxP::lucFF* en el mutante *YeO8ΔphoPQ* a 21°C y a 37°C. A 21°C la expresión de *lpxP* fue menor en el mutante *YeO8ΔphoPQ* con respecto a su expresión en la cepa silvestre (**Figura 71**). A 37°C no se observaron diferencias significativas entre cepas. Teniendo en cuenta que hemos demostrado que existe una co-regulación entre RovA y PhoP/PhoQ (ver apartado 1.6 Resultados), nos planteamos analizar si RovA jugaba algún papel en la regulación de *lpxP*. Para comprobarlo, se midieron los niveles de expresión de *lpxP::lucFF* en el mutante *YeO8ΔrovA* a 21°C y a 37°C. A 21°C, la expresión de *lpxP* fue inferior en el mutante *YeO8ΔrovA* con respecto a la cepa silvestre (**Figura 71**). Por otro lado a 37°C, no se observaron diferencias significativas entre cepas. (**Figura 71**).

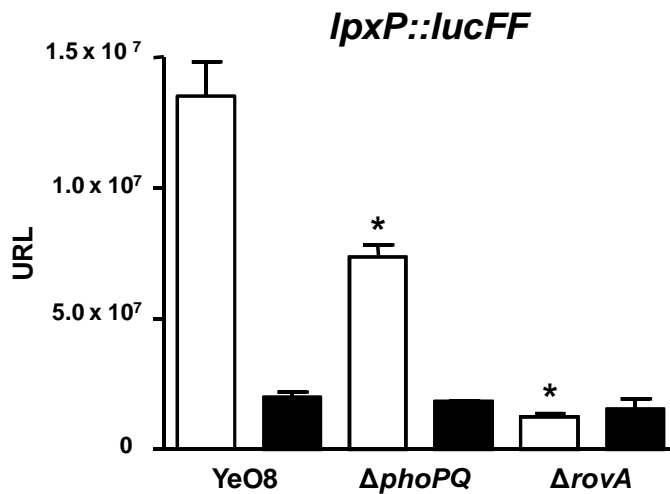


Figura 71. El sistema PhoP/PhoQ y RovA regulan la expresión de *lpxP*. Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *lpxP::lucFF* en la cepa silvestre (YeO8), y en los mutantes *YeO8ΔphoPQ* (*ΔphoPQ*) y *YeO8ΔrovA* (*ΔrovA*) crecidos a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a la misma temperatura.

Considerando que tanto RovA como PhoP/PhoQ regulaban positivamente la expresión de *pagP* y *lpxP*, se midió la expresión de *rovA::lucFF* y *phoP::lucFF* en el mutante *YeO8Δhfq*. La expresión de *rovA* y

phoPQ fue más elevada en el mutante *YeO8Δhfq* que en la cepa silvestre a ambas temperaturas (**Figura 72 A y B**). Señalar que la expresión de *phoPQ* deja de estar regulada por la temperatura en el fondo genético del mutante *YeO8Δhfq*.

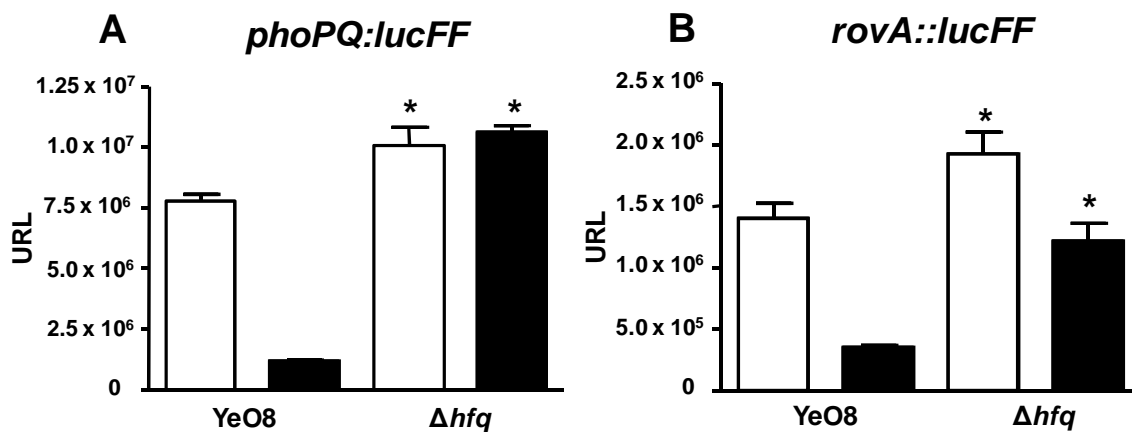


Figura 72. Hfq regula la expresión de *phoPQ* y *rovA*. Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *phoP::lucFF* (A) y *rovA::lucFF* (B) en la cepa silvestre (*YeO8*), y en el mutante *YeO8Δhfq* (Δhfq) crecidos a 21°C (barras blancas) y a 37°C (barras negras). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a la misma temperatura.

Ante estos resultados, se planteó la posibilidad de que la elevada expresión de *rovA* y *phoPQ* en el mutante *YeO8Δhfq* fuera la responsable de que los genes *pagP* y *lpxP*, presentaran unos niveles de expresión elevados en este mismo fondo genético. Para confirmar esta hipótesis se construyeron los dobles mutantes *YeO8ΔrovA-Δhfq* y *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* y se midió la expresión de *pagP::lucFF* y *lpxP::lucFF*.

Como se puede observar en la **Figura 73A**, la expresión de *pagP* a 21°C en el mutante *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* no fue significativamente diferente que aquella obtenida en el mutante simple *YeO8ΔphoPQ*, indicando que la elevada expresión de *pagP* en el fondo genético del mutante *YeO8Δhfq* es debida, al menos en parte, a una elevada expresión de *phoPQ* en este mismo mutante. En el mutante doble *YeO8ΔrovA-Δhfq* la expresión de *pagP* es más elevada que en el mutante simple *YeO8ΔrovA* (**Figura 73A**). Por otra parte, a 37°C (**Figura 73 B**), los niveles de expresión de *pagP* en el doble mutante

YeO8ΔphoPQ-Δhfq son más elevados con respecto al mutante simple *YeO8ΔphoPQ* y con respecto a la cepa silvestre, aunque disminuyen con respecto al mutante *YeO8Δhfq*. En el doble mutante *YeO8ΔrovA-Δhfq* los niveles son inferiores que aquellos obtenidos en la cepa silvestre.

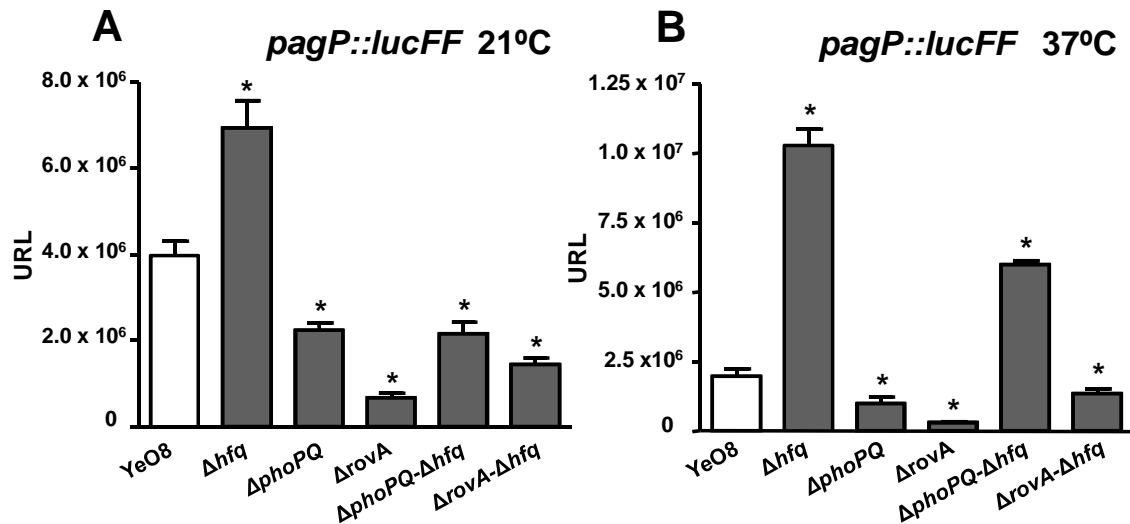


Figura 73. Análisis de la expresión de *pagP* en los mutantes *YeO8Δhfq*, *YeO8ΔphoPQ*, *YeO8ΔrovA*, *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* y *YeO8ΔrovA-Δhfq*. Análisis de la expresión de *pagP* en la cepa silvestre (*YeO8*) y en los mutantes *YeO8Δhfq* (Δhfq), *YeO8ΔphoPQ* ($\Delta phoPQ$), *YeO8ΔrovA* ($\Delta rovA$), *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* ($\Delta phoPQ-\Delta hfq$) y *YeO8ΔrovA-Δhfq* ($\Delta rovA-\Delta hfq$) creciendo las cepas a 21°C (A) y a 37°C (B) Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

Con respecto a la expresión de *lpxP*, a 21°C (Figura 74A) su expresión en el doble mutante *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* fue inferior con respecto a la expresión en el mutante simple *YeO8ΔphoPQ*. En el *YeO8ΔrovA-Δhfq* la expresión de *lpxP* está a niveles del mutante simple *YeO8ΔrovA*.

A 37°C (Figura 74B) la expresión de *lpxP* en los mutantes dobles *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* y *YeO8ΔrovA-Δhfq* fue similar que aquella obtenida en los mutantes simples *YeO8ΔphoPQ* y *YeO8ΔrovA* y no diferente a la obtenida en la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que a 37°C la elevada expresión de *lpxP* es debida a la elevada expresión de *phoPQ* y *rovA*.

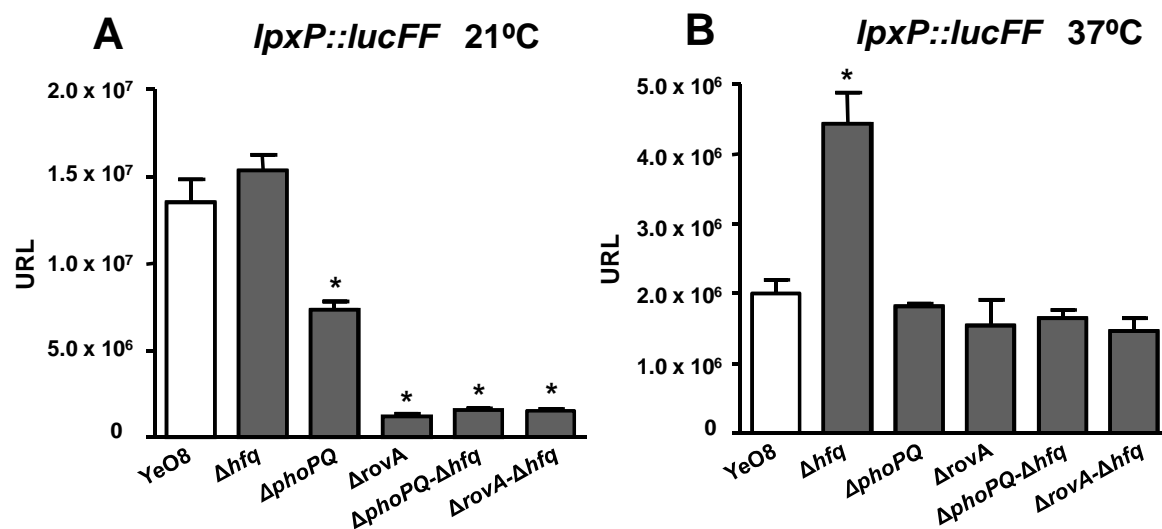
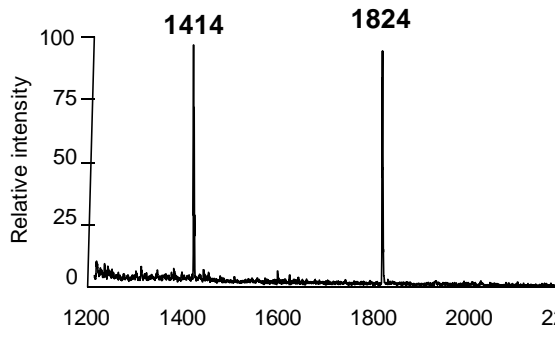


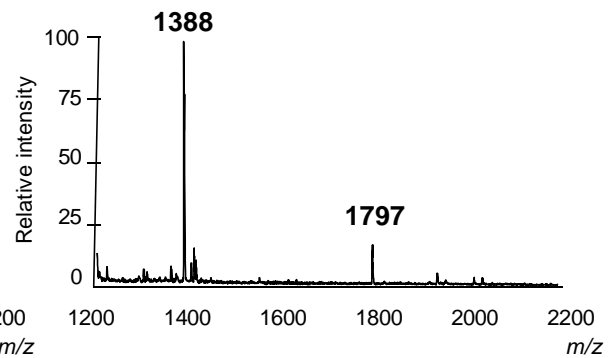
Figura 74. Análisis de la expresión de *lpxP* en los mutantes *YeO8Δhfq*, *YeO8ΔphoPQ*, *YeO8ΔrovA*, *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* y *YeO8ΔrovA-Δhfq* crecidos a 21°C y a 37°C. Análisis de la expresión de *lpxP* en la cepa silvestre (*YeO8*) y en los mutantes *YeO8Δhfq* (Δhfq), *YeO8ΔphoPQ* ($\Delta phoPQ$), *YeO8ΔrovA* ($\Delta rovA$), *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* ($\Delta phoPQ-\Delta hfq$) y *YeO8ΔrovA-Δhfq* ($\Delta rovA-\Delta hfq$) creciendo las cepas a 21°C (**A**) y a 37°C (**B**). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

Por último, se analizó la estructura del lípido A de los dobles mutantes *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* y *YeO8ΔrovA-Δhfq* a 21°C y a 37°C (**Figura 75**). A 21°C en ambos espectros, no aparece el pico correspondiente a la estructura del lípido A heptaacilada (m/z 2063) que aparecía en el espectro del mutante simple *YeO8Δhfq*. A 37°C, en ambos espectros no aparece el pico correspondiente a un lípido A hexaacilado con un C_{16:1} en la posición 2'-3-OH-C14.

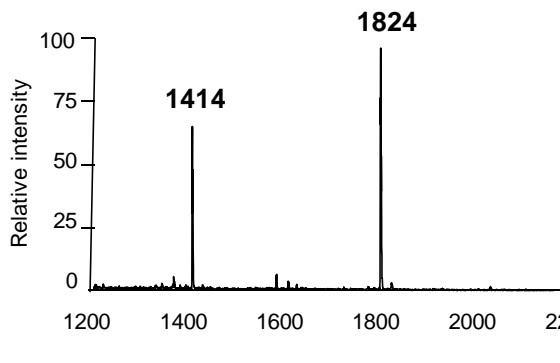
A *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* 21°C



B *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* 37°C



C *YeO8ΔrovA-Δhfq* 21°C



D *YeO8ΔrovA-Δhfq* 37°C

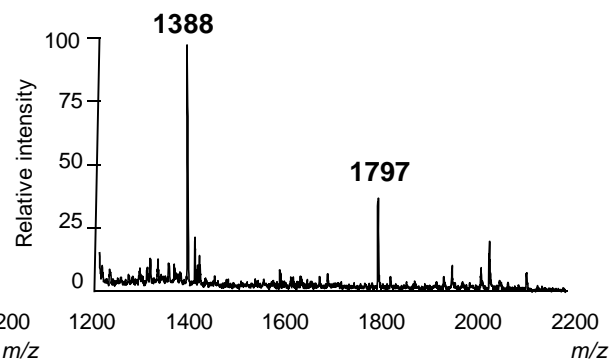


Figura 75. Estructura del lípido A extraído de los mutantes *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* y *YeO8ΔrovA-Δhfq*. Análisis mediante MALDI-TOF de la estructura del lípido A extraído del doble mutante *YeO8ΔphoPQ-Δhfq* crecido a 21°C (**A**) y a 37°C (**B**) y del doble mutante *YeO8ΔrovA-Δhfq* crecido a 21°C (**C**) y a 37°C (**D**). Los resultados en ambos paneles son representativos de tres extracciones independientes.

DISCUSIÓN



1. ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES QUE DETERMINAN LA RESISTENCIA DE *Y. enterocolitica* O:8 FRENTE A LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Las bacterias patógenas tienen que adaptarse a las condiciones que encuentran en el huésped para sobrevivir. Para ello, es esencial la correcta regulación espacio-temporal de la expresión de sus genes en respuesta a las diversas señales que encuentran en el huésped como, por ejemplo, el cambio de temperatura a 37°C. En el caso de las especies del género *Yersinia*, la mayoría, sino todos sus factores de virulencia están regulados por la temperatura^{335,544}, activándose a 21°C (temperatura óptima de crecimiento) ó a 37°C (temperatura del huésped). Trabajos previos de nuestro grupo ya demostraron que la fluidez de la membrana externa, la permeabilidad a compuestos hidrofóbicos y la sensibilidad a los PAs están regulados por la temperatura en yersiniae^{42,43,48}. Así, se demostró que las yersinias patógenas son más susceptibles a la polimixina B cuando se crecían a 37°C que cuando se hacía a 21°C⁴⁴. En la presente Tesis Doctoral hemos extendido esta observación a otros PAs no relacionados estructuralmente. No obstante, hasta el momento no se habían esclarecido las bases moleculares que determinan esta resistencia dependiente de la temperatura.

Dado que todos los PAs interactúan con el LPS^{400,569}, postulamos que cambios estructurales del LPS dependientes de la temperatura podrían explicar las diferencias en cuanto a sensibilidad frente a los PAs. La presencia de cadena O y las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa, palmitato y fosfoetanolamina se han relacionado con la resistencia frente a PAs en *Enterobacteriaceae*^{103,209,214,219,430,447,448,562} así como en otras bacterias^{29,187,381}. De hecho, en estudios previos ya demostramos que en *Y. enterocolitica* la expresión de la cadena O está regulada por la temperatura siendo ésta mayor a 21°C que a 37°C^{9,49}. En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que tanto la expresión de los *loci* necesarios para modificar el lípido A con aminoarabinosa y palmitato como la propia estructura del lípido A están reguladas por la temperatura. El contenido de aminoarabinosa en el lípido A de *Y. pestis* también está regulado por la temperatura, siendo mayor a 21°C que a

37°C^{285,455,456}. Y esto se correlaciona con el hecho de que *Y. pestis* es más sensible frente a los PAs a 37°C que a 21°C^{16,43,45}. Sin embargo, *Y. pseudotuberculosis*, la otra especie patógena del género, no presenta una regulación tan estricta de las modificaciones del lípido A. Varios grupos hemos demostrado que *Y. pseudotuberculosis* presenta especies de lípido A modificadas con aminoarabinosa y palmitato tanto a 21°C como a 37°C³³⁷. Además, la resistencia de *Y. pseudotuberculosis* frente a los PAs parece no estar regulada por la temperatura^{43,45}. Estos datos refuerzan, una vez más, la importancia de ser cautelosos a la hora de extrapolar compartimentos biológicos de una especie a otra teniendo en cuenta únicamente criterios taxonómicos.

Nuestros resultados han demostrado que tanto la cadena O como las modificaciones del lípido A contribuyen a la resistencia de *Y. enterocolitica* frente a los PAs. Además, su contribución en la resistencia no es redundante, porque un doble mutante sin cadena O y sin modificaciones en su lípido A fue más sensible a los PAs que los mutantes simples. Sin embargo, aunque los dobles mutantes fueran los más sensibles a los PAs, todavía mostraron una sensibilidad dependiente de la temperatura. Por lo tanto, estos resultados sugieren que existen otros mecanismos subyacentes de resistencia frente a los PAs regulados por la temperatura, y no necesariamente relacionados con la estructura del LPS.

Los estudios moleculares revelaron que los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB controlan la expresión de los *loci* para modificar el lípido A con aminoarabinosa y palmitato. Sin embargo, esto sólo es cierto a 21°C, porque a 37°C la expresión de estos *loci* fue similar en la cepa silvestre y en los mutantes simples *phoPQ* y *pmrAB*. De hecho, los propios sistemas están regulados por la temperatura. Este tipo de regulación difiere significativamente del modelo encontrado en *Salmonella*. En este patógeno los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB regulan la expresión de las modificaciones del lípido A a 37°C^{215,216,210,218} y no se ha descrito que su expresión esté regulada por la temperatura. Además, nuestros datos muestran que en *Yersinia* PmrA/PmrB también regula *pagP* mientras que en *Salmonella* la expresión de este locus es controlada únicamente por PhoP/PhoQ. En *Salmonella*, y según

las condiciones de crecimiento empleadas en esta Tesis Doctoral, la expresión del operón *pmrH* y el gen *ugd* dependen de PmrA/PmrB en un proceso dependiente de la activación de PhoP/PhoQ el cual, a su vez, transfiere la señal mediante la proteína conectora PmrD^{214,215,217,299}. Señalar que *Y. enterocolitica* no codifica en su genoma *pmrD*³³⁶ y que tanto PhoP/PhoQ como PmrA/PmrB regulan independientemente la expresión del operón *pmrH* y *ugd*. Un análisis bioinformático reveló la presencia de las cajas PhoP y PmrA en las regiones promotoras de los tres *loci* (resultados no mostrados). No es la primera en la que se describe este hecho ya que tanto en *Y. pestis* como en *K. pneumoniae* ambos sistemas PhoPQ y PmrAB también regulan independientemente la expresión de *pmrH* y *ugd*^{817,599}.

Uno de los resultados más llamativos de esta Tesis Doctoral es que RovA regula positivamente los sistemas implicados en la modificación del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8. Como ya se ha explicado en la Introducción, este regulador fue identificado como el activador transcripcional de *invasin*⁴⁵⁸. No obstante, el hecho de que la DL₅₀ de un mutante *rovA* es significativamente superior que las DL₅₀ de la cepa silvestre y el mutante *inv* sugirió que RovA podría regular directa o indirectamente otros genes aparte de *invasin*^{161,458}. De hecho, Cathelyn y colaboradores demostraron que en el mutante *rovA* de *Y. enterocolitica* la expresión de 63 genes está alterada¹¹². Nuestro estudio expande esta lista de genes ya que el operon *pmrH*, los *loci ugd*, *pagP* y los reguladores *phoPQ* y *pmrAB* presentan una menor expresión en el fondo genético del mutante *rovA* de *Y. enterocolitica* O:8. En este momento sólo se puede especular porqué Cathelyn y colaboradores¹¹² no detectaron estos genes en su análisis. Entre otras posibilidades podemos señalar que en sus experimentos la temperatura de crecimiento de las bacterias era diferente con respecto a la nuestra (26°C y 21°C, respectivamente) y nuestros datos indican que existe una correlación inversa entre la temperatura y la expresión de los genes estudiados (resultados no mostrados).

La evidencia disponible muestra que la regulación dependiente de RovA es en realidad un proceso dinámico de regulación en el que participan RovA y H-NS^{170,398}. Así, H-NS, formando un complejo con YmoA, es un represor de la transcripción de los genes activados por RovA^{112,170,171}. Los resultados de esta

Tesis Doctoral refuerzan este modelo dinámico de regulación ya que a 21°C RovA alivia la represión ejercida por H-NS sobre el operón *pmrH*, los genes *ugd* y *pagP* y los sistemas de dos componentes *phoPQ* y *pmrAB*. Más aún, el hecho que la expresión de *rovA* esté regulada por la temperatura, superior a 21°C que a 37°C⁵⁶⁸, explicaría la regulación dependiente de la temperatura de los *loci* necesarios para las modificaciones del lípido A.

En *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* se ha demostrado que la expresión de *rovA* está a su vez regulada por H-NS y RovA. H-NS reprime la expresión de *rovA* y RovA es necesario para su máxima expresión^{170,240,306,559}. A parte de estos reguladores, también se ha descrito que RovM y LeuO regulan la expresión de *rovA*. RovM regula negativamente la transcripción de *rovA*, probablemente interaccionando directamente con la región promotora de *rovA*^{238,239,306}. LeuO se describió como un regulador positivo aunque se desconoce si la regulación es a través de la interacción directa de LeuO y la región promotora de *rovA* o bien si LeuO modula la expresión de otro regulador³⁰⁶. En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que los sistemas PhoPQ y PmrAB también controlan positivamente la expresión de *rovA*, siendo más importante el efecto de PhoPQ. Un análisis detallado de la región promotora de *rovA* reveló la presencia de las cajas *phoP* y *pmrA*, sugiriendo que la regulación de *rovA* por parte de estos reguladores es directa. En cualquier caso, no descartamos que en los fondos genéticos de los mutantes *phoPQ* y *pmrAB* la expresión de otros reguladores de *rovA*, como RovM o LeuO u otros no identificados todavía, pudiera estar alterada. Es evidente que futuros trabajos deberían abordar la posible implicación de RovM y LeuO en el circuito de regulación descrito en esta Tesis. Curiosamente, la expresión de *rovA* en el mutante *phoPQ-pmrAB* alcanzó los niveles de la cepa silvestre, lo que explica porqué en este fondo genético la expresión de los *loci* responsables de las modificaciones del lípido A estuviera aumentada. Próximos trabajos intentarán descifrar el mecanismo molecular subyacente que explique la expresión elevada de *rovA* en el doble mutante *phoPQ-pmrAB*.

RovA pertenece a la familia de reguladores SlyA/MarR, los cuales están estructuralmente conservados y presentan homólogos en varias especies bacterianas¹⁶⁹. En *Salmonella*, SlyA es el homólogo de RovA y participa en la

regulación positiva de *phoPQ* ya que antagoniza la acción inhibitoria de H-NS en la región promotora⁵³⁰. Además, el sistema PhoP/PhoQ también activa la transcripción de *slyA*⁵³⁰. Más aún, en el fondo genético del mutante *slyA*, la expresión de varios genes necesarios para la remodelación del LPS se encuentra disminuida y, además, dicho mutante es más sensible a los PAs que la cepa silvestre de *Salmonella*^{393,530}. Estas similitudes entre SlyA y RovA nos hace especular que, posiblemente, uno de los papeles más importantes de los reguladores de la familia SlyA/Mar sea alterar la superficie celular para proteger a la bacteria frente a compuestos tóxicos, como podrían ser los PAs. Como consecuencia, los mutantes deficientes en estos reguladores estarían atenuados, como así ocurre en el caso de los mutantes *rovA* y *slyA*^{161,393,530}. Se requieren futuros trabajos en otros modelos bacterianos para confirmar nuestra hipótesis y determinar si existen otros reguladores de la familia de SlyA/MarR implicados en la regulación de la expresión de las modificaciones del lípido A.

El hecho de que RovA sea un regulador transcripcional y regule varios genes, incluidos los genes implicados en la resistencia frente a los PAs, hace que sea imposible definir su contribución exacta a la virulencia¹¹². Señalar, que junto con *invasin*^{420,423}, los mutantes que carecen de las modificaciones con aminoarabinosa ($\Delta pmrF$), palmitato ($\Delta pagP$) o ambas ($\Delta pmrF\Delta pagP$) en su lípido A son los únicos genes regulados por RovA en los que se ha demostrado su implicación en la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8. Varias razones pueden explicar la disminución de la carga bacteriana de los mutantes en los diferentes tejidos. Lógicamente, una de ellas es la susceptibilidad de los mutantes frente a los PAs presentes *in vivo*. En cualquier caso, también es que estos mutantes tengan alterados los mecanismos necesarios para hacer frente a los mecanismos de defensa del huésped. Por ejemplo, podría estar alterada la secreción de Yops por parte del sistema tipo III de secreción. Si así fuera, la implicación de las modificaciones del lípido A en la virulencia de *Y. enterocolitica* sería indirecta. Futuros estudios abordarán estas hipótesis.

2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN *pmrC*, RESPONSABLE DE LA ADICIÓN DE FOSFOETANOLAMINA AL LÍPIDO A DE *Y. enterocolitica* O:8

En otras bacterias como *Salmonella*, se ha descrito que el sistema de dos componentes PmrA/PmrB está implicado en la modificación del lípido A con aminoarabinosa y fosfoetanolamina en las posiciones 1 y 4', respectivamente⁶²⁶ y se han identificado los genes encargados de dichas modificaciones^{308,563}. En *Y. enterocolitica* O:8 ya hemos demostrado que el operón *pmrH* y el gen *ugd* codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A. No obstante, no existe ningún estudio que demuestre la presencia de fosfoetanolamina en el lípido A de *Y. enterocolitica*. De hecho, en *Salmonella* el gen responsable de la adición de fosfoetanolamina denominado *pmrC* se encuentra en el operón *pmrCAB* que codifica también por el del sistema de dos componentes PmrA/PmrB²¹⁴. En *Yersinia* se ha descrito que *pmrA* y *pmrB* se co-transcriben junto con *dacB*, un gen que codifica una DD-carboxipeptidasa implicada en la homeostasis del péptidoglicano²⁹⁷ y se ha postulado que este género bacteriano no codifica ningún gen homólogo de *pmrC*^{114,336}. Sin embargo, el análisis mediante espectrometría de masas del lípido A del mutante *pmrF* reveló la existencia de una especie (*m/z* 1948) consistente con la presencia de fosfoetanolamina lo que claramente indicaba la posibilidad de que *Y. enterocolitica* posee un gen homólogo de *pmrC*, como así hemos demostrado en esta Tesis Doctoral.

Como las demás modificaciones del lípido A de *Y. enterocolitica*, la expresión de *pmrC* está regulada por la temperatura, siendo ésta mayor a 21°C que a 37°C. En cualquier caso, señalar que la contribución de la modificación con fosfoetanolamina en la resistencia frente a los PAs sólo fue aparente en el fondo genético del mutante *pmrF* ya que el mutante *pmrC* fue tan susceptible como la cepa silvestre a la polimixina B. El nuestro es el tercer estudio que demuestra rigurosamente la implicación en la resistencia frente a los PAs de la adición de fosfoetanolamina al lípido A ya que, anteriormente, sólo se ha descrito en *A. baumannii*, también por nuestro grupo, y en *Salmonella*^{39,308,626}.

El hecho que el pico correspondiente a un lípido A modificado con fosfoetanolamina solo aparezca en el espectro de un mutante que no presenta aminoarabinosa crecido a 21°C puede ser debido a varias razones no necesariamente excluyentes entre sí. Por un lado, podría ser que la adición de aminoarabinosa y fosfoetanolamina se realizará en la misma posición del lípido A como puede ocurrir en *Salmonella*⁶²⁶ y, por tanto, según sean las condiciones de crecimiento y la disponibilidad de sustratos se expresa una u otra. Análisis bioquímicos recientemente realizados en el laboratorio sugieren que no es así en el caso de *Yersinia* (Llobet, resultados no mostrados). Por consiguiente, estos datos también indican que *Yersinia* preferentemente modifica el lípido A con aminoarabinosa y, sólo en su ausencia, lo modifica con fosfoetanolamina. En *Salmonella* también se acumulan especies de lípido A con fosfoetanolamina en un mutante *pmrF*⁶²⁶. Por otro lado, no es descartable que la presencia de lípidos A modificados con aminoarabinosa alteren la actividad enzimática de PmrC. En cualquier caso, nuestros resultados muestran que la transcripción de *pmrC* aumenta en un mutante que no presenta aminoarabinosa.

Nuestro análisis del circuito regulatorio que controla la expresión de *pmrC* reveló que los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB, implicados en la regulación de las demás modificaciones del lípido A, no juegan ningún papel a 21°C. Sin embargo, a esta temperatura, nuestros datos indican que RovA regula positivamente su expresión. Aunque hayamos demostrado que RovA controla positivamente la expresión de *phoPQ*, nuestros resultados sugieren que RovA, o un locus regulado por RovA, regula *pmrC* de una manera directa sobre su región promotora puesto que se ha encontrado la caja *rovA* en esta región y, más aún, en un mutante *phoPQ* no está afectada la expresión de *pmrC*. A esta misma temperatura, el sistema RcsCDB regula negativamente la expresión de *pmrC*. Al ver su implicación en la regulación de la adición de fosfoetanolamina, quisimos determinar si ejercía algún tipo de regulación sobre los genes encargados de la adición de aminoarabinosa y palmitato. De hecho, tanto en *Salmonella* como en *K. pneumoniae* se ha descrito que RcsCDB controla la expresión de las modificaciones del lípido A dependientes de PhoP/PhoQ^{193,317}. Curiosamente, RcsCDB sólo parece regular, y de forma

positiva, la expresión de *ugd*. Este es un resultado un tanto sorprendente ya que, hasta el momento, tanto el operón *pmrH* con el gen *ugd* ambos responsables de la modificación del lípido A con aminoarabinosa, presentaban una regulación en paralelo. La regulación de *ugd* por parte del sistema RcsCDB también se describió en *Salmonella*³⁸². La participación de múltiples sistemas reguladores en el control de la expresión de *ugd* puede ser un mero reflejo de la participación del producto de la reacción catalizada por Ugd, UDP-glucurónico, en diversos procesos que van desde la síntesis del péptidoglicano hasta el metabolismo de hexosas. Sería interesante profundizar en la funcionalidad del sistema RcsCDB en *Y. enterocolitica* O:8.

Con el fin de explicar porqué la expresión de *pmrC* estaba aumentada en el fondo genético del mutante *pmrF*, nos planteamos que, tal vez, la expresión de algunos de sus reguladores podría estar alterada. Lógicamente, esperábamos que RovA como regulador positivo de *pmrC*, estaría sobreexpresado en el mutante *pmrF*. No obstante, y contrariamente a nuestras especulaciones, los niveles de *rovA* en el mutante *pmrF* fueron inferiores que en la cepa silvestre. Por otra parte, la expresión del sistema RcsCDB, el regulador negativo de *pmrC*, estaba disminuida en el mutante *pmrF* lo que explicaría, al menos en parte, la sobreexpresión de *pmrC*. En cualquier caso, dado que los máximos niveles de expresión de *pmrC* se alcanzaron en los fondos genéticos de los mutantes *pmrF-rovA* y *pmrF-rcsD* no es descabellado plantear que existan reguladores adicionales de *pmrC*.

3. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE ACILACIÓN DEL LÍPIDO A DE *Y. enterocolitica* O:8

Estudios previos de nuestro laboratorio explicaron a nivel molecular todas las especies del lípido A presentes en *Y. enterocolitica* O:8⁴²⁵ excepto salvo la especie tetraacilada (*m/z* 1388). Esta especie aparece únicamente a 37°C y ya fue detectada por otros autores^{24,406,455}. Esta estructura característica es consistente con la existencia de una enzima con actividad deacilasa que elimina el residuo aciloxiacil de la posición 3' del lípido. Esta actividad ha sido descrito en *S. enterica* serovar *typhimurium* y *H. pylori*^{460,538} y, en ambos

patógenos, la enzima correspondiente se denomina LpxR. En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que *Y. enterocolitica* O:8 codifica una enzima homóloga de LpxR de *Salmonella* y *Helicobacter* responsable de la deacilación del lípido A en la posición 3'.

Los análisis mediante espectrometría de masas mostraron que la deacilación era más evidente cuando se crecía la bacteria a 37°C que a 21°C. En consecuencia, nos planteamos que la expresión de *lpxR* estaría regulada por la temperatura siendo ésta más elevada a 37°C que a 21°C. No obstante, y contrariamente a nuestra idea, nuestros resultados mostraron que efectivamente la expresión de *lpxR* está regulada por la temperatura, pero que su expresión fue mayor a 21°C que a 37°C. Más aún, los niveles de LpxR en la membrana también fueron mayores a 21 que a 37°C. Este hecho, presencia de la enzima pero sin actividad, se ha denominado latencia y también ha sido descrito para PagL de *Salmonella* y PagP de *E. coli*^{268,289,524 331}, todas ellas implicadas en la remodelación del lípido A. LpxR de *Salmonella* también presenta latencia aunque no es el caso de LpxR de *Helicobacter* y, por tanto, la latencia de LpxR no es una característica generalizable.

Con el fin de explicar la latencia de LpxR a 21°C nos planteamos varias alternativas. En primer lugar, pudiera ocurrir que la temperatura afectara negativamente a la actividad de la enzima. Sin embargo, el hecho de LpxR sí deacilara el lípido A de *E. coli* MG1655 crecido a 21°C indica que no se puede atribuir a la temperatura la ausencia de especies deaciladas a 21°C en *Y. enterocolitica*. En cualquier caso, son necesarios estudios bioquímicos con la enzima purificada para definir exactamente los parámetros de actividad de la enzima. En segundo lugar, nos planteamos si características específicas del lípido A de *Y. enterocolitica* a 21°C, ausentes en el lípido A de *E. coli*, fueran las responsables de la falta de actividad de la enzima. Una de las principales diferencias entre el lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 y *E. coli* es el tipo de ácido graso secundario unido al lípido IV_A. En *E. coli* las aciltransferasas HtrB (LpxL) y MsbB (LpxM) añaden laureato (C12) y miristato (C14) respectivamente^{130,131}. Sin embargo, en *Y. enterocolitica* O:8 estas enzimas añaden miristato (C14) y laureato (C12) respectivamente⁴²⁵. Sin embargo, estas diferencias no son las responsables de la menor deacilación a 21°C puesto que LpxR deaciló sin

problemas el lípido A de *E. coli*. Otras de las características que diferencian el lípido A de *E. coli* y *Y. enterocolitica* O:8 son la presencia de aminoarabinosa y palmitato (m/z 1955 y 2063, respectivamente) en esta última y sólo cuando se crece a 21°C. En el espectro de un mutante sin palmitato en su lípido A seguía sin aparecer la forma tetraacilada a 21°C. No obstante, en el espectro de un mutante sin aminoarabinosa en su lípido A sí se detectaron las especies deaciladas (m/z 1414) a 21°C. Por lo tanto, todos estos resultados demuestran que la presencia de aminoarabinosa en el lípido A es la responsable de la latencia de LpxR a 21°C. La importancia de la presencia de aminoarabinosa en la latencia de enzimas también se ha descrito para la decilasa PagL de *S. entérica*. PagL deacila la posición 3 del lípido A y se encuentra inhibida por la presencia de aminoarabinosa en la membrana^{289,290}. Recientemente, se han identificado los residuos de la enzima implicados en la interacción con la aminoarabinosa y, por tanto, responsables de su latencia^{331,332}.

Los experimentos de modelaje y de mutagénesis dirigida no sólo confirmaron que la estructura molecular de LpxR de *Y. enterocolitica* es prácticamente idéntica a la estructura de LpxR de *Salmonella*⁴⁷⁶ sino que los aminoácidos claves del sitio activo ya identificados por Rutten y colaboradores⁴⁷⁶ están presentes en la misma posición en nuestra enzima. Pero, además, estos experimentos confirmaron que la modificación del lípido A con aminoarabinosa dificulta la entrada de la molécula del lípido A en el sitio activo, debido a la existencia de un residuo que impide la interacción enzima-sustrato.

Al existir una correlación inversa entre la presencia de aminoarabinosa en el lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 y la deacilación de este mismo por parte de LpxR, era lógico pensar que los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB que regulan positivamente la biosíntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A ejercieran una regulación negativa sobre la expresión de *lpxR*, como así se demostró. No obstante, en ausencia del regulador negativo RovA, el sistema de dos componentes PmrA/PmrB y/o una proteína regulada por PmrA/PmrB parece ejercer una regulación positiva sobre la expresión de *lpxR* a 21°C. Es curioso que en el doble mutante *rovA-phoPQ*, la expresión de *lpxR* deje de estar regulada por la temperatura. El lípido A de este mutante a 21°C no está

modificado con aminoarabinosa (resultados no mostrados) puesto que no están presentes tanto RovA como el sistema PhoP/PhoQ que activan independientemente la expresión del operón *pmrF* y el gen *ugd*.

Fue llamativo encontrar que la motilidad y la invasión de células eucariotas, fenotipos que sólo ocurren a 21°C, estuvieran disminuidos en el mutante *lpxR* crecido a 21°C, condición en que la deacilación prácticamente no se aprecia. Desde el punto de vista molecular, nuestros resultados demuestran que la expresión de *flhDC* y *rovA*, reguladores del regulón del flagelo y de *invasin*, está disminuida en el mutante *lpxR*. En este momento sólo se puede especular sobre las bases moleculares que determinan la regulación negativa de *flhDC* y *rovA* en el mutante *lpxR*. Se podría pensar que cambios en el grado de acilación del lípido A pueden actuar como señal reguladora actuando sobre la vía o vías de transducción. De hecho, nuestro grupo ya demostró que mutantes deficientes en las aciltransferasas HtrB, MsbB y LpxP también presentan cambios en la motilidad y en la invasión⁴²⁵. Sin embargo, en estos mutantes los cambios en la estructura del lípido A son dramáticos, todo lo contrario que ocurre en el mutante *lpxR* crecido a 21°C. Por consiguiente, nos planteamos la hipótesis de trabajo de que es la ausencia de LpxR en la membrana, y no los cambios en la acilación, la responsable de los cambios transcripcionales anteriormente indicados. Esta hipótesis se basa en la idea de que las proteínas integrales de membrana con estructura de barril β actúan como centinelas de la estabilidad de la membrana⁶⁴ siendo, en este caso, la ausencia de la enzima un caso extremo. Dado que todos los factores de virulencia estudiados están relacionados con la membrana, ya que o se expresan en ella (como *invasin* o LPS) o dependen de un sistema asociado a la membrana para su actividad (síntesis del flagelo), es razonable plantear que los sistemas de estrés de membrana sean los responsables de transducir la señal regulatoria definida por la ausencia de LpxR en la membrana. Apoyando indirectamente esta idea, se ha demostrado que el sistema Cpx regula negativamente la expresión de *rovA* e *invasin*^{104,314,314} y se ha descrito que cambios en la acilación del LPS de *E. coli* activan el sistema de estrés de membrana σ^{E546} .

Como se ha resumido en la Introducción (apartado 2.1) la evidencia disponible indica que cambios en el patrón del LPS contribuyen a la evasión del sistema inmune y por lo tanto a la virulencia. No obstante, no se observaron diferencias en cuanto a la susceptibilidad frente a la polimixina B, empleada como modelo de acción de los PAs. Sin embargo, este resultado no es totalmente inesperado ya que los análisis bioquímicos mostraron que las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa y palmitato no están alteradas en el mutante *lpxR*. Existen varios trabajos que demuestran que un lípido menos acilado es menos endotóxico^{267,287,288 196 377}. En el caso de *Y. enterocolitica*, Rebeil y colaboradores⁴⁵⁵ ya demostraron que el LPS purificado de bacterias crecidas a 37°C no estimula la vía de señalización dependiente de TLR4. Por tanto, es razonable plantear que la deacilación dependiente de *LpxR* sea la responsable de esta pobre estimulación. En esta Tesis Doctoral decidimos comprobar este aspecto pero utilizando bacterias vivas en lugar de LPS purificado ya que el reconocimiento del LPS por los macrófagos, y la subsecuente activación de respuestas inflamatorias, puede ser diferente entre el LPS purificado y el LPS presente en el ambiente de la membrana externa, la situación más próxima a *in vivo*. Sin embargo, y para nuestra sorpresa inicial, no se observaron diferencias en cuanto a la secreción de TNF α inducida por el mutante *lpxR* crecido a 37°C, que presenta un lípido A hexaacilado, y la cepa silvestre, que presenta un lípido A tetraacilado. Pero, teniendo en cuenta que los niveles de TNF α inducidos tanto por la cepa silvestre como por el mutante *lpxR* fueron significativamente inferiores cuando la bacteria fue crecida a 37°C, temperatura a la que se expresan los factores anti-inflamatorios del plásmido de virulencia^{139,574}, que a 21°C nos planteamos si alguna de las Yops estaría contrarrestando la respuesta inflamatoria inducida por el LPS del mutante *lpxR*. De hecho, nuestros resultados mostraron que tanto la producción como la función de los factores de virulencia codificados en el plásmido pYV (YadA y Yops) no estaban afectadas en el mutante *YeO8 Δ lpxR*. De entre todas las Yops, nos centramos en YopP ya que se ha descrito su papel central en el bloqueo de la respuesta inflamatoria de la célula huésped^{74,156,413,487}. Confirmando nuestra hipótesis, el doble mutante *lpxR-yopP* indujo la mayor secreción de TNF α que el mutante simple *yopP*. La importancia en la respuesta inflamatoria del grado de acilación del lípido A se ve reflejada en el hecho de

que el mutante *lpxR* sin plásmido de virulencia crecido a 37°C indujo una mayor respuesta inflamatoria que la cepa silvestre sin plásmido de virulencia crecida a la misma temperatura.

En conjunto, estos resultados reflejan que aunque prevalezca la acción anti-inflamatoria de YopP, no es indiferente el tipo de lípido A que presente la bacteria, puesto que el nivel de acilación del lípido A influye en las propiedades inmunoestimuladoras de *Y. enterocolitica* O:8. Más aún, estos resultados enfatizan la importancia de la deacilación del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 por parte de LpxR a 37°C, porque le permite sintetizar un lípido A menos inmunoestimulador y pasar desapercibida frente al sistema inmune del huésped.

4. PAPEL DE *hfq* EN LA REGULACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL LÍPIDO A

Una vez caracterizadas todas las estructuras del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 y haber determinado las bases moleculares de su regulación, nos planteamos estudiar el posible efecto de Hfq como regulador post-transcripcional sobre la estructura del lípido A. De hecho, existen varios estudios en los que se ha descrito un nexo de unión entre la regulación de la estructura de LPS y la chaperona Hfq. En *Salmonella* varios de los genes requeridos para la completa síntesis del núcleo, la cadena O y el lípido A presentaron una elevada expresión en el mutante *hfq*²⁰. También se observaron alteraciones similares en el perfil del LPS de *E.coli* uropatógena³⁰⁰. Recientemente se ha identificado un sncRNA que requiere a la chaperona Hfq para ejercer su papel regulador y que regula negativamente al gen *eptB*, necesario para la adición de fosfoetanolamina al núcleo del LPS de *E.coli*³⁷⁸. Sin embargo, esta Tesis Doctoral es el primer trabajo que indaga en el efecto de Hfq en la estructura química del lípido A. Una vez identificado el gen y tras construir el mutante, el análisis bioquímico del lípido A reveló dos características muy llamativas: la mayor heptaacilación a 21°C y la presencia a 37°C de un lípido A hexaacilado (*m/z* 1822) consistente con la adición de un C_{16:1} en lugar de un C₁₄ en la posición 2'-3-OH-C14. En un trabajo previo

demostramos que la acuiltransferasa responsable de la adición de este ácido graso es LpxP⁴²⁵. Significativamente, LpxP se considera una aciltransferasa que sólo actúa a temperaturas inferiores a 30°C⁴⁴⁷. La ausencia de la especie con *m/z* 1822 en el doble mutante *hfq-lpxP* confirmó la actividad de LpxP a 37°C.

Como hemos demostrado en esta Tesis Doctoral, *pagP* es el gen que codifica la aciltransferasa responsable de la adición de un séptimo ácido graso al lípido A de *Y. enterocolitica* O:8. Su expresión está aumentada en el fondo genético del mutante *hfq* y esto es debido a la elevada expresión de sus dos reguladores positivos RovA y PhoP/PhoQ. La elevada expresión de estos dos reguladores también explica la sobreexpresión de *lpxP* en el mutante *hfq* a 37°C. Confirmando estos resultados genéticos, en los espectros del lípido A de los dobles mutantes *rovA-hfq* y *phoPQ-hfq* desaparecen las especies correspondientes a la heptaacilación del lípido A y, a 37°C, desaparece el pico correspondiente a la actividad enzimática de LpxP. No obstante, al expresarse más el sistema PhoP/PhoQ a 37°C no observamos más heptaacilación a esta temperatura, lo cual sería lógico ya que el sistema PhoP/PhoQ regula positivamente la expresión de más *pagP*. En el momento presente no tenemos una explicación plausible y sólo planteamos que exista algún regulador negativo de *pagP*, y quizás también de los otros *loci* necesarios para las otras modificaciones del lípido A, que actúa a 37°C y que todavía desconocemos.

5. CONSIDERACIONES FINALES Y DIRECCIONES FUTURAS

Las especies patógenas para el hombre de la familia yersiniae representan un grupo ideal para estudiar cómo se adaptan las bacterias a los diferentes ambientes y evolucionan para ser altamente virulentas. *Y. enterocolitica* O:8 es un claro modelo de adaptación a dos ambientes muy diferentes: el medio exterior y el medio del huésped. Para conseguirlo, depende de una estricta regulación de sus factores de virulencia antes y durante la infección, al igual que una expresión coordinada de los mismos y una integración con las señales de su entorno. La detección de una gran variedad de estímulos ambientales le permite determinar si se encuentra fuera o dentro

del huésped y regular la expresión de los genes implicados en la virulencia para utilizar sus recursos eficientemente y prevenir o combatir la respuesta inmune. La temperatura es una de las señales ambientales más importantes que regula la mayoría, sino todos los factores de virulencia de *Y. enterocolitica* O:8.

Como se ha demostrado en esta Tesis Doctoral, las modificaciones del lípido A están reguladas por la temperatura y su expresión depende de un circuito regulatorio complejo en el que RovA es una pieza central y en el que la chaperona Hfq influye a nivel post-transcripcional. Otro de los aspectos más interesantes de esta Tesis, ha sido la identificación por primera vez en *Y. enterocolitica* O:8 de la proteína de membrana interna PmrC, encargada de la adición de fosfoetanolamina al lípido A y la proteína de membrana externa LpxR encargada de la deacilación del lípido A. Ambas enzimas, basándonos en nuestros resultados, son un paradigma emergente de regulación de enzimas de membrana.

Los resultados de esta Tesis Doctoral junto con los de otros autores^{16,455,456} muestran claramente que las tres especies patógenas del género *Yersinia* presentan a 21°C un lípido A hexaacilado modificado con aminoarabinosa y palmitato mientras que a 37°C expresan un lípido A poco acilado. Esto nos suscita dos interrogantes que serán objeto de investigación por nuestro grupo. Por un lado, desconocemos cuál es la estructura del lípido A de las bacterias *in vivo*. Estos experimentos no han sido realizados para ninguna bacteria y, sin duda, representan un reto tecnológico pues se trataría de determinar mediante espectrometría de masas la estructura del lípido A de las bacterias presentes en los tejidos sin subcultivarlas. Por otra parte, sería interesante determinar la estructura del lípido A de todas las especies incluidas dentro del género *Yersinia*. Señalar que este estudio comparativo entre especies patógenas y no patógenas nos permitirá determinar si, al menos dentro de este género, existe una firma molecular del LPS asociada con la virulencia. Nuestros resultados preliminares indican que este puede ser el caso ya que los lípidos A no están deacilados a 37°C lo que concuerda con que en los genomas de estas especies no se encuentra el gen que codifica para *lpxR*. Más aún, tampoco aparece el gen que codifica para *rovA* lo que sugiere que la

regulación de *ugd*, *pagP* y del operon *pmrH*, si presentes en los genomas, no sea igual que en el caso de las especies patógenas.

Otra línea de trabajo futura se centrará en profundizar en el efecto biológico de la latencia de LpxR en la membrana de la bacteria a 21°C. La mayor acilación del lípido A a bajas temperaturas puede proteger a la bacteria frente a las condiciones existentes en el ambiente externo, las cuales pueden afectar a la integridad de la membrana. Bengoechea y colaboradores⁴³ demostraron que la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias patógenas de *Yersinia* es mayor a 37°C que a 21°C. Otros estudios de nuestro grupo⁴²⁵ demostraron que una mayor susceptibilidad de los mutantes para las acilttransferasas *msbB*, *lpxP* y *htrB* a los agentes hidrofóbicos: el cristal violeta y la novobiocina. Por tanto, la latencia de LpxR puede responder a la necesidad de mantener una membrana robusta, con reducida permeabilidad y de una baja fluidez a 21°C. En un futuro próximo analizaremos la permeabilidad de la membrana a agentes hidrofóbicos así como la susceptibilidad a agentes hidrofóbicos del mutante *lpxR*, de la cepa en la cual la enzima no se encuentra latente y de los diversos mutantes en las modificaciones del lípido A.

Por último, vamos a explorar las posibles aplicaciones biotecnológicas de LpxR. Resultados preliminares del laboratorio demuestran que es una enzima relativamente promiscua y que es capaz de deacilar los lípidos A de varios patógenos Gram negativos, siempre y cuando no presenten aminoarabinosa. Por consiguiente, LpxR puede facilitar la construcción de cepas con el grado de acilación alterado. Existen numerosos trabajos que demuestran que este tipo de mutantes están atenuados^{447,448} y, por tanto, puede servir como base para la construcción de cepas vivas atenuadas que sirvan como vacunas.

CONCLUSIONES



1. *Y. enterocolitica* O:8 es más sensible frente a los péptidos antimicrobianos cuando se crece a 37°C que cuando se hace a 21°C.
2. En *Y. enterocolitica* O:8, el operón *pmrHFIJKLM* y el gen *ugd* codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A, mientras que el gen *pagP* codifica la aciltransferasa necesaria para la adición de palmitato al lípido A. Dichas modificaciones confieren resistencia a la bacteria frente a los péptidos antimicrobianos.
3. La cadena O del LPS también desempeña un papel en la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos junto con las modificaciones del lípido A anteriormente descritas.
4. La temperatura modula la expresión de los genes necesarios para las modificaciones del lípido A y regula la expresión de la cadena O, siendo su expresión mayor a 21°C que a 37°C.
5. Las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa y palmitato tienen un papel en la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8.
6. Los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB regulan positivamente la biosíntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 a 21°C, así como también la adición de palmitato.
7. Los sistemas de regulación PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB y RcsCDB están regulados por la temperatura, siendo su expresión mayor a 21°C que a 37°C.
8. RovA controla positivamente la expresión de los *loci* encargados de las modificaciones del lípido A incluyendo sus sistemas reguladores PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB. Por el contrario, H-NS ejerce una regulación negativa sobre todos ellos.

9. A 21°C, RovA alivia la represión ejercida por H-NS sobre la expresión del operón *pmrHFIJKLM*, el gen *ugd*, el gen *pagP* y los sistemas *phoPQ* y *pmrAB*.
10. En *Y. enterocolitica* O:8 el gen *pmrC* es el encargado de la adición de fosfoetanolamina al lípido A. Dicha modificación juega un papel en la resistencia frente a polimixina B.
11. La presencia de aminoarabinosa en el lípido A actúa negativamente sobre la transcripción del gen *pmrC*. Dicha transcripción está regulada por la temperatura, siendo mayor a 21°C que a 37°C.
12. La expresión de *pmrC* está regulada negativamente por el sistema RcsCDB tanto a 21 como a 37°C. RovA controla de forma positiva la expresión de *pmrC* únicamente a 21°C mientras que el sistema PhoP/PhoQ lo hace a 37°C.
13. En *Y. enterocolitica* O:8 la enzima LpxR es la encargada de eliminar el residuo aciloxiacil de la posición 3' del lípido A.
14. La expresión de LpxR está regulada por la temperatura, siendo mayor a 21°C que a 37°C. A 21°C, la presencia de aminoarabinosa en el lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 impide la deacilación del lípido A dependiente de LpxR.
15. La expresión de *lpxR* se encuentra negativamente regulada por PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB y RovA, los mismos reguladores que activan los genes necesarios para modificar el lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 con aminoarabinosa.
16. El grado de acilación del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 afecta a algunos factores de virulencia de este patógeno. Así, en el mutante *lpxR* la expresión del regulón del flagelo está disminuida, lo que se traduce en

una menor motilidad y una reducción en la expresión de *ypIA*. Además, en este mutante la expresión de *inv* está disminuida debido muy probablemente a que la expresión de su activador transcripcional RovA se encuentra también disminuida. No obstante, tanto la producción como la función de los factores de virulencia codificados en el plásmido pYV (YadA y Yops) no están afectadas en el mutante *YeO8ΔlpxR*.

17. La deacilación del lípido A de *Y. enterocolitica* O:8 por parte de la enzima LpxR, no juega ningún papel frente a la resistencia a los péptidos antimicrobianos, primera barrera defensiva del sistema inmune innato. Sin embargo, la deacilación del lípido A por parte de LpxR disminuye las propiedades inmunoestimuladoras del LPS de *Y. enterocolitica* O:8.
18. En *Y. enterocolitica* O:8, Hfq regula la expresión de las modificaciones del lípido A. Así, un mutante *hfq* presenta más heptaacilación en su lípido A a 21°C. A 37°C, en este mismo fondo genético, se expresa la aciltransferasa LpxP y el lípido A contiene C_{16:1}. Anteriormente, LpxP estaba descrita como enzima que sólo se expresa a bajas temperaturas.

REFERENCIAS



1. Abeyrathne,P.D. & Lam,J.S. Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. *Can J Microbiol* **53**, 526-532 (2007).
2. Achtman,M. *et al.* *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc natl acad sci* **96**, 14043-14048 (1999).
3. Adams,H., Teertstra,W., Demmers,J., Boesten,R. & Tommassen,J. Interactions between Phage-Shock Proteins in *Escherichia coli*. *J of Bacteriol* **185**, 1174-1180 (2003).
4. Aepfelbacher,M. *et al.* Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33217-33223 (2003).
5. Aguirre,A. *et al.* PhoP-Induced Genes within *Salmonella* Pathogenicity Island. *Journal of Bacteriology* **188**, 6889-6898 (2006).
6. Aili,M. *et al.* Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *International Journal of Medical Microbiology* **298**, 183-192 (2008).
7. Akira,S. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv. Immunol.* **78**, 1-56 (2001).
8. Akira,S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 5-11 (2003).
9. Al-Hendy,A., Toivanen,P. & Skurnik,M. The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolitica* O:3 lipopolysaccharide: temperature regulates the transcription of the *rfb* but not of the *rfa* region. *Microb Pathog* **10**, 81-86 (1991).
10. Al-Hendy,A., Toivanen,P. & Skurnik,M. Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O:3 is an essential virulence factor in an orally infected murine model. *Infect Immun* **60**, 870-875 (1992).
11. Aldridge,P. & Hughes,K.T. Regulation of flagellar assembly 159. *Curr Opin Microbiol* **5**, 160-165 (2002).
12. Allaoui,A., Woestyn,S., Sluiter,C. & Cornelis,G.R. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* **176**, 4534-4542 (1994).
13. Alonso,A. *et al.* Lck Dephosphorylation at Tyr-394 and Inhibition of T Cell Antigen Receptor Signaling by *Yersinia* Phosphatase YopH 136. *J Biol Chem* **279**, 4922-4928 (2004).
14. Andersson,K., Magnusson,K.E., Majeed,M., Stendahl,O. *Yersinia pseudotuberculosis*-Induced Calcium Signaling in Neutrophils Is Blocked by the Virulence Effector YopH 123. *Infect Immun* **67**, 2567-2574 (1999).
15. Anisimov R, Brem D, Heesemann,J. & Rakin,A. Transcriptional regulation of high pathogenicity island iron uptake genes by YbtA. *Int J Med Microbiol* **295**, 19-28 (2005).
16. Anisimov,A.P. *et al.* Intraspecies and temperature-dependent variations in susceptibility of *Yersinia pestis* to the bactericidal action of serum and to polymyxin B. *Infect. Immun.* **73**, 7324-7331 (2005).
17. Anisimov,A.P. *et al.* Effect of deletion of the *lpxM* gene on virulence and vaccine potential of *Yersinia pestis* in mice. *J Med Microbiol* **56**, 443-453 (2007).
18. Anjum,R. & Blenis,J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 747-758 (2008).
19. Anonymous. Rejection of the name *Yersinia pseudotuberculosis* subsp *pestis* (van Loghem) Bercovier *et al.* 1981 and conservation of the name *Yersinia pestis* (Lehmann and Neumann) van Loghem 1944 for the plague bacillus. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 540 (1985).

-
20. Ansong,C. *et al.* Global Systems-Level Analysis of Hfq and SmpB Deletion Mutants in *Salmonella*: Implications for Virulence and Global Protein Translation. *PLoS ONE* **4**, e4809 (2009).
 21. Appleyard,R.K. Segregation of new lysogenic types during growth of doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**, 440-452 (1954).
 22. Arroyo L, Herrera C, Fernandez L & Hancock R. The *pmrAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of the lipid A. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3743-3751 (2011).
 23. Augustin,D.K. *et al.* Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**, 2203-2209 (2007).
 24. Aussel,L. *et al.* Novel variation of lipid A structures in strains of different *Yersinia* species. *FEBS Letters* **465**, 87-92 (2000).
 25. Axler-DiPerte,G.L., Hinchliffe,S.J., Wren,B.W. & Darwin,A.J. YtxR Acts as an Overriding Transcriptional Off Switch for the *Yersinia enterocolitica* Ysc-Yop Type 3 Secretion System 10. *J Bacteriol* **191**, 514-524 (2009).
 26. Axler-DiPerte,G.L., Miller,V.L. & Darwin,A.J. YtxR, a Conserved LysR-Like Regulator That Induces Expression of Genes Encoding a Putative ADP-Ribosyltransferase Toxin Homologue in *Yersinia enterocolitica* 09. *J Bacteriol* **188**, 8033-8043 (2006).
 27. Bajaj,V., Lucas,R.L., Hwang,C. & Lee,C.A. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**, 703-714 (1996).
 28. Balligand,G., Laroche,Y. & Cornelis,G. Genetic analysis of a virulence plasmid from a serogroup *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* **48**, 782-786 (1985).
 29. Banemann,A., Deppisch,H. & Gross,R. The Lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* Acts as a Protective Shield against Antimicrobial Peptides 47. *Infect Immun* **66**, 5607-5612 (1998).
 30. Barton,G.M. & Medzhitov,R. Linking Toll-like receptors to IFN-alpha/beta expression. *Nat. Immunol.* **4**, 432-433 (2003).
 31. Barton,G.M. & Medzhitov,R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**, 1524-1525 (2003).
 32. Bartra,S.S. *et al.* The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice 04. *Microbial Pathogenesis* **52**, 41-46 (2012).
 33. Bartra,S.S. *et al.* Resistance of *Yersinia pestis* to Complement-Dependent Killing Is Mediated by the Ail Outer Membrane Protein. *Infect Immun* **76**, 612-622 (2008).
 34. Basu,S.S., Karbarz,M.J. & Raetz,C.R. Expression cloning and characterization of the C28 acyltransferase of lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Biol. Chem.* **277**, 28959-28971 (2002).
 35. Basu,S.S., White,K.A., Que,N.L. & Raetz,C.R. A deacylase in *Rhizobium leguminosarum* membranes that cleaves the 3-O-linked beta-hydroxymyristoyl moiety of lipid A precursors 32. *J. Biol. Chem.* **274**, 11150-11158 (1999).
 36. Batch S, de Almeida A & Carniel,E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEBS Microbiol Letters* **183**, 289-294 (2000).
 37. Batzilla,J., Höper,D., Antonenka,U., Heesemann,J. & Rakin,A. Complete Genome Sequence of *Yersinia enterocolitica* subsp. *palaearctica* Serogroup O:3. *J Bacteriol* **193**, 2067 (2011).

38. Bearden, S.W., Fetherston, J.D. & Perry, R.D. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **65**, 1659-1668 (1997).
39. Beceiro A, Llobet E., Aranda J. & Woodford N. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3370-3379 (2011).
40. Belden, W.J. & Miller, S.I. Further characterization of the PhoP regulon: Identification of new PhoP-activated virulence loci. *Infect Immun* **62**, 5095-5101 (1994).
41. Belunis, C.J., Clementz, T., Carty, S.M. & Raetz, C.R.H. Inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis and cell growth following inactivation of the kdtA gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 27646-27652 (1995).
42. Bengoechea, J.A. et al. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains increase the outer membrane permeability in response to environmental stimuli by modulating lipopolysaccharide fluidity and lipid A structure. *Infect. Immun.* **71**, 2014-2021 (2003).
43. Bengoechea, J.A., Brandenburg, K., Seydel, U., Díaz, R. & Moriyón, I. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* show increased outer membrane permeability to hydrophobic agents which correlates with lipopolysaccharide acyl-chain fluidity. *Microbiology* **144**, 1517-1526 (1998).
44. Bengoechea, J.A., Díaz, R. & Moriyón, I. Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* biogroups probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides. *Infect Immun* **64**, 4891-4899 (1996).
45. Bengoechea, J.A., Lindner, B., Seydel, U., Díaz, R. & Moriyón, I. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* are more resistant to bactericidal cationic peptides than *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* **144**, 1509-1515 (1998).
46. Bengoechea, J.A., Najdenski, H. & Skurnik, M. Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Mol. Microbiol.* **52**, 451-469 (2004).
47. Bengoechea, J.A. et al. Functional characterization of Gne (UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase), Wzz (chain length determinant), and Wzy (O-antigen polymerase) of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *J Bacteriol* **184**, 4277-4287 (2002).
48. Bengoechea, J.A. & Skurnik, M. Temperature-regulated efflux pump / potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular Microbiology* **37**, 67-80 (2000).
49. Bengoechea, J.A., Zhang, L., Toivanen, P. & Skurnik, M. Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* includes cell envelope-dependent signals. *Mol Microbiol* **44**, 1045-1062 (2002).
50. Bercovier, H. et al. Characterization of *Yersinia enterocolitica sensu stricto*. *Curr Microbiol* **4**, 201-206 (1980).
51. Bercovier, H. et al. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr Microbiol* **4**, 225-229 (1980).
52. Bercovier, H. et al. *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystems. *Int J of Syst Bacteriol* **34**, 166-172 (1984).
53. Bercovier, H. et al. *Yersinia kristensenii*: A new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr Microbiol* **4**, 219-224 (1980).
54. Bergler, H., Abraham, D., Aschauer, H. & Turnowsky, F. Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the pspA gene. *Microbiology* **140**, 1937-1944 (1994).

-
55. Berring,E. *et al.* Destabilization of phospholipid model membranes by YplA, a phospholipase A2 secreted by *Yersinia enterocolitica*. *Chemistry and Physics of Lipids* **131**, 135-149 (2004).
 56. Beuken,E., Vink,C. & Bruggeman,C.A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques* **24**, 748-50 (1998).
 57. Bhat,U.R., Mayer,H., Yokota,A., Hollingsworth,R.I. & Carlson,R.W. Occurrence of lipid A variants with 27-hydroxyoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **173**, 2155-2159 (1991).
 58. Biedzka-Sarek,M., Jarva,H., Hyytiainen,H., Meri,S. & Skurnik,M. Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.* **76**, 4100-4109 (2008).
 59. Biedzka-Sarek,M. *et al.* Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.* **76**, 5016-5027 (2008).
 60. Biedzka-Sarek,M., Venho,R. & Skurnik,M. Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect. Immun.* **73**, 2232-2244 (2005).
 61. Birtalan,S.C., Phillips,R.M. & Ghosh,P. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* **9**, 971-80 (2002).
 62. Bishop,R.E. *et al.* Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J.* **19**, 5071-5080 (2000).
 63. Bishop,R.E. *et al.* Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO Journal* **19**, 5071-5080 (2000).
 64. Bishop,R.E. Structural biology of membrane-intrinsic β barrel enzymes: Sentinels of the bacterial outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 1881-1896 (2008).
 65. Bisset,M.L., Powers,C., Abbot,S.L. & Janda,J.M. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: Sources, Frequency, and serogroup distribution. *J Clin Microbiol* **28**, 910-912 (1990).
 66. Black,D.S. & Bliska,J.B. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Molecular Microbiology* **37**, 515-527 (2000).
 67. Black,D.S., Marie-Cardine,A., Schraven,B. & Bliska,J.B. The *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cell Microbiol* **2**, 401-414 (2000).
 68. Blattner FR, Plunket G, Bloch CA & Perna NT. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462 (1997).
 69. Blaylock,B., Berube,B.J. & Schneewind,O. YopR impacts type III needle polymerization in *Yersinia* species. *MolMicrobiol* **75**, 221-229 (2010).
 70. Blaylock,B., Riordan,K.E., Missiakas,D.M. & Schneewind,O. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion ATPase YscN and Its Regulator, YscL. *J of Bacteriol* **188**, 3525-3534 (2006).
 71. Bleves,S. & Cornelis,G.R. How to survive in the host:the *Yersinia* lesson. *Microbes Infect* **2**, 1451-1460 (2000).
 72. Bleves,S., Marenne,M.N., Detry,G. & Cornelis,G.R. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* yop regulon by deletion of the flagellum master operon flhDC. *J. Bacteriol.* **184**, 3214-3223 (2002).
 73. Bliska,J.B. & Falkow,S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3561-3565 (1992).
 74. Boland,A. & Cornelis,G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* **66**, 1878-1884 (1998).

75. Bölin, I., Norlander, L. & Wolf-Watz, H. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**, 506-512 (1982).
76. Boon, H.M. *et al.* A *Leptospira interrogans* enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. *J. Biol. Chem.* **280**, 30214-30224 (2005).
77. Bottone, E.J. *Yersinia enterocolitica*: A panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Critical rev Microbiol* **5**, 211-241 (1977).
78. Boyd, A.P., Lambermont, I. & Cornelis, G.R. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**, 4811-4821 (2000).
79. Brandenburg, K. *et al.* Structural Polymorphism and Endotoxic Activity of Synthetic Phospholipid-like Amphiphiles. *Biochemistry* **43**, 4039-4046 (2004).
80. Brandenburg, K. *et al.* Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur J Biochem* **218**, 555-563 (1993).
81. Breazeale, S.D., Ribeiro, A.A., McClerren, A.L. & Raetz, C.R. A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *J. Biol. Chem.* **280**, 14154-14167 (2005).
82. Breazeale, S.D., Ribeiro, A.A. & Raetz, C.R. Oxidative decarboxylation of UDP-glucuronic acid in extracts of polymyxin-resistant *Escherichia coli*. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose. *J. Biol. Chem.* **277**, 2886-2896 (2002).
83. Brem, D., Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C.A. & Heesemann, J. Functional analysis of yersiniabactin transport genes of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* **147**, 1115-2117 (2001).
84. Brenner, D.J. *et al.* *Yersinia intermedia*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive, elibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr Microbiol* **4**, 207-212 (1980).
85. Brinkman V., Reichard U, Goosmann C, Fauler B. & Uhlemann Y. Neutrophil extracellular traps kills bacteria. *Science* **303**, 1532-1535 (2004).
86. Brissette, J.L., Russel, M., Weiner, L. & Model, P. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc natl Acad Sci* **87**, 862-866 (1990).
87. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238-250 (2005).
88. Broz, P. *et al.* Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol. Microbiol.* **65**, 1311-1320 (2007).
89. Brozek, K.A., Bulawa, C.E. & Raetz, C.R. Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A membrane-bound enzyme that transfers a palmitoyl residue from a glycerophospholipid to lipid X. *J. Biol. Chem.* **262**, 5170-5179 (1987).
90. Brozek, K.A., Hosaka, K., Robertson, A.D. & Raetz, C.R. Biosynthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid to lipid A 05. *J. Biol. Chem.* **264**, 6956-6966 (1989).
91. Brozek, K.A. & Raetz, C.R. Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acyl carrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate 95. *J. Biol. Chem.* **265**, 15410-15417 (1990).
92. Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiry, A. & Carniel, E. The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol Microbiol* **30**, 965-978 (1998).

-
93. Buchrieser, C. *et al.* The 102-kilobase *pgm* locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Infect Immun* **67**, 4851-4861 (1999).
 94. Burghout, P. *et al.* Role of the Pilot Protein YscW in the Biogenesis of the YscC Secretin in *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology* **186**, 5366-5375 (2004).
 95. Burghout, P. *et al.* Structure and Electrophysiological Properties of the YscC Secretin from the Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**, 4645-4654 (2004).
 96. Butler, T. *Yersinia* infections: centennial of the discovery of the plague bacillus. *Clin Infect Dis* **19**, 655-661 (1994).
 97. Butt, H.L., Gordon, D.L., Leearcher, T., Moritz, A. & Merrell, W.H. Relationship Between Clinical and Milk Isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Pathology* **23**, 153-157 (1991).
 98. Byrappa, S., Gavin, D.K. & Gupta, K.C. A highly efficient procedure for site-specific mutagenesis of full-length plasmids using *Vent* DNA polymerase. *Genome Research* **5**, 404-407 (1995).
 99. Bystrova, O.V. *et al.* Structural studies on the core and the O-polysaccharide repeating unit of *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 1 lipopolysaccharide. *Eur. J Biochem.* **269**, 2194-2203 (2002).
 100. Campos, M.A. *et al.* Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72**, 7107-7114 (2004).
 101. Cao, Z., Henzel, W.J. & Gao, X. IRAK: A Kinase Associated with the Interleukin-1 Receptor. *Science* **271**, 1128-1131 (1996).
 102. Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. & Goeddel, D.V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-446 (1996).
 103. Capodici, C., Chen, S., Sidorczyk, Z., Elsbach, P. & Weiss, J. Effect of Lipopolysaccharide (LPS) Chain Length on Interactions of Bactericidal/Permeability-Increasing Protein and Its Bioactive 23-Kilodalton NH₂-Terminal Fragment with Isolated LPS and Intact *Proteus Mirabilis* and *Escherichia Coli*. *Infect Immun* **62**, 259-265 (1994).
 104. Carlsson, K.E., Liu, J., Edqvist, P.J. & Francis, M.S. Influence of the Cpx extracytoplasmic-stress-responsive pathway on *Yersinia* sp.-eukaryotic cell contact. *Infect. Immun.* **75**, 4386-4399 (2007).
 105. Carniel, E., Guilvout, I. & Prentice, M. Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1b *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**, 6743-6751 (1996).
 106. Carniel, E., Guiyoule, A., Guilvout, I. & Mercereaupujalon, O. Molecular Cloning, Iron-Regulation and Mutagenesis of the *irp2* Gene Encoding HMWP2, a Protein Specific for the Highly Pathogenic *Yersinia*. *Molecular Microbiology* **6**, 379-388 (1992).
 107. Caroff, M., Bundle, D.R. & Perry, M.B. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9. *European Journal of Biochemistry* **139**, 195-200 (1984).
 108. Carter, P.B. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect Immun* **11**, 164-170 (1975).
 109. Carty, S.M., Sreekumar, K.R. & Raetz, C.R. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 9677-9685 (1999).
 110. Casutt-Meyer, S. *et al.* Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword . *PLoS. ONE.* **5**, e15159 (2010).
 111. Cathelyn, J.S., Crosby, S.D., Lathem, W.W., Goldman, W.E. & Miller, V.L. RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 13514-13519 (2006).

112. Cathelyn,J.S., Ellison,D.W., Hinchliffe,S.J., Wren,B.W. & Miller,V.L. The RovA regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many RovA-regulated genes were acquired more recently than the core genome. *Mol. Microbiol.* **66**, 189-205 (2007).
113. Chadsey,M.S., Karlinsey,J.E. & Hughes,K.T. The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* RNA polymerase holoenzyme. *Genes & Development* **12**, 3123-3136 (1998).
114. Chain,P.S.G. *et al.* Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc natl Acad Sci* **101**, 13826-13831 (2004).
115. Chao,Y. & Vogel,J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin in Microbiol* **13**, 24-33 (2010).
116. Chart,H., Cheasty,T. & Rowe,B. Differentiation of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* by SDS-PAGE analysis of lipopolysaccharide. *Lett Appl Microbiol* **20**, 369-370 (1995).
117. Chen,Y.Y. *et al.* The outer membrane protein LptO is essential for the O-deacylation of LPS and the co-ordinated secretion and attachment of A-LPS and CTD proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Microbiol* **79**, 1380-1401 (2011).
118. Cheng,L.W., Kay,O. & Schneewind,O. Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **183**, 5293-5301 (2001).
119. Cherepanov,P.P. & Wackernagel,W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14 (1995).
120. Chilcott,G.S. & Hughes,K.T. Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 694-708 (2000).
121. China,B., Nguyen,B.T., Debruyere,M. & Cornelis,G.R. Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **62**, 1275-1281 (1994).
122. China,B., Sory,M.P., Nguyen,B.T., Debruyere,M. & Cornelis,G.R. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* **61**, 3129-3136 (1993).
123. Choi,K.H. *et al.* A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* **2**, 443-448 (2005).
124. Choi,K.H. & Schweizer,H.P. mini-Tn7 insertion in bacteria with secondary, non-glmS-linked attTn7 sites: example *Proteus mirabilis* HI4320. *Nat. Protoc.* **1**, 170-178 (2006).
125. Chow,J.C., Young,D.W., Golenbock,D.T., Christ,W.J. & Gusovsky,F. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. *J Biol Chem***274**, 10689-10692 (1999).
126. Christiansen,J.K., Larsen,M.H., Ingmer,H.,L. & Kallipolitis,B.H. The RNA-Binding Protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: Role in Stress Tolerance and Virulence. *J Bacteriol* **186**, 3355-3362 (2004).
127. Cirillo,D.M. *et al.* Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect Immun* **64**, 2019-2023 (1996).
128. Clark,M.A., Hirst,B.H. & Jepson,M.A. M-cell surface beta 1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**, 1237-1243 (1998).

-
129. Clark,M.A., Hirst,B.H. & Jepson,M.A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* **66**, 1237-1243 (1998).
130. Clementz,T., Bednarski,J.J. & Raetz,C.R. Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A: HtrB catalyzed incorporation of laurate. *J. Biol. Chem.* **271**, 12095-12102 (1996).
131. Clementz,T., Zhou,Z.M. & Raetz,C.R.H. Function of the *Escherichia coli msbB* gene, a multicopy suppressor of *htrB* knockouts, in the acylation of lipid A - Acylation by MsbB follows laurate incorporation by HtrB. *J Biol Chem* **272**, 10353-10360 (1997).
132. Coats,S.R. *et al.* Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. *Cell Microbiol.* **11**, 1587-1599 (2009).
133. Coats,S.R., To,T.T., Jain,S., Braham,P.H. & Darveau,R.P. *Porphyromonas gingivalis* resistance to polymyxin B is determined by the lipid A 4'-phosphatase, PGN_0524 . *Int. J. Oral Sci.* **1**, 126-135 (2009).
134. Cornelis,G.R. The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* **291**, 455-462 (2002).
135. Cornelis,G.R. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* **158**, 401-408 (2002).
136. Cornelis,G.R. *et al.* The *Yersinia* yop regulon. *Mol. Microbiol.* **3**, 1455-1459 (1989).
137. Cornelis,G.R. *et al.* The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1315-52 (1998).
138. Cornelis,G.R. *et al.* *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol Microbiol* **5**, 1023-1034 (1991).
139. Cornelis,G.R. & Wolf-Watz,H. The *Yersinia* yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**, 861-867 (1997).
140. Cover,T.L. & Aber,R.C. *Yersinia enterocolitica*. *New England Journal of Medicine* **321**, 16-24 (1989).
141. Cox,A.D. *et al.* Phosphorylation of the Lipid A Region of Meningococcal Lipopolysaccharide: Identification of a Family of Transferases That Add Phosphoethanolamine to Lipopolysaccharide 58. *J Bacteriol* **185**, 3270-3277 (2003).
142. Cullen,T.W. & Trent,M.S. A link between the assembly of flagella and lipooligosaccharide of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 5160-5165 (2010).
143. Cullen,T.W. *et al.* *Helicobacter pylori* versus the Host: Remodeling of the Bacterial Outer Membrane Is Required for Survival in the Gastric Mucosa. *PLoS Pathog* **7**, e1002454 (2011).
144. Dalla-Venezia,N., Minka,S., Bruneteau,M., Mayer,H. & Michel,G. Lipopolysaccharides from *Yersinia pestis*. Studies on lipid A of lipopolysaccharides I and II. *Eur J Biochem* **151**, 399-404 (1985).
145. Darveau,R.P. Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr Opin Microbiol* **1**, 36-42 (1998).
146. Darwin,A.J. & Miller,V.L. Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **32**, 51-62 (1999).
147. Darwin,A.J. & Miller,V.L. The *psp* locus of *Yersinia enterocolitica* is required for virulence and for growth in vitro when the Ysc type III secretion system is produced. *Mol Microbiol* **39**, 429-444 (2001).
148. Darwin,A.J. The phage-shock-protein response 94. *Mol Microbiol* **57**, 621-628 (2005).

149. Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc natl acad sci* **97**, 6640-6645 (2000).
150. De Koning-Ward, T.F. & Robins-Browne, M. A novel mechanism of ureas regulation in *Yersinia enterocolitica*. *FEMS microbiol lett* **147**, 221-226 (1997).
151. Deiwick, J. & Hensel, M. Regulation of virulence genes by environmental signals in *Salmonella typhimurium*. *Electrophoresis* **20**, 813-817 (1999).
152. DeKoning-Ward, T.F. & Robins-Browne, R.M. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **63**, 3790-5 (1995).
153. DeKoning-Ward, T.F., Ward, A.C., Hartland, E.L. & Robins-Browne, M. Yersiniosis: Present and Future. Ravagnan, G. & Chiesa, C. (eds.), pp. 262-263 (Karger, Postfach/CH-4009 Basel/Switzerland, 1995).
154. Delor, I. & Cornelis, G.R. Role of *Yersinia-Enterocolitica* Yst Toxin in Experimental Infection of Young Rabbits. *Infect Immun* **60**, 4269-4277 (1992).
155. Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G. & Cornelis, G.R. Nucleotide sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic Yersiniae. *Infect Immun* **58**, 2983-2988 (1990).
156. Denecker, G. et al. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J. Biol. Chem.* **276**, 19706-19714 (2001).
157. Dennis, J.J. & Zylstra, G.J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2710-2715 (1998).
158. Diepold, A. et al. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J.* **29**, 1928-1940 (2010).
159. Ditta, G. et al. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**, 149-153 (1985).
160. Dorman, C.J. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 391-400 (2004).
161. Dube, P.H., Handley, S.A., Revell, P.A. & Miller, V.L. The rovA Mutant of *Yersinia enterocolitica* Displays Differential Degrees of Virulence Depending on the Route of Infection. *Infect Immun* **71**, 3512-3520 (2003).
162. Dukuzumuremyi, J.M. et al. The *Yersinia* protein kinase A is a host-factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J of Biol Chem* (2000).
163. Dworkin, J., Jovanovic, G. & Model, P. The PspA Protein of *Escherichia coli* Is a Negative Regulator of σ^{54} -Dependent Transcription. *J Bacteriol* **182**, 311-319 (2000).
164. Egger, L.A. & Inouye, M. Purification and Characterization of the Periplasmic Domain of EnvZ Osmosensor in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 68-72 (1997).
165. El Hamidi, A., Tirsoaga, A., Novikov, A., Hussein, A. & Caroff, M. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Research* **46**, 1773-1778 (2005).
166. El Tahir, Y., Kuusela, P. & Skurnik, M. Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG--S motifs on the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. *Mol Microbiol* **37**, 192-206 (2000).
167. El Tahir, Y. & Skurnik, M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Inter J Med Microbiol* **291**, 209-218 (2001).

-
168. Elderkin,S., Bordes,P., Jones,S., Rappas,M. & Buck,M. Molecular Determinants for PspA-Mediated Repression of the AAA Transcriptional Activator PspF. *J Bacteriol* **187**, 3238-3248 (2005).
169. Ellison,D.W., Lawrenz,M.B. & Miller,V.L. Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA. *Trends Microbiol.* **12**, 296-300 (2004).
170. Ellison,D.W. & Miller,V.L. H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J. Bacteriol.* **188**, 5101-5112 (2006).
171. Ellison,D.W., Young,B., Nelson,K. & Miller,V.L. YmoA negatively regulates expression of invasin from *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **185**, 7153-7159 (2003).
172. Emödy,L. *et al.* Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol* **171**, 6674-6679 (1989).
173. Ernst,R.K. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J. Bacteriol.* **188**, 191-201 (2006).
174. Ernst,R.K. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J. Bacteriol.* **188**, 191-201 (2006).
175. Ernst,R.K. *et al.* Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**, 1561-1565 (1999).
176. Fantappie,L. *et al.* The RNA Chaperone Hfq Is Involved in Stress Response and Virulence in *Neisseria meningitidis* and Is a Pleiotropic Regulator of Protein Expression 25. *Infect Immun* **77**, 1842-1853 (2009).
177. Fass,E. & Groisman,E.A. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 199-204 (2009).
178. Fauconnier,A. *et al.* Flagellar *flhA*, *flhB* and *flhE* genes, organized in an operon, cluster upstream from the *inv* locus in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* **143 (Pt 11)**, 3461-3471 (1997).
179. Ferber,D.M. & Brubaker,R.R. Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **31**, 839-841 (1981).
180. Fernández,C. *et al.* Solution NMR studies of the integral membrane proteins OmpX and OmpA from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **504**, 173-178 (2001).
181. Ferracci,F., Schubot,F.D., Waugh,D.S. & Plano,G.V. Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Molecular Microbiology* **57**, 970-987 (2005).
182. Fetherston,J.D., Bearden,S.W. & Perry,R.D. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Molr Microbiol* **22**, 315-325 (1996).
183. Fetherston,J.D., Bertolino,V.J. & Perry,R.D. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* **32**, 289-299 (1999).
184. Flügel,A. *et al.* Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem* **269**, 29732-29738 (1994).
185. Foutier,B., Troisfontaines,P., Müller,S., Opperdoes,F.R. & Cornelis,G.R. Characterization of the *ysa* Pathogenicity Locus in the Chromosome of *Yersinia enterocolitica* and Phylogeny Analysis of Type III Secretion Systems. *J Molr Evol* **55**, 37-51 (2002).
186. Foutier,B. *et al.* Identification of Substrates and Chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B *Ysa* Type III Secretion System. *Infect Immun* **71**, 242-253 (2003).

187. Freer,E. *et al.* The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect. Immun.* **67**, 6181-6186 (1999).
188. Firdich,E. & Whitfield,C. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J. Endotoxin. Res.* **11**, 133-144 (2005).
189. Funahara,Y. & Nikaido,H. Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **141**, 1463-1465 (1980).
190. Galloway,S.M. & Raetz,C.R. A mutant of *Escherichia coli* defective in the first step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 6394-6402 (1990).
191. Galván,E.M., Chen,H. & Schifferli,D.M. The Psa Fimbriae of *Yersinia pestis* Interact with Phosphatidylcholine on Alveolar Epithelial Cells and Pulmonary Surfactant. *Infect Immun* **75**, 1272-1279 (2007).
192. Ganz,T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **55**, 568-571 (1987).
193. García-Calderón,C.B., Casadesús,J. & Ramos-Morales,F. Rcs and PhoPQ Regulatory Overlap in the Control of *Salmonella enterica* Virulence. *J Bacteriol* **189**, 6635-6644 (2007).
194. Geng,J. *et al.* Involvement of the Post-Transcriptional Regulator Hfq in *Yersinia pestis* Virulence 30. *PLoS ONE* **4**, e6213 (2009).
195. Genin,S. & Boucher,C.A. A Superfamily of Proteins Involved in Different Secretion Pathways in Gram-Negative Bacteria - Modular Structure and Specificity of the N-Terminal Domain. *Mol & Gen Genet* **243**, 112-118 (1994).
196. Geurtsen,J. *et al.* Expression of the Lipopolysaccharide-Modifying Enzymes PagP and PagL Modulates the Endotoxic Activity of *Bordetella pertussis* 3651. *Infect Immun* **74**, 5574-5585 (2006).
197. Geurtsen,J., Steeghs,L., Hove,J.t., van der Ley,P. & Tommassen,J. Dissemination of Lipid A Deacylases (PagL) among Gram-negative Bacteria 3650. *J Biol Chem* **280**, 8248-8259 (2005).
198. Ghanei,H., Abeyrathne,P.D. & Lam,J.S. Biochemical Characterization of MsbA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **282**, 26939-26947 (2007).
199. Gibbons,H.S., Kalb,S.R., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. Role of Mg²⁺ and pH in the modification of Salmonella lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells 1. *Mol. Microbiol.* **55**, 425-440 (2005).
200. Gibbons,H.S., Lin,S., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A. Function of LpxO, A new Fe²⁺/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **275**, 32940-32949 (2000).
201. Gibbons,H.S., Reynolds,C.M., Guan,Z. & Raetz,C.R. An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of Salmonella lipid A 4. *Biochemistry* **47**, 2814-2825 (2008).
202. Gong,S., Bearden,S.W., Geoffroy,V.A., Fetherston,J.D. & Perry,R.D. Characterization of the *Yersinia pestis* Yfu ABC inorganic iron transport system. *Infect Immun* **69**, 2829-2837 (2001).
203. Gort,A.S. & Miller,V.L. Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infect Immun* **68**, 6633-6642 (2000).
204. Green,R.C. & Darwin,A.J. PspG, a New Member of the *Yersinia enterocolitica* Phage Shock Protein Regulon. *J Bacteriol* **186**, 4910-4920 (2004).

-
205. Greenwood M & Hooper WL. Excretion of *Yersinia* spp. associated with consumption of pasteurized milk. *Epidemiol. Infect.* **104**, 345-350 (1990).
 206. Greenwood M, Hooper WL & Rodhouse JC. The source of *Yersinia* spp. in pasteurized milk: an investigation at a dairy. *Epidemiol. Infect.* **104**, 351-360 (1990).
 207. Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M. & Toivanen, P. Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Experimental studies with rats. *Infect Immun* **63**, 3222-3226 (1995).
 208. Gripenberg-Lerche, C., Zhang, L., Ahtonen, P., Toivanen, P. & Skurnik, M. Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. *Infect Immun* **68**, 942-947 (2000).
 209. Groisman, E.A. How bacteria resist killing by host-defence peptides. *Trends in Microbiology* **2**, 444-449 (1994).
 210. Groisman, E.A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ 4. *J. Bacteriol.* **183**, 1835-1842 (2001).
 211. Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M.P. & Cornelis, G.R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect. Immun.* **70**, 4165-4176 (2002).
 212. Grützkau, A., Hanski, C., Hahn, H. & Riecken, E.O. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**, 1011-1015 (1990).
 213. Guina, T., Yi, E.C., Wang, H., Hackett, M. & Miller, S.I. A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **182**, 4077-4086 (2000).
 214. Gunn, J.S. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* **16**, 284-290 (2008).
 215. Gunn, J.S. *et al.* PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**, 1171-1182 (1998).
 216. Gunn, J.S. & Miller, S.I. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol.* **178**, 6857-6864 (1996).
 217. Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K. & Miller, S.I. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Infect Immun* **68**, 6139-6146 (2000).
 218. Guo, L. *et al.* Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science* **276**, 250-253 (1997).
 219. Guo, L. *et al.* Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**, 189-98 (1998).
 220. Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M.J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121-4130 (1995).
 221. Haag, H. *et al.* Purification of Yersiniabactin - A Siderophore and Possible Virulence Factor of *Yersinia enterocolitica*. *J GenMicrobiol* **139**, 2159-2165 (1993).
 222. Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Schreiber, A., Zhang, W.j. & Grinstein, S. Rho is Required for the Initiation of Calcium Signaling and Phagocytosis by Fc γ Receptors in Macrophages. *J. Exp. Med.* **186**, 955-966 (1997).

223. Hakansson, S. *et al.* The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO Journal* **15**, 5812-5823 (1996).
224. Haller, J.C., Carlson, S., Pederson, K.J. & Pierson, D.E. A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol Microbiol* **36**, 1436-1446 (2000).
225. Hamburger, Z.A., Brown, M.S., Isberg, R.R. & Bjorkman, P.J. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**, 291-295 (1999).
226. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580 (1983).
227. Hancock, R.E.W. & Chapple, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chem* **43**, 1317-1323 (1999).
228. Hancock, R.E.W. & Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotech* **24**, 1551-1557 (2006).
229. Hardie KR, Lory S & Pugsley AP. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J* **15**, 978-988 (1996).
230. Heesemann, J., Algermissen, B. & Laufs, R. Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **46**, 105-110 (1984).
231. Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N. & Laufs, R. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* **54**, 561-567 (1986).
232. Heesemann, J. *et al.* Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65000 da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol* **8**, 397-408 (1993).
233. Helander, I.M. *et al.* Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem* **237**, 272-278 (1996).
234. Helander, I.M., Kilpeläinen, I. & Vaara, M. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR Study. *Mol Microbiol* **11**, 481-487 (1994).
235. Hentschke, M. *et al.* *Yersinia* Virulence Factor YopM Induces Sustained RSK Activation by Interfering with Dephosphorylation 41. *PLoS ONE* **5**, e13165 (2010).
236. Herbst, K. *et al.* Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog.* **5**, e1000435 (2009).
237. Heroven, A.K., Bohme, K., Rohde, M. & Dersch, P. A Csr-type regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of *Yersinia pseudotuberculosis* through RovM. *Mol. Microbiol.* **68**, 1179-1195 (2008).
238. Heroven, A.K., Bohme, K., Tran-Winkler, H. & Dersch, P. Regulatory elements implicated in the environmental control of invasin expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **603**, 156-166 (2007).
239. Heroven, A.K. & Dersch, P. RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **62**, 1469-1483 (2006).
240. Heroven, A.K., Nagel, G., Tran, H.J., Parr, S. & Dersch, P. RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **53**, 871-888 (2004).
241. Herrera, C.M., Hankins, J.V. & Trent, M.S. Activation of PmrA inhibits LpxT-dependent phosphorylation of lipid A promoting resistance to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* (2010).

-
242. Heusipp,G., Schimdt MA & Miller VL. Identification of rpoE and nadB as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Letters* **226**, 291-298 (2003).
243. Hoang,T.T., Karkhoff-Schweizer,R.R., Kutchma,A.J. & Schweizer,H.P. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77-86 (1998).
244. Hoiczky,E. & Blobel,G. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 4669-4674 (2001).
245. Hoiczky,E., Roggenkamp,A., Reichenbecher,M., Lupas,A. & Heesemann,J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**, 5989-5999 (2000).
246. Holmstrom,A. *et al.* LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **39**, 620-632 (2001).
247. Holst,O. The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides-an update . *FEMS Microbiology Letters* **271**, 3-11 (2007).
248. Horne,S. & Prüss B. Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Arch Microbiol* **185**, 115-126 (2006).
249. Hoshino,K. *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749-3752 (1999).
250. Huang,X.Z. & Lindler,L.E. The pH 6 Antigen Is an Antiphagocytic Factor Produced by *Yersinia pestis* Independent of *Yersinia* Outer Proteins and Capsule Antigen. *Infect Immun* **72**, 7212-7219 (2004).
251. Huang,Y.H., Ferrières,L. & Clarke,D.J. Comparative functional analysis of the RcsC sensor kinase from different *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Letters* **293**, 248-254 (2009).
252. Hueck,C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Molr Biol Rev* **62**, 379-433 (1998).
253. Hughes,K.T., Gillen,K.L., Semon,M.J. & Karlinsey,J.E. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**, 1277-1280 (1993).
254. Hui CY *et al.* *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiol Immunol* **54**, 452-459 (2010).
255. Ingram,B.O., Masoudi,A. & Raetz,C.R. *Escherichia coli* mutants that synthesize dephosphorylated lipid A molecules. *Biochemistry* **49**, 8325-8337 (2010).
256. Ingram,B.O., Sohlenkamp,C., Geiger,O. & Raetz,C.R. Altered lipid A structures and polymyxin hypersensitivity of *Rhizobium etli* mutants lacking the LpxE and LpxF phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 593-604 (2010).
257. Inoue,T. *et al.* Effect of *Yersinia enterocolitica* ST on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. *Microbiol Immunol* **27**, 159-166 (1983).
258. Iriarte,M. & Cornelis,G.R. MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **177**, 738-744 (1995).
259. Iriarte,M. & Cornelis,G.R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol***29**, 915-929 (1998).
260. Iriarte,M., Stainier,I., Mikulskis,A.V. & Cornelis,G.R. The fliA gene encoding sigma(28) in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **177**, 2299-2304 (1995).

261. Isberg,R. & Falkow,S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* **317**, 262-264 (1985).
262. Isberg,R.R. Determinants for the thermoinducible cell binding and plasmid-encoded cellular penetration detected in the absence of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *Infect Immun* **57**, 1998-2005 (1989).
263. Isberg,R.R. & Leong,J.M. Multiple b1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**, 861-871 (1990).
264. Isberg,R.R., Voorhis,D.L. & Falkow,S. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**, 769-778 (1987).
265. Iwobi,A. *et al.* Novel Virulence-Associated Type II Secretion System Unique to High-Pathogenicity *Yersinia enterocolitica* 82. *Infect Immun* **71**, 1872-1879 (2003).
266. Izquierdo,L., Merino,S., Regue,M., Rodriguez,F. & Tomas,J.M. Synthesis of a Klebsiella pneumoniae O-antigen heteropolysaccharide (O12) requires an ABC 2 transporter. *J. Bacteriol.* **185**, 1634-1641 (2003).
267. Janusch,H. *et al.* Structural and biological characterization of highly purified hepta-acyl lipid A present in the lipopolysaccharide of the *Salmonella enterica* sv. *Minnesota* Re deep rough mutant strain R595. *J. Endotoxin. Res.* **8**, 343-356 (2002).
268. Jia,W. *et al.* Lipid Trafficking Controls Endotoxin Acylation in Outer Membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**, 44966-44975 (2004).
269. Johansen C, Gill T & Gram L. Antimicrobial effect of protamine assayed by impedimetry. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 297-303 (1995).
270. Johansson,J., Dagberg,B., Richet,E. & Uhlin,B.E. H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 6117-6125 (1998).
271. Jones CJ & Aizawa S. The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv. Microb. Physiol.* **32**, 109-172 (1991).
272. Jones,S.E., Lloyd,L.J., Tan,K.K. & Buck,M. Secretion Defects That Activate the Phage Shock Response of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**, 6707-6711 (2003).
273. Journet,L., Agrain,C., Broz,P. & Cornelis,G.R. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler 5. *Science* **302**, 1757-1760 (2003).
274. Jovanovic,G., Weiner,L. & Model,P. Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Bacteriol* **178**, 1936-1945 (1996).
275. Juris,S.J., Rudolph,A.E., Huddler,D., Orth,K. & Dixon,J.E. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 9431-9436 (2000).
276. Kaniga,K., Delor,I. & Cornelis,G.R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria - Inactivation of the *blaA* Gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**, 137-141 (1991).
277. Kanipes,M.I., Lin,S., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. Ca²⁺-induced phosphoethanolamine transfer to the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid moiety of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. A novel membrane enzyme dependent upon phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem.* **276**, 1156-1163 (2001).
278. Kanistanon,D. *et al.* Role of Francisella Lipid A Phosphate Modification in Virulence and Long-Term Protective Immune Responses 5. *Infect Immun* **80**, 943-951 (2012).

-
279. Kapatral,V. *et al.* Gene array analysis of *Yersinia enterocolitica* FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate. *Microbiology* **150**, 2289-2300 (2004).
280. Kapatral,V. & Minnich,S.A. Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. *Mol Microbiol* **17**, 49-56 (1995).
281. Kapatral,V., Olson,J.W., Pepe,J.C., Miller,V.L. & Minnich,S.A. Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* class III flagellar genes. *Mol Microbiol* **19**, 1061-1071 (1996).
282. Kapperud,G., Namork,E. & Skarpeid,H.-J. Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **47**, 561-566 (1985).
283. Kapperud,G., Namork,E., Skurnik,M. & Nesbakken,T. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: Relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun* **55**, 2247-2254 (1987).
284. Karbarz,M.J., Kalb,S.R., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhizobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **278**, 39269-39279 (2003).
285. Kawahara,K., Tsukano,H., Watanabe,H., Lindner,B. & Matsuura,M. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect. Immun.* **70**, 4092-4098 (2002).
286. Kawai,T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* **167**, 5887-5894 (2001).
287. Kawasaki,K., Ernst,R.K. & Miller,S.I. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **279**, 20044-20048 (2004).
288. Kawasaki,K., Ernst,R.K. & Miller,S.I. Deacylation and palmitoylation of lipid A by *Salmonella* outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin. Res.* **10**, 439-444 (2004).
289. Kawasaki,K., Ernst,R.K. & Miller,S.I. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.* **187**, 2448-2457 (2005).
290. Kawasaki,K., Ernst,R.K. & Miller,S.I. Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Endotoxin. Res.* **11**, 57-61 (2005).
291. Kawasaki,K., China,K. & Nishijima,M. Release of the Lipopolysaccharide Deacylase PagL from Latency Compensates for a Lack of Lipopolysaccharide Aminoarabinose Modification-Dependent Resistance to the Antimicrobial Peptide Polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **189**, 4911-4919 (2007).
292. Kim,T.J., Young,B.M. & Young,G.M. Effect of Flagellar Mutations on *Yersinia enterocolitica* Biofilm Formation 56. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5466-5474 (2008).
293. Kirjavainen,V. *et al.* *Yersinia enterocolitica* Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein 52. *PLoS Pathog* **4**, e1000140 (2008).
294. Kita,H. & Nikaido,H. Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **113**, 672-679 (1973).
295. Kleerebezem M, Clielaard W & Tommasen,J. Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *EMBO J* **15**, 162-171 (1996).

296. Koo, J.T., Alleyne, T.M., Schiano, C.A., Jafari, N. & Lathem, W.W. Global discovery of small RNAs in *Yersinia pseudotuberculosis* identifies *Yersinia*-specific small, noncoding RNAs required for virulence. *Proc Natl Acad Sci* **108**, E709-E717 (2011).
297. Korat, B., Mottl, H. & Keck, W. Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the *dacB* gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Mol Microbiol* **5**, 675-684 (1991).
298. Koster, M. *et al.* The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex 13. *Mol Microbiol* **26**, 789-797 (1997).
299. Kox, L.F., Wösten, M.M. & Groisman, E.A. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO Journal* **19**, 1861-1872 (2000).
300. Kulesus, R.R., Diaz-Perez, K., Slechta, E.S., Eto, D.S. & Mulvey, M.A. Impact of the RNA Chaperone Hfq on the Fitness and Virulence Potential of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**, 3019-3026 (2008).
301. Kupferwasser, L.I. *et al.* Plasmid-mediated resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in staphylococci: role of the *qacA* locus. *Antimicrob Agents Chem* **43**, 2395-2399 (1999).
302. Kutsukake, K., Ohya, Y. & Iino, T. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**, 741-747 (1990).
303. Laird, W.J. & Cavanaugh, D.C. Correlation of autoagglutination and virulence in *Yersinia*. *J Clin Microbiol* **11**, 430-432 (1980).
304. Lambert de Rouvroit, C., Sluiter, C. & Cornelis, G.R. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **6**, 395-409 (1992).
305. Larrea, M.D. *et al.* RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility 42. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 9268-9273 (2009).
306. Lawrenz, M.B. & Miller, V.L. Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic *Yersinia*. *J. Bacteriol.* **189**, 5963-5975 (2007).
307. Lebbar, S., Karibian, D., Deprun, C. & Caroff, M. Distribution of lipid A species between long and short chain lipopolysaccharides isolated from *Salmonella*, *Yersinia*, and *Escherichia* as seen by Cf-252 plasma desorption mass spectrometry. *J Biol Chem* **269**, 31881-31884 (1994).
308. Lee, H., Hsu, F.F., Turk, J. & Groisman, E.A. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **186**, 4124-4133 (2004).
309. Lee, W.H., Smith, R.E., Damare, J.M., Harris, M.E. & Johnston, R.W. Evaluation of virulence test procedures for *Yersinia enterocolitica* recovered from foods. *J Appl Bacteriol* **50**, 529-539 (1981).
310. Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R. & Eisenhauer, P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Meth* **137**, 167-173 (1991).
311. Leong, J.M., Fournier, R.S. & Isberg, R.R. Mapping and Topographic Localization of Epitopes of the *Yersinia pseudotuberculosis* Invasin Protein. *Infect Immun* **59**, 3424-3433 (1991).
312. Leung, K.Y., Reisner, B.S. & Straley, S.C. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* **58**, 3262-3271 (1990).
313. Lindner, B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of lipopolysaccharides. *Methods Mol. Biol.* **145**, 311-325 (2000).
314. Liu, J., Obi, I.R., Thanikkal, E.J., Kieselbach, T. & Francis, M.S. Phosphorylated CpxR Restricts Production of the RovA Global Regulator in *Yersinia pseudotuberculosis*. *PLoS ONE* **6**, e23314 (2011).

-
315. Liu,X. & Matsumura,P. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons 61. *J Bacteriol* **176**, 7345-7351 (1994).
316. Liu,X. & Matsumura,P. An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene* **164**, 81-84 (1995).
317. Llobet,E., Campos,M.A., Gimenez,P., Moranta,D. & Bengoechea,J.A. Analysis of the networks controlling the antimicrobial peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence Factors. *Infect. Immun.* **79**, 3718-3732 (2011).
318. Llobet,E., March,C., Gimenez,P. & Bengoechea,J.A. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 298-302 (2009).
319. Llobet,E., Tomas,J.M. & Bengoechea,J.A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* **154**, 3877-3886 (2008).
320. Lloyd,L.J. *et al.* Identification of a New Member of the Phage Shock Protein Response in *Escherichia coli*, the Phage Shock Protein G (PspG) 07. *J. Biol Chem* **279**, 55707-55714 (2004).
321. Lugtenberg,B. & Van Alphen,L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **737**, 51-115 (1983).
322. Lukaszewski,R.A. *et al.* Pathogenesis of *Yersinia pestis* Infection in BALB/c Mice: Effects on Host Macrophages and Neutrophils 03. *Infect Immun* **73**, 7142-7150 (2005).
323. Lyskowski,A., Leo,J.C. & Goldman,A. Linke,D. & Goldman,A. (eds.), pp. 143-158 (Springer Netherlands,2011).
324. MacArthur,I., Jones,J.W., Goodlett,D.R., Ernst,R.K. & Preston,A. Role of pagL and lpxO in *Bordetella bronchiseptica* Lipid A Biosynthesis . *J of Bacteriol* **193**, 4726-4735 (2011).
325. Mack,D., Heesemann,J. & Laufs,R. Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Medical Microbiol Immunol* **183**, 217-227 (1994).
326. Macnab,R.M. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt,F.C. *et al.* (eds.), pp. 123-142 (American Society for Microbiology, Washington, D.C.,1996).
327. Macnab,R.M. The Bacterial Flagellum: Reversible Rotary Propellor and Type III Export Apparatus 54. *J Bacteriol* **181**, 7149-7153 (1999).
328. Madrid,C., Balsalobre,C., García,J.s. The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins 08. *Mol Microbiol* **63**, 7-14 (2007).
329. Majdalani,N. & Gottesman,S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system 8. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 379-405 (2005).
330. Mamat U, Skurnik M & Bengoechea JA. Bacterial lipopolysaccharides (2011).
331. Manabe,T., Kawano,M. & Kawasaki,K. Mutations in the lipid A deacylase PagL which release the enzyme from its latency affect the ability of PagL to interact with lipopolysaccharide in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**, 812-816 (2010).
332. Manabe,T. & Kawasaki,K. Extracellular Loops of Lipid A 3-O-Deacylase PagL Are Involved in Recognition of Aminoarabinose-Based Membrane Modifications in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol* **190**, 5597-5606 (2008).
333. Manoil,C. & Beckwith,J. *TnphoA*: A transposon for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 8129-8133 (1985).

334. Mantle,M., Basaraba,L., Peacock,S.C. & Gall,D.G. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect Immun* **57**, 3292-3299 (1989).
335. Marceau,M. Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update. *Curr. Issues Mol. Biol.* **7**, 151-177 (2005).
336. Marceau,M. *et al.* The *pmrF* polymyxin-resistance operon of *Yersinia pseudotuberculosis* is upregulated by the PhoP-PhoQ two-component system but not by PmrA-PmrB, and is not required for virulence. *Microbiology* **150**, 3947-3957 (2004).
337. Marceau,M., Sebbane,F., Collyn,F. & Simonet,M. Skurnik,M., Bengoechea,J.A. & Granfors,K. (eds.), pp. 253-256 (Kluwer Academic Publishers,2004).
338. March,C. *et al.* Dissection of host cell signal transduction during *Acinetobacter baumannii*-triggered inflammatory response. *PLoS. ONE.* **5**, e10033 (2010).
339. Marenne,M.N., Journet,L., Mota,L.J. & Cornelis,G.R. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN 7. *Microb. Pathog.* **35**, 243-258 (2003).
340. Marra,A. & Isberg,R.R. Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* **65**, 3412-21 (1997).
341. Martínez de Tejada,G. & Moriyón,I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **63**, 3054-3061 (1995).
342. Martinez,R.J. Thermoregulation-dependent expression of *Yersinia enterocolitica* protein P1 imparts serum resistance to *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **171**, 3732-3739 (1989).
343. Matsumoto,H. & Young,G.M. Proteomic and functional analysis of the suite of Ysp proteins exported by the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B 75. *Mol Microbiol* **59**, 689-706 (2006).
344. Matsumoto,H. & Young,G.M. Essential Role of the SycP Chaperone in Type III Secretion of the YspP Effector 81. *J Bacteriol* **191**, 1703-1715 (2009).
345. Matsumoto,H. & Young,G.M. Translocated effectors of *Yersinia* 28. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 94-100 (2009).
346. Maxson,M.E. & Darwin,A.J. Identification of Inducers of the *Yersinia enterocolitica* Phage Shock Protein System and Comparison to the Regulation of the RpoE and Cpx Extracytoplasmic Stress Responses. *J of Bacteriol* **186**, 4199-4208 (2004).
347. Maxson,M.E. & Darwin,A.J. PspB and PspC of *Yersinia enterocolitica* are dual function proteins: regulators and effectors of the phage-shock-protein response. *Mol Microbiol* **59**, 1610-1623 (2006).
348. McCoy,A.J., Liu,H., Falla,T.J. & Gunn,J.S. Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2030-2037 (2001).
349. McDermott,P.F., Ciacci-Woolwine,F., Snipes,J.A. & Mizel,S.B. High-Affinity Interaction between Gram-Negative Flagellin and a Cell Surface Polypeptide Results in Human Monocyte Activatio. *Infect Immun* **68**, 5525-5529 (2000).
350. McDonald,C., Vaccrasis,P.O., Bliska,J.B. & Dixon,J.E. The *Yersinia* Virulence Factor YopM Forms a Novel Protein Complex with Two Cellular Kinases . *J Biol Chem* **278**, 18514-18523 (2003).
351. Mecsas,J., Bilis,I. & Falkow,S. Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **69**, 2779-2787 (2001).

-
352. Medzhitov,R. & Janeway,C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
353. Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P. & Janeway,C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
354. Meibom,K.L. *et al.* Hfq, a Novel Pleiotropic Regulator of Virulence-Associated Genes in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* **77**, 1866-1880 (2009).
355. Mejia,E., Bliska,J.B. & Viboud,G.I. *Yersinia* controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS. Pathog.* **4**, e3 (2008).
356. Meredith,T.C. & Woodard,R.W. Escherichia coli YrbH Is a D-Arabinose 5-Phosphate Isomerase. *J Biol Chem* **278**, 32771-32777 (2003).
357. Merhej,V., Ad+@kambi,T.d., Pagnier,I., Raoult,D. & Drancourt,M. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Inter J Syst Evol* **58**, 779-784 (2008).
358. Mertz,A.K.H., Batsford,S.R., Curschellas,E., Kist,M.J. & Gondolf,K.B. Cationic *Yersinia* Antigen-Induced Chronic Allergic Arthritis in Rats - A Model for Reactive Arthritis in Humans. *J Clin Invest* **88**, 632-642 (1991).
359. Michiels,T. & Cornelis,G.R. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J Bacteriol* **173**, 1677-1685 (1991).
360. Michiels,T. *et al.* Analysis of *virC*, an Operon Involved in the Secretion of Yop Proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **173**, 4994-5009 (1991).
361. Michiels,T., Wattiau,P., Brasseur,R., Ruyschaert,J.-M. & Cornelis,G. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* **58**, 2840-2849 (1990).
362. Mikulskis,A.V., Delor,I., Thi,V.H. & Cornelis,G.R. Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol Microbiol* **14**, 905-915 (1994).
363. Miller,J.H. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1992).
364. Miller,S.I., Ernst,R.K. & Bader,M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 36-46 (2005).
365. Miller,S.I., Kukral,A.M. & Mekalanos,J.J. A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci* **86**, 5054-5058 (1989).
366. Miller,S.I. & Mekalanos,J.J. Constitutive expression of the *PhoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J Bacteriol* **172**, 2485-2490 (1990).
367. Miller,V.L., Beer,K.B., Heusipp,G., Young,B.M. & Wachtel,M.R. Identification of regions of *Ail* required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol* **41**, 1053-62 (2001).
368. Miller,V.L., Bliska,J.B. & Falkow,S. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica ail* gene and characterization of the *Ail* protein product. *J Bacteriol* **172**, 1062-1069 (1990).
369. Miller,V.L. & Falkow,S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**, 1242-1248 (1988).
370. Miller,V.L., Farmer III,J.J., Hill,W.E. & Falkow,S. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* **57**, 121-131 (1989).
371. Miller ND, Draughon FA, D'Souza DH. Real-time reverse-transcriptase--polymerase chain reaction for *Salmonella enterica* detection from jalapeño and serrano peppers. *Foodborne Pathog Dis.* **4**:367-73 (2000).

372. Miller,W.G., Leveau,J.H. & Lindow,S.E. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 1243-1250 (2000).
373. Minnich,S. & Rohde,H. Advance in Experimental Medicine and Biology. Perry,R.D. & Fetherston,J.D. (eds.), pp. 298-311 (Springer New York,2007).
374. Mobley,H.L.T., Island,M.D. & Hausinger,R.P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* **59**, 451-480 (1995).
375. Model,P., Jovanovic,G. & Dworkin,J. The Escherichia coli phage-shock-protein (*psp*) operon. *Molecular Microbiology* **24**, 255-261 (1997).
376. Montagner,C., Arquint,C. & Cornelis,G.R. Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* Form a Multimeric Integral Membrane Complex in Eukaryotic Cell Membranes. *J Bacteriol* **193**, 6923-6928 (2011).
377. Montminy,S.W. *et al.* Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response 5. *Nat. Immunol.* **7**, 1066-1073 (2006).
378. Moon,K. & Gottesman,S. A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **74**, 1314-1330 (2009).
379. Moore,K.J. *et al.* Divergent Response to LPS and Bacteria in CD14-Deficient Murine Macrophages. *J Immunol* **165**, 4272-4280 (2000).
380. Moran,A.P., Lindner,B. & Walsh,E.J. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **179**, 6453-6463 (1997).
381. Moskowitz,S.M., Ernst,R.K. & Miller,S.I. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* **186**, 575-579 (2004).
382. Mouslim,C. & Groisman,E.A. Control of the *Salmonella* *ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* **47**, 335-344 (2003).
383. Mueller,C.A., Broz,P. & Cornelis,G.R. The type III secretion system tip complex and translocon 3. *Mol. Microbiol.* **68**, 1085-1095 (2008).
384. Mulder,B., Michiels,T., Simonet,M., Sory,M.-P. & Cornelis,G. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* **57**, 2534-2541 (1989).
385. Müller-Loennies,S., Rund,S., Ervelä,E., Skurnik,M. & Holst,O. The structure of the carbohydrate backbone of the core-lipid A region of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Eur J Biochem* **261**, 19-24 (1999).
386. Nagai,Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**, 667-672 (2002).
387. Nagel,G., Lahrz,A. & Dersch,P. Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol. Microbiol.* **41**, 1249-1269 (2001).
388. Nagel,G., Lahrz,A. & Dersch,P. Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol. Microbiol.* **41**, 1249-1269 (2001).
389. Najdenski,H. *et al.* Experimental pig yersiniosis to assess attenuation of *Yersinia enterocolitica* O:8 mutant strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**, 425-435 (2006).
390. Najdenski,H., Golkocheva,E., Vesselinova,A., Bengoechea,J.A. & Skurnik,M. Proper expression of the O-antigen of lipopolysaccharide is essential for the virulence of *Yersinia enterocolitica* O:8

-
- in experimental oral infection of rabbits. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* In press. (2003).
391. Nakao,H., Watanabe,H., Nakayama,S. & Takeda,T. ysf gene expression in *Yersinia enterocolitica* is positively regulated by a chromosomal region that is highly homologous to *Escherichia coli* host factor 1 gene (hfq). *Molecular Microbiology* **18**, 859-865 (1995).
392. Nakka,S., Qi,M. & Zhao,Y. The *Erwinia amylovora* PhoPQ system is involved in resistance to antimicrobial peptide and suppresses gene expression of two novel type III secretion systems. *Microbiological Research* **165**, 665-673 (2010).
393. Navarre,W.W. *et al.* Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol. Microbiol.* **56**, 492-508 (2005).
394. Navarre,W.W., McClelland,M., Libby,S.J. & Fang,F.C. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes & Development* **21**, 1456-1471 (2007).
395. Navarro,L. *et al.* Identification of a Molecular Target for the *Yersinia* Protein Kinase A. *Mol Cell* **26**, 465-477 (2007).
396. Neyt,C. & Cornelis,G.R. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol***31**, 143-156 (1999).
397. Nicolas,P. & Mor,A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defence system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* **49**, 277-304 (1995).
398. Nieto,J.M. *et al.* Evidence for Direct Protein-Protein Interaction between Members of the Enterobacterial Hha/YmoA and H-NS Families of Proteins 86. *J Bacteriol* **184**, 629-635 (2002).
399. Nieto,J.M. *et al.* Expression of the hemolysin in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 349-358 (2000).
400. Nikaido,H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593-656 (2003).
401. Niléhn,B. Electron Microscopic Studies on Flagellation in Different Strains of *Yersinia Enterocolitica*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **77**, 527-541 (1969).
402. Niléhn,B. Studies on *Yersinia enterocolitica*. Growth on Various Solid Media at 37 C And 25 C. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **77**, 685-697 (1969).
403. Nizet,V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**, 11-26 (2006).
404. Nummelin,H. *et al.* The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel [beta]-roll 48. *EMBO J* **23**, 701-711 (2004).
405. Nummila,K., Kilpeläinen,I., Zähringer,U., Vaara,M. & Helander,I.M. Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol Microbiol* **16**, 271-278 (1995).
406. Oertelt,C., Lindner,B., Skurnik,M. & Holst,O. Isolation and structural characterization of an R-form lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Eur. J. Biochem.* **268**, 554-564 (2001).
407. Ohnishi K., Kutsukake,K., Suzuki H. & Lino T. Gene fliA encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella*. *Mol. Gen. Genet.* **221**, 139-147 (2012).
408. Ortega,X.P. *et al.* A putative gene cluster for aminoarabinose biosynthesis is essential for *Burkholderia cenocepacia* viability. *J. Bacteriol.* **189**, 3639-3644 (2007).

409. Padilla,E. *et al.* Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence . *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 177-183 (2010).
410. Pai,C.H. & DeStephano,L. Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity* **35**, 605-611 (1982).
411. Pai,C.H. & MOrs,V. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **19**, 908-911 (1978).
412. Pai,C.H., MOrs,V. & Toma,S. Prevalence of enterotoxigenicity in human and nonhuman isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **22**, 334-338 (1978).
413. Palmer,L.E., Hobbie,S., Galan,J.E. & Bliska,J.B. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* **27**, 953-965 (1998).
414. Pasare,C. & Medzhitov,R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes. Infect.* **6**, 1382-1387 (2004).
415. Payne,P.L. & Straley,S.C. YscO of *Yersinia pestis* Is a Mobile Core Component of the Yop Secretion System 17. *J Bacteriol* **180**, 3882-3890 (1998).
416. Payne,P.L. & Straley,S.C. YscP of *Yersinia pestis* Is a Secreted Component of the Yop Secretion System 18. *J Bacteriol* **181**, 2852-2862 (1999).
417. Pederson,K.J. & Pierson,D.E. Ail expression in *Yersinia enterocolitica* is affected by oxygen tension. *Infect Immun* **63**, 4199-4201 (1995).
418. Pelludat,C., Rakin,A., Jacobi,C.A., Schubert,S. & Heesemann,J. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* **180**, 538-46 (1998).
419. Pepe,J.C., Badger,J.L. & Miller,V.L. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Mol Microbiol* **11**, 123-135 (1994).
420. Pepe,J.C. & Miller,V.L. The Biological Role of Invasin During a *Yersinia Enterocolitica* Infection. *Infectious Agents and Disease - Reviews Issues and Commentary* **2**, 236-241 (1993).
421. Pepe,J.C. & Lori, S. Amino acid substitutions in PilD, a bifunctional enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptidase and N-methyltransferase activities in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **30**, 221-227 (1998).
422. Pepe,J.C. & Miller,V.L. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 6473-6477 (1993).
423. Pepe,J.C., Wachtel,M.R., Wagar,E. & Miller,V.L. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* **63**, 4837-4848 (1995).
424. Perez,J.C. *et al.* Evolution of a Bacterial Regulon Controlling Virulence and Mg²⁺ Homeostasis 41. *PLoS Genet* **5**, e1000428 (2009).
425. Perez-Gutierrez,C., Llobet,E., Llompert,C.M., Reines,M. & Bengoechea,J.A. Role of lipid A acylation in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect. Immun.* **78**, 2768-2781 (2010).
426. Perez-Gutierrez,C., Llompert,C.M., Skurnik,M. & Bengoechea,J.A. Expression of the *Yersinia enterocolitica* pYV-encoded type III secretion system is modulated by lipopolysaccharide O-antigen status. *Infect. Immun.* **75**, 1512-1516 (2007).
427. Persing,D.H. *et al.* Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends in Microbiology* **10**, s32-s37 (2002).
428. Persson,C. *et al.* Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol Microbiol* **33**, 828-838 (1999).

-
429. Pescaretti, M.d.I.M., Morero, R. & Delgado, M.n.A. Identification of a new promoter for the response regulator *rcsB* expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *FEMS Microbiology Letters* **300**, 165-173 (2009).
430. Peterson, A.A., Haug, A. & McGroarty, E.J. Physical properties of short- and long-O-antigen containing fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4. *J Bacteriol* **165**, 116-122 (1986).
431. Pierson, D.E. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance Ail-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. *J Bacteriol* **176**, 4043-4051 (1994).
432. Pierson, D.E. & Falkow, S. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect Immun* **61**, 1846-1852 (1993).
433. Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J. & Brade, V. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect Immun* **60**, 189-195 (1992).
434. Plano, G.V., Day, J.B. & Ferracci, F. Type III export: new uses for an old pathway 06. *Molr Microbiol* **40**, 284-293 (2001).
435. Plesniak, L.A. *et al.* Expression, refolding, and initial structural characterization of the *Y. pestis* Ail outer membrane protein in lipids 83. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 482-489 (2011).
436. Prehna, G., Ivanov, M.I., Bliska, J.B. & Stebbins, C.E. *Yersinia* Virulence Depends on Mimicry of Host Rho-Family Nucleotide Dissociation Inhibitors 33. *Cell* **126**(5), 869-880. 8-9-2006.
437. Prentice, M.B. *et al.* *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid. *J Bacteriol* **183**, 2586-2594 (2001).
438. Preston, A. *et al.* *Bordetella bronchiseptica* PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. *Mol. Microbiol.* **48**, 725-736 (2003).
439. Price, N.P. *et al.* Lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: role of a 2-keto-3-deoxyoctulosonate-activated 4' phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7352-7356 (1995).
440. Prior, J.L. *et al.* Characterization of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Microbial Pathogenesis* **30**, 49-57 (2001).
441. Prior, J.L. *et al.* The failure of different strains of *Yersinia pestis* to produce lipopolysaccharide O-antigen under different growth conditions is due to mutations in the O-antigen gene cluster. *FEMS Microbiology Letters* **197**, 229-233 (2001).
442. Pujol, C. & Bliska, J.B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol* **114**, 216-226 (2005).
443. Que-Gewirth, N.L., Karbarz, M.J., Kalb, S.R., Cotter, R.J. & Raetz, C.R. Origin of the 2-amino-2-deoxy-gluconate unit in *Rhizobium leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. *J. Biol. Chem.* **278**, 12120-12129 (2003).
444. Raczowska, A., Skorek, K., Bielecki, J. & Brzostek, K. OmpR controls *Yersinia enterocolitica* motility by positive regulation of *flhDC* expression. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**, 381-394 (2011).
445. Radaev, S., Dastidar, P., Patel, M., Woodard, R.W. & Gatti, D.L. Structure and Mechanism of 3-Deoxy-d-manno-octulosonate 8-Phosphate Synthase. *J Biol Chem* **275**, 9476-9484 (2000).
446. Radziejewska-Lebrecht, J., Bhat UR, Brade H, Kaca W & Mayer H. The chemical structure of the lipopolysaccharide of a Rc-type mutant of *Proteus mirabilis* lacking 4-amino-4-deoxy-L arabinose and its susceptibility towards polymyxin B. *Adv. Exp. Med. Biol.* **256**, 121-126 (1990).
447. Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S. & Bishop, R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 295-329 (2007).

448. Raetz,C.R. & Whitfield,C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635-700 (2002).
449. Rakin,A., Noelting,C., Schubert,S. & Heesemann,J. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **67**, 5265-5274 (1999).
450. Rakin,A., Urbitsch,P. & Heesemann,J. Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *J Bacteriol* **177**, 2292-2298 (1995).
451. RAMADAS BHAT,U., Carlson,R.W., BUSCH,M. & Mayer,H. Distribution and Phylogenetic Significance of 27-Hydroxy-Octacosanoic Acid in Lipopolysaccharides from Bacteria: Belonging to the Alpha-2 Subgroup of Proteobacteria 37. *Inter J Sys Bacteriol* **41**, 213-217 (1991).
452. Ramos,H.C., Rumbo,M. & Sirard,J.C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa 68. *Trends Microbiol* **12**, 509-517 (2004).
453. Rao,M.C., Guandalini,S., Laird,W.J. & Field,M. Effects of heat-stable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum 09. *Infect Immun* **26**, 875-878 (1979).
454. Ray,P.H., Benedict,C.D. & Grasmuk,H. Purification and characterization of cytidine 5'-triphosphate:cytidine 5'-monophosphate-3-deoxy-D-manno-octulosonate cytidyltransferase 5. *J Bacteriol* **145**, 1273-1280 (1981).
455. Rebeil,R., Ernst,R.K., Gowen,B.B., Miller,S.I. & Hinnebusch,B.J. Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae. *Mol. Microbiol.* **52**, 1363-1373 (2004).
456. Rebeil,R. *et al.* Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. *J. Bacteriol.* **188**, 1381-1388 (2006).
457. Reeves,P.R. *et al.* Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**, 495-503 (1996).
458. Revell,P.A. & Miller,V.L. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* **35**, 677-685 (2000).
459. Reynolds,C.M., Kalb,S.R., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the *eptB* gene and Ca²⁺ hypersensitivity of an *eptB* deletion mutant. *J. Biol. Chem.* **280**, 21202-21211 (2005).
460. Reynolds,C.M. *et al.* An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* *lpxR* that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J. Biol. Chem.* **281**, 21974-21987 (2006).
461. Rietschel,E.T. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**, 217-225 (1994).
462. Rimsky,S. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 109-114 (2004).
463. Riot,B., Berche,P. & Simonet,M. Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun* **65**, 1985-1990 (1997).
464. Robertson,G.T. & Roop,R.M. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* **34**, 690-700 (1999).
465. Robey,M., O'Connell,W. & Cianciotto,N.P. Identification of *Legionella pneumophila* *rcp*, a pagP-Like Gene That Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and Promotes Intracellular Infection. *Infect Immun* **69**, 4276-4286 (2001).
466. Roggenkamp,A., Neuberger,H.-R., Flügel,A., Schmoll,T. & Heesemann,J. Substitution of two histidine residues in *YadA* protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**, 1207-1219 (1995).

-
467. Roggenkamp,A., Ruckdeschel,K., Leitritz,L., Schmitt,R. & Heesemann,J. Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* **64**, 2506-2514 (1996).
468. Roggenkamp,A., Schubert,S., Jacobi,C.A. & Heesemann,J. Dissection of the *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid pYV08 into an operating unit and virulence gene modules. *FEMS Microbiology Letters* **134**, 69-73 (1995).
469. Roggenkamp,A. *et al.* Molecular Analysis of Transport and Oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* Adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**, 3735-3744 (2003).
470. Rohde,J.R., Luan,X.S., Rohde,H., Fox,J.M. & Minnich,S.A. The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol***181**, 4198-4204 (1999).
471. Rosqvist,R., Forsberg,Å. & Wolf-Watz,H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* **59**, 4562-4569 (1991).
472. Rosqvist,R. & Wolf-Watz,H. Virulence plasmid-associated HeLa cell induced cytotoxicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbial Pathogenesis* **1**, 229-240 (1986).
473. Ruckdeschel,K. *et al.* *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor α production. *J Exp Med* **187**, 1069-79 (1998).
474. Ruckdeschel,K. *et al.* *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* **166**, 1823-1831 (2001).
475. Russo,F.D. & Silhavy,T.J. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes 67. *J Mol Biol* **222**, 567-580 (1991).
476. Rutten,L. *et al.* Active-site architecture and catalytic mechanism of the lipid A deacylase LpxR of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 1960-1964 (2009).
477. Rutten,L. *et al.* Crystal structure and catalytic mechanism of the LPS 3-O-deacylase PagL from *Pseudomonas aeruginosa* 3649. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 7071-7076 (2006).
478. Saha,S. *et al.* Role of *Yersinia enterocolitica*& heat-stable enterotoxin (Y-STa) on differential regulation of nuclear and cytosolic calcium signaling in rat intestinal epithelial cells. *Cell Biol Toxicol* **25**, 297-308 (2009).
479. Saha,S., Gupta,D.D. & Chakrabarti,M.K. Involvement of phospholipase C in *Yersinia enterocolitica* heat stable enterotoxin (Y-STa) mediated rise in intracellular calcium level in rat intestinal epithelial cells. *Toxicon* **45**, 361-367 (2005).
480. Saigi,F. *et al.* Genetic Analysis of the *Serratia marcescens* N28b O4 Antigen Gene Cluster. *J Bacteriol* **181**, 1883-1891 (1999).
481. Sambrook,J., Fritsch,E.F. & Maniatis,T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
482. Samuel,G. & Reeves,P. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate Research* **338**, 2503-2519 (2003).
483. Samuelsson,K., Lindberg,B. & Brubaker,R.R. Structure of O-specific side chains of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol* **117**, 1010-1016 (1974).
484. Sarker,M.R., Neyt,C., Stainier,I. & Cornelis,G.R. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* **180**, 1207-14 (1998).

485. Sauvonnet,N., Lambermont,I., van der,B.P. & Cornelis,G.R. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol. Microbiol.* **45**, 805-815 (2002).
486. Sauvonnet,N., Pradet-Balade,B., Garcia-Sanz,J.A. & Cornelis,G.R. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J. Biol. Chem.* **277**, 25133-25142 (2002).
487. Schesser,K. *et al.* The yopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF- κ B activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* **28**, 1067-1079 (1998).
488. Schmidt,A., Durgan,J., Magalhaes,A. & Hall,A. Rho GTPases regulate PRK2/PKN2 to control entry into mitosis and exit from cytokinesis. *EMBO J* **26**, 1624-1636 (2007).
489. Schmidt,G. *Yersinia enterocolitica* outer protein T (YopT) 30. *Eur J Cell Biol* **90**, 955-958 (2011).
490. Schmiel,D.H., Wagar,E., Karamanou,L., Weeks,D. & Miller,V.L. Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect Immun* **66**, 3941-51 (1998).
491. Schmiel,D.H., Young,G.M. & Miller,V.L. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon O. *J Bacteriol* **182**, 2314-2320 (2000).
492. Schotte,P. *et al.* Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 25134-25142 (2004).
493. Schromm,A.B. *et al.* Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2008-2013 (2000).
494. Schubert,S., Rakin,A., Karch,H., Carniel,E. & Heesemann,J. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* **66**, 480-485 (1998).
495. Schulze-Koops,H. *et al.* Outer membrane protein YadA of enteropathogenic *Yersiniae* mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infection and Immunity* **61**, 2513-2519 (1993).
496. Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., von der Mark,K. & Emrich,F. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen. *Infect Immun* **60**, 2153-2159 (1992).
497. Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., von der Mark,K. & Emrich,F. Characterization of the binding region for the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA on types I and II collagen. *Arthritis and Rheumatism* **38**, 1283-1289 (1995).
498. Schütz,M. *et al.* Trimer Stability of YadA Is Critical for Virulence of *Yersinia enterocolitica* 47. *Infection and Immunity* **78**, 2677-2690 (2010).
499. Sebbane,F., Devalckenaere,A., Foulon,J., Carniel,E. & Simonet,M. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the *ureD* gene. *Infect Immun* **69**, 170-176 (2001).
500. Severn,W.B., Kelly,R.F., Richards,J.C. & Whitfield,C. Structure of the core oligosaccharide in the serotype O8 lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **178**, 1731-1741 (1996).
501. Shafer,W.M., Qu,X., Waring,A.J. & Lehrer,R.I. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 1829-1833 (1998).
502. Shao,F. *et al.* Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases 29. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 904-909 (2003).

-
503. Sidorczyk, Z., SIDORCZYK,Z., Zähringer,U. & Rietschl, E.T. Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. *Eur J Biochem* **137**, 15-22 (1983).
504. Silva-Herzog,E., Ferracci,F., Jackson,M.W., Joseph,S.S. & Plano,G.V. Membrane localization and topology of the *Yersinia pestis* YscJ lipoprotein. *Microbiology* **154**, 593-607 (2008).
505. Simonet,M., Richard,S. & Berche,P. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* **58**, 841-845 (1990).
506. Simonet,M., Riot,B., Fortineau,N. & Berche,P. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect. Immun.* **64**, 375-379 (1996).
507. Sing,A., Roggenkamp,A., Geiger,A.M. & Heesemann,J. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* **168**, 1315-1321 (2002).
508. Singh,I. & Viridi,J.S. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *J Med Microbiol* **53**, 1065-1068 (2004).
509. Sittka,A., Pfeiffer,V., Tedin,K. & Vogel,J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol***63**, 193-217 (2007).
510. Skrzypek,E., Cowan,C. & Straley,S.C. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* **30**, 1051-1065 (1998).
511. Skrzypek,E., Myers-Morales,T., Whiteheart,S.W. & Straley,S.C. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* Model To Study Requirements for Trafficking of *Yersinia pestis* YopM in Eucaryotic Cells 39. *Infect Immun* **71**, 937-947 (2003).
512. Skurnik,M. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect Immun* **47**, 183-190 (1985).
513. Skurnik,M. Genetics of Bacterial Polysaccharides. Goldberg,J. (ed.), pp. 23-51 (CRC Press, Boca Raton, FL,1999).
514. Skurnik,M., Batsford,S., Mertz,A., Schiltz,E. & Toivanen,P. The putative arthritogenic cationic 19-kilodalton antigen of *Yersinia enterocolitica* is a urease β -subunit. *Infect Immun* **61**, 2498-2504 (1993).
515. Skurnik,M. *et al.* Characterization and biological role of the O-polysaccharide gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *J. Bacteriol.* **189**, 7244-7253 (2007).
516. Skurnik,M., Bölin,I., Heikkinen,H., Piha,S. & Wolf-Watz,H. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **158**, 1033-1036 (1984).
517. Skurnik,M., El Tahir,Y., Saarinen,M., Jalkanen,S. & Toivanen,P. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect Immun* **62**, 1252-1261 (1994).
518. Skurnik,M., Peippo,A. & Ervelä,E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol***37**, 316-330 (2000).
519. Skurnik,M. & Toivanen,P. LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **174**, 2047-2051 (1992).
520. Skurnik,M. & Toivanen,P. *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide: genetics and virulence. *Trends in Microbiology* **1**, 148-152 (1993).

521. Skurnik,M., Venho,R., Bengoechea,J.-A. & Moriyón,I. The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Mol Microbiol* **31**, 1443-1462 (1999).
522. Skurnik,M., Venho,R., Toivanen,P. & Al-Hendy,A. A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. *Mol Microbiol* **17**, 575-594 (1995).
523. Skurnik,M. & Wolf-Watz,H. Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**, 517-529 (1989).
524. Smith,A.E. *et al.* PagP Activation in the Outer Membrane Triggers R3 Core Oligosaccharide Truncation in the Cytoplasm of *Escherichia coli* O157:H7 51. *J Biol Chem* **283**, 4332-4343 (2008).
525. Sodeinde,O.A. *et al.* A surface protease and the invasive character of plague. *Science* **258**, 1004-1007 (1992).
526. Sommaruga,S., Gioia,L.D., Tortora,P. & Polissi,A. Structure prediction and functional analysis of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **388**, 222-227 (2009).
527. Soncini,F.C., Garcia,V.E., Solomon,F. & Groisman,E.A. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J. Bacteriol.* **178**, 5092-5099 (1996).
528. Soncini M, Chilovi F, Triossi O, Leo P. Weekend effect in non-variceal upper gastrointestinal bleeding: data from nine italian gastrointestinal units. *Am J Gastroenterol.* **4**, 635-636 (2012).
529. Soncini,F.C. & Groisman,E.A. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J. Bacteriol.* **178**, 6796-6801 (1996).
530. Song,H. *et al.* Modulation of the Regulatory Activity of Bacterial Two-component Systems by SlyA. *J Biol Chem* **283**, 28158-28168 (2008).
531. Sorg,I. *et al.* YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J.* **26**, 3015-3024 (2007).
532. Sory,M.P., Boland,A., Lambermont,I. & Cornelis,G.R. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 11998-12002 (1995).
533. Sprague,L.D. & Neubauer,H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov 9. *Inter J System Evol Microbiol* **55**, 831-835 (2005).
534. Sprague,L.D., Scholz,H.C., Amann,S., Busse,H.J. & Neubauer,H. *Yersinia similis* sp. nov *Inter J System EvolMicrobiol* **58**, 952-958 (2008).
535. Spreter,T. *et al.* A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 468-476 (2009).
536. Staggs,T.M., Fetherston,J.D. & Perry,R.D. Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis* fur mutation. *J. Bacteriol* **176**, 7614-7624 (1994).
537. Stead,C. *et al.* A novel 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) hydrolase that removes the outer Kdo sugar of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **187**, 3374-3383 (2005).
538. Stead,C.M., Beasley,A., Cotter,R.J. & Trent,M.S. Deciphering the unusual acylation pattern of *Helicobacter pylori* lipid A. *J. Bacteriol.* **190**, 7012-7021 (2008).
539. Stead,C.M., Zhao,J., Raetz,C.R. & Trent,M.S. Removal of the outer Kdo from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and its impact on the bacterial surface. *Mol. Microbiol.* **78**, 837-852 (2010).
540. Stebbins,C.E. & Galan,J.E. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**, 77-81 (2001).

-
541. Steeghs,L. *et al.* Expression of foreign LpxA acyltransferases in *Neisseria meningitidis* results in modified lipid A with reduced toxicity and retained adjuvant activity. *Cell Microbiol* **4**, 599-611 (2002).
542. Stoebel,D.M., Free,A. & Dorman,C.J. Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria . *Microbiology* **154**, 2533-2545 (2008).
543. Stöver,A.G. *et al.* Structure-Activity Relationship of Synthetic Toll-like Receptor 4 Agonists. *J Biol Chem* **279**, 4440-4449 (2004).
544. Straley,S.C. & Perry,R.D. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends in Microbiology* **3**, 310-317 (1995).
545. Takeda,K. & Akira,S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* **6**, 733-742 (2001).
546. Tam,C. & Missiakas,D. Changes in lipopolysaccharide structure induce the sigma(E)-dependent response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **55**, 1403-1412 (2005).
547. Tamm,A. *et al.* Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**, 995-1011 (1993).
548. Tampakaki,A.P., Fadoulglou,V.E., Gazi,A.D., Panopoulos,N.J. & Kokkinidis,M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**, 805-816 (2004).
549. Tan,L. & Darby,C. *Yersinia pestis* YrbH is a multifunctional protein required for both 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid biosynthesis and biofilm formation . *Mol Microbiol* **61**, 861-870 (2006).
550. Terashima,H., Kojima,S. & Homma,M. International Review of Cell and Molecular Biology. Kwang,W.J. (ed.), pp. 39-85 (Academic Press,2008).
551. Terti,R., Skurnik,M., Vartio,T. & Kuusela,P. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun* **60**, 3021-3024 (1992).
552. Thei Dame,R., Wyman,C. & Goosen,N. Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA 42. *Biochimie* **83**, 231-234 (2001).
553. Thomson,N.R. *et al.* The Rap and Hor proteins of *Erwinia*,*Serratia* and *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **26**, 531-544 (1997).
554. Thomson,N.R. *et al.* The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS. Genet.* **2**, e206 (2006).
555. Touze,T., Tran,A.X., Hankins,J.V., Mengin-Lecreulx,D. & Trent,M.S. Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol. Microbiol.* **67**, 264-277 (2008).
556. Tran,A.X. *et al.* Periplasmic cleavage and modification of the 1-phosphate group of *Helicobacter pylori* lipid A. *J. Biol. Chem.* **279**, 55780-55791 (2004).
557. Tran,A.X., Stead,C.M. & Trent,M.S. Remodeling of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *J. Endotoxin. Res.* **11**, 161-166 (2005).
558. Tran,A.X. *et al.* The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *J. Bacteriol.* **188**, 4531-4541 (2006).
559. Tran,H.J. *et al.* Analysis of RovA, a transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 42423-42432 (2005).
560. Trasak,C. *et al.* *Yersinia* Protein Kinase YopO Is Activated by A Novel G-actin Binding Process. *J. Biol. Chem.* **282**, 2268-2277 (2007).

561. Trent,M.S., Pabich,W., Raetz,C.R. & Miller,S.I. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **276**, 9083-9092 (2001).
562. Trent,M.S. *et al.* Accumulation of a polyisoprene-linked amino sugar in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structural characterization and transfer to lipid A in the periplasm. *J. Biol. Chem.* **276**, 43132-43144 (2001).
563. Trent,M.S., Ribeiro,A.A., Lin,S., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J. Biol. Chem.* **276**, 43122-43131 (2001).
564. Trent,M.S., Stead,C.M., Tran,A.X. & Hankins,J.V. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J. Endotoxin. Res.* **12**, 205-223 (2006).
565. Trosky,J.E., Liverman,A.D. & Orth,K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol.* **10**, 557-565 (2008).
566. Trulzsch,K., Sporleder,T., Igwe,E.I., Russmann,H. & Heesemann,J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* **72**, 5227-5234 (2004).
567. Tzeng,Y.L. *et al.* KpsF Is the Arabinose-5-phosphate Isomerase Required for 3-Deoxy-d-manno-octulosonic Acid Biosynthesis and for Both Lipooligosaccharide Assembly and Capsular Polysaccharide Expression in *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* **277**, 24103-24113 (2002).
568. Uliczka,F. *et al.* Unique Cell Adhesion and Invasion Properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the Most Frequent Cause of Human Yersiniosis. *PLoS Pathog* **7**, e1002117 (2011).
569. Vaara,M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* **56**, 395-411 (1992).
570. Van Amersfoort,E.S., Van Berkel,T.J. & Kuiper,J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 379-414 (2003).
571. van Mourik,A. *et al.* Altered Linkage of Hydroxyacyl Chains in Lipid A of *Campylobacter jejuni* Reduces TLR4 Activation and Antimicrobial Resistance. *Journal of Biol Chem* **285**, 15828-15836 (2010).
572. Venecia,K. & Young,G.M. Environmental Regulation and Virulence Attributes of the Ysa Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B 74. *Infect Immun* **73**, 5961-5977 (2005).
573. Viau,C., Le Sage,V., Ting,D.K., Gross,J. & Le Moual,H. Absence of PmrAB-Mediated Phosphoethanolamine Modifications of *Citrobacter rodentium* Lipopolysaccharide Affects Outer Membrane Integrity. *J Bacteriol* **193**, 2168-2176 (2011).
574. Viboud,G.I. & Bliska,J.B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 69-89 (2005).
575. Viboud,G.I., Mejía,E. & Bliska,J.B. Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol* **8**, 1504-1515 (2006).
576. Vinogradov,E.V., Bock,K., Petersen,B.O., Holst,O. & Brade,H. The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter* strain ATCC 17905. *Eur. J. Biochem.* **243**, 122-127 (1997).
577. Vinogradov,E.V. *et al.* The core structure of the lipopolysaccharide from the causative agent of plague, *Yersinia pestis*. *Carbohydrate Research* **337**, 775-777 (2002).
578. Visser,L.G., Annema,A. & Vanfurth,R. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect Immun* **63**, 2570-2575 (1995).

-
579. Von Pawel-Rammigen,U. *et al.* GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* **36**, 737-748 (2000).
580. Wachtel,M.R. & Miller,V.L. *In vitro* and *in vivo* characterization of an *ail* mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **63**, 2541-2548 (1995).
581. Wagner,S., Stenta,M., Metzger,L.C., Dal,P.M. & Cornelis,G.R. Length control of the injectisome needle requires only one molecule of Yop secretion protein P (YscP) . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 13860-13865 (2010).
582. Walker,K.A. & Miller,V.L. Regulation of the Ysa Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica* by YsaE/SycB and YsrS/YsrR 78. *J Bacteriol* **186**, 4056-4066 (2004).
583. Walker,K.A., Obrist,M.W., Mildiner-Earley,S. & Miller,V.L. Identification of YsrT and Evidence that YsrRST Constitute a Unique Phosphorelay System in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **192**, 5887-5897 (2010).
584. Walker,P.J. & Grimes,D.J. A note on *Yersinia enterocolitica* in a swine farm watershed. *J Appl Microbiol* **58**, 139-143 (1985).
585. Wang,X., Karbarz,M.J., McGrath,S.C., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. MsbA transporter-dependent lipid A 1-dephosphorylation on the periplasmic surface of the inner membrane: topography of *Francisella novicida* LpxE expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 49470-49478 (2004).
586. Wang,X., McGrath,S.C., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *J. Biol. Chem.* **281**, 9321-9330 (2006).
587. Wang,X., Ribeiro,A.A., Guan,Z., Abraham,S.N. & Raetz,C.R. Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 4136-4141 (2007).
588. Wang,X. *et al.* Open diamondoid amino-functionalized MOFs for CO(2) capture. *Chem Commun* **16**, 144-148 (2006).
589. Wang,X. *et al.* Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida* . *Biochemistry* **45**, 14427-14440 (2006).
590. Wang,X. *et al.* Complete Genome Sequence of a *Yersinia enterocolitica* "Old World" (3/O:9) Strain and Comparison with the "New World" (1B/O:8) Strain 14. *J Clin Microbiol* **49**, 1251-1259 (2011).
591. Wattiau,P., Bernier,B., Deslee,P., Michiels,T. & Cornelis,G.R. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 10493-10497 (1994).
592. Wauters,G., Janssens,M., Steigerwalt,A.D. & Brenner,D.J. *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 424-429 (1988).
593. Weiner,L., Brissette,J.L. & Model,P. Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on sigma 54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes & Development* **5**, 1912-1923 (1991).
594. Weiner,L. & Model,P. Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival 98. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 2191-2195 (1994).
595. Weinrauch,Y., Drugan,D., Shapiro,S.D., Weiss,J. & Zychlinsky,A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417**, 91-94 (2002).
596. White,K.A., Kaltashov,I.A., Cotter,R.J. & Raetz,C.R.H. A mono-functional 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) transferase and a Kdo kinase in extracts of *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem* **272**, 16555-16563 (1997).

597. Whitfield,C. & Roberts,I.S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**, 1307-1319 (1999).
598. Wilkinson,S.G. Bacterial lipopolysaccharides--themes and variations. *Prog. Lipid Res.* **35**, 283-343 (1996).
599. Winfield,M.D., Latifi,T. & Groisman,E.A. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* **280**, 14765-14772 (2005).
600. Witowski,S.E., Walker,K.A. & Miller,V.L. YspM, a Newly Identified Ysa Type III Secreted Protein of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **190**, 7315-7325 (2008).
601. Woestyn,S., Allaoui,A., Wattiau,P. & Cornelis,G.R. Yscn, the Putative Energizer of the *Yersinia* Yop Secretion Machinery. *J Bacteriol* **176**, 1561-1569 (1994).
602. Wösten MM, van Dijk L, Veenendaal AK, de Zoete MR, Bleumink-Pluijm NM, van Putten JP. Temperature-dependent FlgM/FliA complex formation regulates *Campylobacter jejuni* flagella length. *Mol Microbiol.* **75**, 1577-15791 (2010).
603. Wosten,M.M. & Groisman,E.A. Molecular characterization of the PmrA regulon. *J. Biol. Chem.* **274**, 27185-27190 (1999).
604. Wosten,M.M., Kox,L.F., Chamnongpol,S., Soncini,F.C. & Groisman,E.A. A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **103**, 113-125 (2000).
605. Wu,J. & Woodard,R.W. *Escherichia coli* Yrbl Is 3-Deoxy-d-manno-octulosonate 8-Phosphate Phosphatase . *J Biol Chem* **278**, 18117-18123 (2003).
606. Wu,T. *et al.* Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 11754-11759 (2006).
607. Wulff-Strobel,C.R., Williams,A.W. & Straley,S.C. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion 44. *Mol Microbiol* **43**, 411-423 (2002).
608. Yan,A., Guan,Z. & Raetz,C.R. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**, 36077-36089 (2007).
609. Yang,Y. & Isberg,R.R. Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis yadA* product. *Infect Immun* **61**, 3907-3913 (1993).
610. Yanisch-Perron,C., Vieira,J. & Messing,J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119 (1985).
611. Yao,T., Mecsas,J., Healy,J.I., Falkow,S. & Chien,Y. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J. Exp. Med.* **190**, 1343-1350 (1999).
612. Yeaman,M.R. & Yount,N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55 (2003).
613. Young,B.M. & Young,G.M. YpIA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **184**, 1324-1334 (2002).
614. Young,B.M. & Young,G.M. YpIA Is Exported by the Ysc, Ysa, and Flagellar Type III Secretion Systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **184**, 1324-1334 (2002).
615. Young,G.M., Amid,D. & Miller,V.L. A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J. Bacteriol.* **178**, 6487-6495 (1996).
616. Young,G.M., Badger,J.L. & Miller,V.L. Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **68**, 4323-4326 (2000).

-
617. Young,G.M., Schmiel,D.H. & Miller,V.L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6456-6461 (1999).
618. Young,G.M., Smith,M.J., Minnich,S.A. & Miller,V.L. The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J Bacteriol* **181**, 2823-2833 (1999).
619. Young,V.B., Miller,V.L., Falkow,S. & Schoolnik. Sequence, localization and function of the invasins protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **4**, 1119-28 (1990).
620. Zasloff,M., Martin,B. & Chen,H.C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues 45. *Proc Natl Acad Sci* **85**, 910-913 (1988).
621. Zhang,L. Molecular genetics of the O-antigen of *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. PhD thesis. 118. 1996. University of Turku.
622. Zhang,L., Al-Hendy,A., Toivanen,P. & Skurnik,M. Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: Similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. *Mol Microbiol* **9**, 309-321 (1993).
623. Zhang,L., Radziejewska-Lebrecht,J., Krajewska-Pietrasik,D., Toivanen,P. & Skurnik,M. Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Mol Microbiol* **23**, 63-76 (1997).
624. Zhang,Y., Murtha,J., Roberts,M.A., Siegel,R.M. & Bliska,J.B. Type III Secretion Decreases Bacterial and Host Survival following Phagocytosis of *Yersinia pseudotuberculosis* by Macrophages 02. *Infect Immun* **76**, 4299-4310 (2008).
625. Zhou,Z., Lin,S., Cotter,R.J. & Raetz,C.R. Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH_4VO_3 in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy- L-arabinose, phosphoethanolamine and palmitate. *J Biol Chem* **274**, 18503-18514 (1999).
626. Zhou,Z. *et al.* Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J. Biol. Chem.* **276**, 43111-43121 (2001).
627. Zhou,Z., Ribeiro,A.A. & Raetz,C.R. High-resolution NMR spectroscopy of lipid A molecules containing 4- amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine substituents. Different attachment sites on lipid A molecules from NH_4VO_3 -treated *Escherichia coli* versus *kdsA* mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **275**, 13542-13551 (2000).

ANEXO I



Tabla 2. Modificaciones del lípido A en diferentes bacterias

Modificación del lípido A	Bacteria	Gen	Referencias
Adición de L-Ara4N	<i>Escherichia coli</i>	<i>pmrHFIJKLM</i>	215,405,625
	<i>Salmonella enterica</i>	<i>arnBCADTEF</i>	215
	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>arnT genes</i>	408
	<i>Francisella tularensis subesp. novicida</i>	<i>arnT genes</i>	589
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>arnBCADTEF</i>	233,317
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>arnT genes</i>	503 446
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>arnBCADTEF</i>	381
	<i>Yersinia pestis</i>	<i>pmrHFIJKLM</i>	144,599
Adición de fosfoetanolamina	<i>S. enterica</i>	<i>pmrC</i>	308
	<i>E. coli</i>	<i>eptA</i>	625,627
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>pmrC</i>	39
	<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>pmrC</i>	573
	<i>Campilobacter jejuni</i>	<i>petN</i>	142
	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>lptA</i>	141
	<i>Helicobacter pylori</i>	Hp0022	556,557
Adición de grupos fosfato	<i>E. coli</i>	<i>lpxT (YeiU)</i>	555
Deacilación	<i>S. enterica</i>	<i>pagL</i> (posición 3)	561
	<i>S. enterica</i>	<i>lpxR</i> (posición 3')	460
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>pagL</i> (posición 3)	324
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>pagL</i> (posición 3)	174,477
	<i>H. pylori</i>	<i>lpxR</i> (posición 3')	538
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>pagL</i> (posición 3)	35
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>lptO</i>	117
Hidroxilación	<i>S. enterica</i>	<i>lpxO</i>	200,201
	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>lpxO</i>	324
Acilación	<i>E. coli</i>	<i>crcA</i>	62
	<i>S. enterica</i>	<i>pagP</i>	219
	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>pagP</i>	438
	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>rcp</i>	465
	<i>Rhizobium sp.</i>	<i>lpxXL</i>	34
Eliminación de grupos fosfato	<i>F. novicida</i>	<i>lpxF</i> (posición 4')	586
		<i>lpxE</i> (posición 1)	585
	<i>P. gingivalis</i>	PGN_0524	133
		PG1773	
	<i>Rhizobium sp.</i>	<i>lpxF</i>	284,439
		<i>lpxE</i>	
	<i>H. pylori</i>	<i>lpxF</i>	143,380
		<i>lpxEHP</i>	380,556,558
Oxidación	<i>Rhizobium sp.</i>	<i>lpxQ</i>	443
Metilación	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>ltmA</i> (fosfato 1)	76

ANEXO II



Tabla 3. Cepas de *Y. enterocolitica* O:8 y *E. coli* utilizadas en este estudio

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i> O:8		
8081 (YeO8)	Derivado R ^{M+} de la cepa silvestre 8081, serotipo O:8. Patógena, cepa silvestre.	623
YeO8 Δ <i>manCKm</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>manC</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>manCKm</i> . Mutante definido que no expresa la cadena O. Km ^R .	Este trabajo
YeO8 Δ <i>manC</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>manC</i> . Derivado de YeO8 Δ <i>manCKm</i> , al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa Flp codificada en pCP20.	Este trabajo
YeO8 Δ <i>pmrF</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>pmrF</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pmrF</i> .	Este trabajo
YeO8 Δ <i>pagPGB</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>pagP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pagPGB</i> . Km ^R	Este trabajo
YeO8 Δ <i>pmrAB</i>	Mutante de YeO8 en el operón <i>pmrAB</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pmrAB</i> .	Este trabajo
YeO8 Δ <i>phoPQ</i>	Mutante de YeO8 en el operón <i>phoPQ</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>phoPQ</i> .	Este trabajo
Yvm927	Mutante de JB580v en el gen <i>rovA</i>	Virginia Miller

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i> O:8		
YeO8Δ <i>lpxR</i> Km	Mutante de YeO8 en el gen <i>lpxR</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>lpxR</i> Km. Km ^R	Este trabajo
YeO8Δ <i>lpxR</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>lpxR</i> . Derivado de YeO8Δ <i>lpxR</i> Km, al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa codificada en pFLP2-Tp.	Este trabajo
YeO8Δ <i>rscD</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>rscD</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>rscD</i> .	Este trabajo
YeO8Δ <i>pmrC</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>pmrC</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>pmrC</i> .	Este trabajo
YeO8Δ <i>hfq</i> Km	Mutante de YeO8 en el gen <i>hfq</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>hfq</i> Km. Km ^R	Este trabajo
YeO8Δ <i>hfq</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>hfq</i> . Derivado de YeO8Δ <i>hfq</i> Km, al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa codificada en pFLP2-Tp.	Este trabajo
YeO8Δ <i>yopPK</i> m	Mutante de YeO8 en el gen <i>yopP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>yopPK</i> m. Km ^R	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i> O:8		
YeO8Δ <i>yopP</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>yopP</i> . Derivado de YeO8Δ <i>yopPKm</i> , al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa codificada en pFLP2-Tr.	Este trabajo
YeO8Δ <i>lpxPGB</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>lpxP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>lpxPGB</i> . Km ^R	425
YeO8Δ <i>pmrF</i> -Δ <i>pagPGB</i>	Mutante de YeO8Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>pagP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>pagPGB</i> . Km ^R	Este trabajo
YeO8Δ <i>pmrF</i> -Δ <i>phoPQ</i>	Mutante de YeO8Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>phoPQ</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>phoPQ</i>	Este trabajo
YeO8Δ <i>pmrF</i> -Δ <i>lpxRKm</i>	Mutante de YeO8Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>lpxR</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>lpxRKm</i> . Km ^R	Este trabajo
YeO8Δ <i>pmrF</i> -Δ <i>rcsD</i>	Mutante de YeO8Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>rcsD</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>rcsD</i>	Este trabajo
YeO8Δ <i>pmrF</i> -Δ <i>pmrC</i>	Mutante de YeO8Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>pmrC</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>pmrC</i>	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i> O:8		
YeO8 Δ <i>pmrF</i> - Δ <i>phoPQ</i>	Mutante de YeO8 Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>phoPQ</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>phoPQ</i>	Este trabajo
YeO8 Δ <i>manC</i> - Δ <i>pagPGB</i>	Mutante de YeO8 Δ <i>manC</i> en el gen <i>pagP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pagPGB</i> . Km ^R	Este trabajo
YeO8 Δ <i>manC</i> - Δ <i>pmrF</i>	Mutante de YeO8 Δ <i>manC</i> en el gen <i>pmrF</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pmrF</i>	Este trabajo
YeO8 Δ <i>phoPQ</i> - Δ <i>pmrAB</i>	Mutante de YeO8 Δ <i>phoPQ</i> en el gen <i>pmrAB</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pmrAB</i>	Este trabajo
Yvm927- Δ <i>pmrF</i>	Mutante de Yvm927 en el gen <i>pmrF</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pmrF</i>	Este trabajo
Yvm927- Δ <i>pagP</i>	Mutante de Yvm927 en el gen <i>pagP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>pagPGB</i> . Km ^R	Este trabajo
Yvm927- Δ <i>hoPQ</i>	Mutante de Yvm927 en el gen <i>phoPQ</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ <i>phoPQ</i>	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i> O:8		
Yvm927- $\Delta rcsD$	Mutante de Yvm927 en el gen <i>rscD</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 $\Delta rcsD$	Este trabajo
Yvm927- Δhfq Km	Mutante de Yvm927 en el gen <i>hfq</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δhfq Km. Km ^R	Este trabajo
Yvm927- Δhfq	Mutante de Yvm927 en el gen <i>hfq</i> . Derivado de Yvm927- Δhfq , al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa codificada en pFLP2-Tp.	Este trabajo
YeO8 $\Delta phoPQ$ - Δhfq Km	Mutante de YeO8 $\Delta phoPQ$ en el gen <i>hfq</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δhfq Km. Km ^R	Este trabajo
YeO8 $\Delta phoPQ$ - Δhfq	Mutante de YeO8 $\Delta phoPQ$ en el gen <i>hfq</i> . Derivado de YeO8 $\Delta phoPQ$ - Δhfq , al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa codificada en pFLP2-Tp.	Este trabajo
YeO8 Δhfq - $\Delta lpxPGB$	Mutante de YeO8 Δhfq en el gen <i>lpxP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 $\Delta lpxPGB$. Km ^R	Este trabajo
YeO8 $\Delta yopP$ - $\Delta lpxR$ Km	Mutante de YeO8 $\Delta yopP$ en el gen <i>lpxR</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 $\Delta lpxR$ Km. Km ^R	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i> O:8		
Yvm927- Δ hoPQ- Δ pmrAB	Mutante de Yvm927- Δ hoPQ en el gen <i>pmrAB</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ pmrAB	Este trabajo
YeO8 Δ manC- Δ pmrF- Δ pagPGB	Mutante de YeO8 Δ manC- Δ pmrF en el gen <i>pagP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101 Δ pagPGB. Km ^R	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
BSN26	<i>rpoS1</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>trp</i> ::Tn10	270
BSN27	<i>rpoS1</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>trp</i> ::Tn10 Δ <i>hns</i>	270
C600	<i>thi thr leuB tonA lacY supE</i>	21
DH5 α	F'/ <i>endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 thi</i> ⁻¹ <i>recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (F80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	226
CC118 λ pir	Δ (<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> , λ pir phage lysogen	333
XL-1Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^f Δ M15 Tn10 (Tc ^r)]	Invitrogen
MG1655	F- λ mbda, Δ <i>ilvG</i> , Δ <i>rfb-50</i> , Δ <i>rph-1</i> , OR:H48:K-	68
HB101	<i>pro leu thi lacY endoI recA</i> . Sm ^r .	159 159

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Comentarios	Referencia
pKNG101	Plásmido suicida. Str ^R	276
pGEM-T <i>easy</i>	Plásmido para clonar fragmentos obtenidos por PCR con <i>Taq</i> polimerasa. Ap ^R	Promega
pGEMTΔ <i>manC</i>	pGEM-T con los fragmentos superior (729 pb) e inferior (840 pb) del gen <i>manC</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo
pGEMTΔ <i>manCKm</i>	Plásmido pGEMTΔ <i>manC</i> con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado entre los fragmentos superior e inferior del gen <i>manC</i> de YeO8. Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pKNG101Δ <i>manCKm</i>	Fragmento <i>manCKm</i> amplificado por PCR (3 kb) a partir del plásmido pGEMTΔ <i>manCKm</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Str ^R , Km ^R	Este trabajo
pGEMTYep <i>pmrF</i>	pGEM-T con el gen <i>pmrF</i> (1.7 kb) del operón <i>pmrHFIJKL</i> . Ap ^R	Este trabajo
pKNG101Δ <i>pmrF</i>	Fragmento <i>pmrF</i> amplificado por PCR inversa (1.4 kb) eliminando un fragmento de 360 pb a partir del plásmido pGEMTYep <i>pmrF</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Str ^R	Este trabajo
pGEMTYepag <i>P</i>	pGEM-T con el gen <i>pagP</i> (2 kb). Ap ^R	Este trabajo
pGEMTΔ <i>pagPGB</i>	Fragmento <i>pagP</i> amplificado por PCR inversa (1,7 Kb) eliminando un fragmento de 250pb a partir del plásmido pGEMTYepag <i>P</i> . Se clonó el casete de Km del plásmido pUC4K sacado con <i>PstI</i> . Ap ^R . Km ^R	Este trabajo

Plásmido	Comentarios	Referencia
pKNG101 Δ pagPGB	Alelo Δ pagP:: <i>GeneBlock</i> sacado con <i>PvuII</i> del plásmido pGEMT Δ pagPGB y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Str ^R . Km ^R	Este trabajo
pGEMTYe <i>lpxP</i>	pGEM-T con el gen <i>lpxP</i> (2 kb). Ap ^R	425
pGEMT Δ lpxPGB	Fragmento <i>lpxP</i> amplificado por PCR inversa (1,95 Kb) eliminando un fragmento de 56 pb a partir del plásmido pGEMTYe <i>lpxP</i> . Se clonó el casete de Km del plásmido pUC4K sacado con <i>PstI</i> . Ap ^R . Km ^R	425
pKNG101 Δ lpxPGB	Alelo Δ lpxP:: <i>GeneBlock</i> sacado con <i>PvuII</i> del plásmido pGEMT Δ lpxPGB y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Str ^R . Km ^R	425
pGEMT Δ phoPQ	pGEM-T con los fragmentos superior (844 pb) e inferior (509 pb) del gen <i>phoPQ</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo
pKNG101 Δ phoPQ	Fragmento <i>phoPQ</i> sacado con <i>PvuII</i> (1,4 kb) a partir del plásmido pGEMT Δ phoPQ y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Str ^R	Este trabajo
pGEMT Δ pmrAB	pGEM-T con los fragmentos superior (892 pb) e inferior (953 pb) del gen <i>pmrAB</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo
pKNG101 Δ pmrAB	Fragmento <i>pmrAB</i> sacado con <i>PvuII</i> (1,8 kb) a partir del plásmido pGEMT Δ pmrAB y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Str ^R	Este trabajo
pGEMT Δ lpxR	pGEM-T con los fragmentos superior (908 pb) e inferior (752 pb) del gen <i>lpxR</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo

Plásmido	Comentarios	Referencia
pGEMTΔ <i>lpxR</i> Km	Plásmido pGEMTΔ <i>lpxR</i> con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado entre los fragmentos superior e inferior del gen <i>lpxR</i> de YeO8. Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pKNG101Δ <i>lpxR</i> Km	Fragmento <i>lpxR</i> Km amplificado por PCR (3.1 kb) a partir del plásmido pGEMTΔ <i>lpxR</i> Km y clonado en el sitio <i>Sma</i> I del plásmido pKNG101. Str ^R , Km ^R	Este trabajo
pGEMTΔ <i>rscD</i>	pGEM-T con los fragmentos superior (818 pb) e inferior (759 pb) del gen <i>rscD</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo
pKNG101Δ <i>rscD</i>	Fragmento <i>rscD</i> amplificado por PCR (1,6 kb) a partir del plásmido pGEMTΔ <i>rscD</i> y clonado en el sitio <i>Sma</i> I del plásmido pKNG101. Str ^R , Km ^R	Este trabajo
pGEMTΔ <i>pmrC</i>	pGEM-T con los fragmentos superior (969 pb) e inferior (1065 pb) del gen <i>pmrC</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo
pKNG101 <i>pmrC</i>	Fragmento <i>pmrC</i> amplificado PCR (2 kb) a partir del plásmido pGEMTΔ <i>pmrC</i> y clonado en el sitio <i>Sma</i> I del plásmido pKNG101. Str ^R	Este trabajo
pGEMTΔ <i>hfq</i>	pGEM-T con los fragmentos superior (821 pb) e inferior (797 pb) del gen <i>hfq</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo
pGEMTΔ <i>hfq</i> Km	Plásmido pGEMTΔ <i>hfq</i> con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado entre los fragmentos superior e inferior del gen <i>hfq</i> de YeO8. Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pKNG101Δ <i>hfq</i> Km	Fragmento <i>hfq</i> Km amplificado PCR (3,1 kb) a partir del plásmido pGEMTΔ <i>hfq</i> Km y clonado en el sitio <i>Sma</i> I del plásmido pKNG101. Km ^R , Str ^R	Este trabajo

Plásmido	Comentarios	Referencia
pGEMT Δ yopP	pGEM-T con los fragmentos superior (628 pb) e inferior (742 pb) del gen <i>yopP</i> de YeO8. Ap ^R	Este trabajo
pGEMT Δ yopPKm	Plásmido pGEMT Δ yopP con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado entre los fragmentos superior e inferior del gen <i>yopP</i> de YeO8. Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pKNG101 Δ yopPKm	Fragmento <i>yopPKm</i> amplificado PCR (2,9 kb) a partir del plásmido pGEMT Δ yopPKm y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Km ^R , Str ^R	Este trabajo
pGEMTCom/ <i>lpxR</i>	Gen <i>lpxR</i> amplificado por PCR (Takara, 1500 pb) y clonado pGEM-T. El promotor de <i>lpxR</i> está en dirección opuesto al promotor <i>lacZ</i> del plásmido. Ap ^R	Este trabajo
pUC18	Plásmido de clonación de alto número de copia. Ap ^R	610 610
pUCProvA	Región promotora del gen <i>rovA</i> de YeO8 amplificada por PCR (1078 pb) y clonado en el sitio <i>HincII</i> del plásmido pUC18. Tet ^R , Ap ^R	425
pUCProvAlucFF	Gen <i>lucFF</i> amplificado por PCR (1,7kb) a partir del plásmido pRV34 y clonado en el sitio <i>KpnI</i> del plásmido pUCProvA. Tet ^R , Ap ^R	425
pRV1	Plásmido suicida, derivado de pJM703.1, Cm ^R	522
pRVProvAlucFF	Fragmento <i>ProvAlucFF</i> amplificado por PCR (2.7 kb) a partir de pUCProvAlucFF y clonado en el sitio <i>EcoRV</i> del plásmido suicida pRV1. Usado para construir cepas indicadoras para analizar los niveles de expresión de <i>rovA</i> . Cm ^R	425

Plásmido	Comentarios	Referencia
pGPL01	Plásmido de medio número de copia que contiene el gen <i>lucFF</i> sin su promotor. Usado para construir cepas indicadoras mediante la fusión transcripcional entre el promotor del gen de interés y el gen <i>lucFF</i> . Origen de replicación R6K, <i>mob</i> ⁺ . Ap ^R	216
p34S-Tp	Plásmido con un casete de resistencia a Tp flanqueado por múltiples dianas de restricción. Tp ^R	157
pGPLTp	Derivado del plásmido pGPL01 con un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>Pst</i> I. Ap ^S , Tp ^R	Este trabajo
pGPL01TppropmrH	Región promotora del operón <i>pmrHFIJKL</i> de YeO8 amplificada por PCR (677 pb), digerida con <i>Eco</i> RI y clonado en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo
pGPL01TppropagP	Región promotora del gen <i>pagP</i> de YeO8 amplificada por PCR (1096 pb), digerida con <i>Eco</i> RI y clonado en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo
pGPL01Tpprougd	Región promotora del gen <i>ugd</i> de YeO8 amplificada por PCR (889 pb), digerida con <i>Eco</i> RI y clonado en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo
pGPL01TpprophoPQ	Región promotora del operón <i>phoPQ</i> de YeO8 amplificada por PCR (509 pb), digerida con <i>Eco</i> RI y clonado en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo

Plásmido	Comentarios	Referencia
pGPL01TpprodacB	Región promotora del operón <i>daBpmrAB</i> de YeO8 amplificada por PCR (416 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo
pGPL01Tppro/pxR	Región promotora del gen <i>lpxR</i> de YeO8 amplificada por PCR (1336 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo
pGPL01TppropmrC	Región promotora del gen <i>pmrC</i> de YeO8 amplificada por PCR (881 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo
pGPL01TpprorcsC	Región promotora del gen <i>rscC</i> de YeO8 amplificada por PCR (443 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp ^R	Este trabajo
pGPL01pro/pxP	Región promotora del gen <i>lpxP</i> de YeO8 amplificada por PCR (1100 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01. Ap ^R	425
pGPL01Tppro/pxP	Derivado del plásmido pGPL01pro/pxP con un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>PstI</i> . Ap ^S , Tp ^R	Este trabajo
pPROBE'-gfp[LVA]	Plásmido que contiene el gen <i>gfp</i> sin su promotor. Usado para construir cepas indicadoras mediante la fusión transcripcional entre el promotor del gen de interés y el gen <i>gfp</i> . Contiene una cola LVA para disminuir la vida media de Gfp. Km ^R	372

Plásmido	Comentarios	Referencia
pPROBEYepro $pmrH$	Región promotora del operón $pmrHF IJKL$ de YeO8 amplificada por PCR (677pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI/SmaI</i> del plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Km ^R	Este trabajo
pPROBEYepro ugd	Región promotora del gen ugd de YeO8 amplificada por PCR (889 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Km ^R	Este trabajo
pPROBEYepro $pagP$	Región promotora del gen $pagP$ de YeO8 amplificada por PCR (1096 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Km ^R	Este trabajo
pPROBEYepro $phoPQ$	Región promotora del operón $phoPQ$ de YeO8 amplificada por PCR (509 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Km ^R	Este trabajo
pPROBEYepro $dacB$	Región promotora del operón $dacB-pmrAB$ de YeO8 amplificada por PCR (416 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Km ^R	Este trabajo
pSRFlhDCO8	Plásmido con la fusión transcripcional $flhDC::lucFF$. Usado para construir cepas indicadoras para el promotor $flhDC$ de YeO8. Cm ^R	46

Plásmido	Comentarios	Referencia
pINP41	pEP184 con <i>invΔ 412::phoA</i> . Plásmido suicida para construir cepas indicadoras para analizar los niveles de expresión de <i>inv</i> . Cm ^R	419
pDHS45	pFUSE con fusión transcripcional <i>yfp::lacZYA</i> . Plásmido suicida para construir cepas indicadoras para analizar los niveles de expresión de <i>yfpA</i> . Tet ^R , Cm ^R	Virginia Miller
pBAD30	Plásmido de medio-bajo número de copia. Usado en estudios de complementación o sobreexpresión. Plásmido de expresión inducible con arabinosa (<i>araC-P_{BAD}</i>). Ap ^R	220
pBAD <i>rovA</i>	Fragmento del gen <i>rovA</i> de YeO8 amplificado por PCR (500 pb) y clonado en el sitio <i>EcoRI</i> de pBAD30. Ap ^R	Este trabajo
pTM100	Plásmido movilizable (<i>mob</i> ⁺) de medio número de copia, derivado de pACYC184. Usado en estudios de complementación o sobreexpresión. Cm ^R , Tet ^R	359 359
pTMY <i>epagP</i>	El gen <i>pagP</i> de YeO8 amplificado por PCR (2020 pb) y clonado en el sitio <i>Scal</i> de pTM100. Tet ^R	Este trabajo
pTM/ <i>lpxR</i>	El gen <i>lpxR</i> de YeO8 sacado por <i>PvuII</i> del plásmido pGEMTCom/ <i>lpxR</i> y clonado en el sitio <i>Scal</i> de pTM100. Tet ^R	Este trabajo
pTM/ <i>lpxR</i> -FLAG	Fragmento de <i>lpxR</i> de YeO8 amplificado por PCR (1500 pb) con una cola FLAG y clonado en el sitio <i>Scal</i> de pTM100. Tet ^R	Este trabajo
pUC18R6KTmini-Tn7TKm	Mob ⁺ , Amp ^R , Km ^R	318

Plásmido	Comentarios	Referencia
pUC18R6KTmini-Tn7TKm- <i>pmrC</i>	El gen <i>pmrC</i> de YeO8 amplificado por PCR (<i>Vent</i> , 2400 pb) y clonado en el sitio <i>SmaI</i> de pUC18R6KTmini-Tn7TKm	Este trabajo
pTNS2	Plásmido con la transposasa	124
pCP20	λ cl857 (ts), <i>ts-rep</i> . Plásmido con la recombinasa Flp de levadura (FLP, <i>aka exo</i>). Replicación termosensible. Cm ^R , Ap ^R	119
pFLP2	Mob ⁺ , SacB ⁺ . Plásmido con la recombinasa Flp. Ap ^R	243
pFLP2-Tp	Derivado del plásmido pFLP2 con un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>Scal</i> . Tp ^R , Ap ^S	Este trabajo
pKD4	<i>OriRγ</i> . Km ^R , Ap ^R	149
pRV34	Gen <i>lucFF</i> clonado en el sitio <i>EcoRV</i> del plásmido pTM100. Cm ^R	Venho and Skurnik(no publicado)
pUC-4K	Contiene el casete de Km <i>Gene Block</i> (GB). Ap ^R , Km ^R	Pharmacia
pRK2013	mob+, tra+, plásmido autotransmisible. Usado para la movilización de plásmidos que no son autotransmisibles (plásmido facilitador en conjugaciones triparentales). Spc ^R Km ^R	159

Tabla 5. Cebadores utilizados en este estudio

Nombre cebador	Secuencia (5'→3')	Uso
YeO8ProvAf	ACAAATGTATATATACCGTCGATGC	Amplificar la región promotora de <i>rovA</i> de YeO8 para construir indicadora
YeO8ProvAr	CGCTTTGATCATAAATGGCTCG	Amplificar la región promotora del gen <i>rovA</i> de YeO8 para construir cepa indicadora
BCCP-1	GAGGAGAAATTA ACTATGAGGGG	Amplificar el gen <i>lucFF</i> de pRV34 para construir cepa indicadora
BCCP-2	TTACAATTTGGACTTTCCGCC	Amplificar el gen <i>lucFF</i> de pRV34 para construir cepa indicadora
YadAgenf	<u>ccc</u> aagcttgAACATAAATCGAATGCCCGTAG	Amplificar el gen <i>yadA</i> de YeO8 para comprobar la presencia de pYV en cepas de <i>Y. enterocolitica</i>
YadAgenr	gct <u>ctagag</u> CCTCTTCTATGGGAGGCGTTC	Amplificar el gen <i>yadA</i> de YeO8 para comprobar la presencia de pYV en cepas de <i>Y. enterocolitica</i>
YadAPf	<u>ccc</u> aagcttgCCTCGTCATTATTGGCAAATGC	Amplificar la región promotora del gen <i>yadA</i> de YeO8 para comprobar la presencia de pYV en cepas de <i>Y. enterocolitica</i>
YadAPr	<u>cggatccg</u> CCTTAAAGAAACCGTCGCGTG	Amplificar la región promotora del gen <i>yadA</i> de YeO8 para comprobar la presencia de pYV en cepas de <i>Y. enterocolitica</i>
cassette-F1	CGCGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Amplificar el casete de Km del plásmido pKD4
cassette-R1	CGCGGATCCCATGGGAATTAGCCATGGTCC	Amplificar el casete de Km del plásmido pKD4
DELTAmanUpF	CCTGCATTGTTACGTCGGTTTC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8
DELTamancUpR	<u>cggatccg</u> TGATGTGGCAAGTAGCGCAGC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
DEltamancdownF	<u>cggatccg</u> GCATGTAACAATCAAACCGGGAC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8
DeltamancdownR	CGCATCAATTACATGCCCTGC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8
CheckingupmanC	GCCAATAACAATTATCCCGCAG	Comprobar la construcción correcta del mutante <i>manC</i> en YeO8
CheckingdownmanC	TTCAATAAAATCCCGTTATGG	Comprobar la construcción correcta del mutante <i>manC</i> en YeO8
YeO8pmrFR	<u>cggatccg</u> GGATATTCACGCCGCTATTGC	Construcción del mutante <i>pmrF</i> en YeO8
YeO8pmrFF	<u>cggatccg</u> CAAACCCAGTTGATCGGTGC	Construcción del mutante <i>pmrF</i> en YeO8
YeO8PagPF	GGTGGTGTGACTGCGGCAC	Construcción del mutante <i>pagP</i> en YeO8
YeO8PagPR	TTCTCTCGCAGTCCCCTTCC	Construcción del mutante <i>pagP</i> en YeO8
YeO8BasupF2	TCGTATGGATCACGAGCAGAGC	Construcción del mutante <i>pmrAB</i> en YeO8
YeO8BasupR2	<u>cggatccg</u> AAGTCATGGATGAAGGGCCAG	Construcción del mutante <i>pmrAB</i> en YeO8
YeO8BasdownF	<u>cggatccg</u> GGAGAGTAACAACTATGCGCTTG	Construcción del mutante <i>pmrAB</i> en YeO8
YeO8BasdownR	CGCACCTTAGCCAAAGGCTC	Construcción del mutante <i>pmrAB</i> en YeO8
YeO8PhoPQupF	GGATATAAAGGATATCGCCAGG	Construcción del mutante <i>phoPQ</i> en YeO8
YeO8PhoPQupR	<u>cggatccg</u> GACGATGGGCCGGTATTCC	Construcción del mutante <i>phoPQ</i> en YeO8
YeO8PhoPQdownF	<u>cggatccg</u> GGAATTCATAATTTGGGATGC	Construcción del mutante <i>phoPQ</i> en YeO8

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
YeO8PhoPQdownR	GGTGGGCGGCAGCCGCCATG	Construcción del mutante <i>phoPQ</i> en YeO8
LpxRupF	CCTGAATTTAAAACCCCGAATG	Construcción del mutante <i>lpxR</i> en YeO8
LpxRupR	<u>cgggatcc</u> CGGCGGTTGAAGTATCGGATTGC	Construcción del mutante <i>lpxR</i> en YeO8
LpxRdownF	<u>cgggatcc</u> CGACAAGATATTTACTCCCCATCAGG	Construcción del mutante <i>lpxR</i> en YeO8
LpxRdownR	AATTCGATTCTTATTCTCGCCAC	Construcción del mutante <i>lpxR</i> en YeO8
YepmrCUPF1	CTTAAGCATACACAACCGGCAG	Construcción del mutante <i>pmrC</i> en YeO8
YepmrCUPR1	<u>cgggatcc</u> GTTGGTCTCAAACGCATTTTGC	Construcción del mutante <i>pmrC</i> en YeO8 y amplificar la región promotora del gen <i>pmrC</i> para construir cepas indicadoras
YepmrCdownF1	<u>cgggatcc</u> GCCATTCTTTATACTGATGCGATGC	Construcción del mutante <i>pmrC</i> en YeO8
YepmrCdownR1	TCGATACTTTCTAGCGCACAGG	Construcción del mutante <i>pmrC</i> en YeO8
YerscDUPF1	CACACAGTTGTTTGCCGATAAGC	Construcción del mutante <i>rcsD</i> en YeO8
YerscDUPR1	<u>cgggatcc</u> GTGTGGATCATGAACCTGGGCAC	Construcción del mutante <i>rcsD</i> en YeO8
YerscDdownR1	AGTGACAGCCAGCGCCAAAG	Construcción del mutante <i>rcsD</i> en YeO8
YerscDdownF1	<u>cgggatcc</u> GGAATTAAGTCATTAATCGGCAGATC	Construcción del mutante <i>rcsD</i> en YeO8
UphfqYeO8F	<u>cgggatcc</u> GAACCCGTTACGACGCAATG	Construcción del mutante <i>hfq</i> en YeO8
UphfqYeO8R	GCGTATTCCGCTGCTGGTGG	Construcción del mutante <i>hfq</i>

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
DownhfqYeO8F	<u>cggatcc</u> GGACGCTGAATAAAGCGCATTG	Construcción del mutante <i>hfq</i> en YeO8
DownhfqYeO8R	AAATAGTTGGTCAGCCGCATAG	Construcción del mutante <i>hfq</i> en YeO8
YopPUpF	AGCTGACAACCATCGCCGAG	Construcción del mutante <i>yopP</i> en YeO8
YopPUpR	<u>cggatcc</u> gggactcactatagggTCAGGATATTTATTGTT CGCCTG	Construcción del mutante <i>yopP</i> en YeO8
YopPDownF	<u>cggatcc</u> gggactcactatagggGGTGAAAATCCTTTACC CCACG	Construcción del mutante <i>yopP</i> en YeO8
YopPDownR	GGGGAAGAAGAACTGGCGATGC	Construcción del mutante <i>yopP</i> en YeO8
YeO8PpmrHR	<u>ggaattc</u> CTTGCTCTGCTGGCCGCAGTG	Amplificar la región promotora del operón <i>pmrHFIJKL</i> para construir cepas indicadoras
YeO8PpmrHF	<u>gggtacc</u> CAACTGTTGATTCTGAGGGCCTG	Amplificar la región promotora del operón <i>pmrHFIJKL</i> para construir cepas indicadoras
YeO8prougdF	AGCAGCATGTGCCACGCCTG	Amplificar la región promotora del gen <i>ugd</i> para construir cepas indicadoras
YeO8ProugdR	<u>ggaattc</u> CGGAGCATTGGCGCATCAAC	Amplificar la región promotora del gen <i>ugd</i> para construir cepas indicadoras
YeO8PProagPF	ATCGCATATACTGCGTGCCAG	Amplificar la región promotora del gen <i>pagP</i> para construir cepas indicadoras
YeO8ProPagPR	CTTCTTACGTAAACCTTCTTGG	Amplificar la región promotora del gen <i>pagP</i> para construir cepas indicadoras

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
YeProPhoPF	ATGGCGATATCTGGGGCATG	Amplificar la región promotora del operón <i>phoPQ</i> para construir cepas indicadoras
YeProPhoPR	<u>ggaattc</u> CGGTGGGCGGCAGCCGCATG	Amplificar la región promotora del operón <i>phoPQ</i> para construir cepas indicadoras
ProYedacBF	GCAAGATTTGCCCCATCAGG	Amplificar la región promotora del gen <i>dacB</i> para construir cepas indicadoras
ProYedacBR	<u>ggaattc</u> CTGCGCCATTTACCGTCATCG	Amplificar la región promotora del gen <i>dacB</i> para construir cepas indicadoras
YePropmrCF1	<u>ggaattc</u> CCTAAGGTAAAACAATGGCGAATC	Amplificar la región promotora del gen <i>pmrC</i> para construir cepas indicadoras
PROlpxRR	AAACCTTATAAGCTCTCCGACG	Amplificar la región promotora del gen <i>lpxR</i> para construir cepas indicadoras
PROLpxRF	<u>ggaattc</u> CATCAGACTGAGGGCGGGATG	Amplificar la región promotora del gen <i>lpxR</i> para construir cepas indicadoras
ProrcsCF1	<u>ggaattc</u> CAGAAGATGAAGATGCTGCTGACG	Amplificar la región promotora del gen <i>rscC</i> para construir cepas indicadoras
ProrcsCR1	CCGCAATATCACTGCTCGCAG	Amplificar la región promotora del gen <i>rscC</i> para construir cepas indicadoras
GeneLpxRF	AATCACGTTTTGGCCGCAAC	Complementar las cepas mutantes para el gen <i>lpxR</i>
GeneLpxRR	GCATTAATAAATTGATGGGCTTTG	Complementar las cepas mutantes para el gen <i>lpxR</i>
lpxRFtagging	AGAAATCAGTAGATGCGGATAAGC	Marcar la proteína LpxR con un epitopo FLAG

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
IpxRRFLAG	GACTACAAAGATGACGACGAGAAAACAAATGT TACAGTCCCTGTTATGTA	Marcar la proteína LpxR con un epitopo FLAG
PBAdRovAF	<u>gctctaga</u> GCCCTTACTTTGTAGTTGAATAATGTT	Complementar y sobreexpresar el gen <i>rovA</i> de YeO8 en <i>E.coli</i>
PBADRovAR	CGGAATTCGGTAGTTATGCTAGCACGC	Complementar y sobreexpresar el gen <i>rovA</i> de YeO8 en <i>E.coli</i>
YeO8glmSup	ATGCTGGCTACGGTGGTACG	Comprobar la inserción del transposón
YeO8glmSdown	ATCTTCTACACCGTGCCGCTAC	Comprobar la inserción del transposón
Ptn7L	ATTAGCTTACGACGCTACACCC	Comprobar la inserción del transposón
Ptn7R	CACAGCATAACTGGACTGATTC	Comprobar la inserción del transposón
Check lucFF	GGCGTATCTCTTCATAGCCTTATG	Comprobar la inserción correcta de fusiones transcripcionales
CheckYeO8propmrH	GATGAGCCATACACTGGCCTTG	Comprobar la inserción del P_{pmrH} de YeO8 en la cepa indicadora
CheckYeO8prougd	CAGTAACGCCGCCAAAATGC	Comprobar la inserción P_{ugd} de YeO8 en la cepa indicadora
CheckYeopropagP	TTATACTGTCCTATCCCGCTTTC	Comprobar la inserción del P_{pagP} de YeO8 en la cepa indicadora
CheckYeoprohoPQ	CCGAAGCAGTCCTCGGGCTG	Comprobar la inserción P_{phoPQ} de YeO8 en la cepa indicadora
CheckYeoprodacB	GCATTTTCTTTAAATCGCCATG	Comprobar la inserción del P_{dacB} de YeO8 en la cepa indicadora
IpxRreporter	GGGGTTTTAAATTCAGGCAGC	Comprobar la inserción del P_{IpxR} de YeO8 en la cepa indicadora

¹ Las regiones subrayadas y en letra minúscula corresponden a secuencias con dianas para enzimas de restricción: g[↓]gatcc (*Bam*HI), a[↓]agctt (*Hind*III), g[↓]aattc (*Eco*RI), ggtac[↓]c (*Kpn*I), t[↓]ctaga (*Xba*I).

Tabla 6. Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida de *lpxR*

Nombre cebador	Secuencia (5'→ 3')
MutN9AR	TGCTGATAAGGATAACGAAATACTACTATCAGC
MutN9AF	GATGATGCAGGTATTTTTCAACCAACAT
MUTD10AR	TTATGATAAGGATAACGAAATACTACTATCAGC
MUTD10AF	GCAGATGCAGGTATTTTTCAACCAACAT
lpxR D53AinvR	TGCACGATCTCCATCTGCATGACTATAT
lpxRD53AinvF	GATTATTCTCAGGGACTATTCTTAGGTT
lpxRD53FinvR	ACCACGATCTCCATCTGCATGACTATAT
MUTY33AR	TGCATCATCACGATCTCCATCTGCATGAC
MUTY33AF	TCTCAGGGACTATTCTTAGGTTATAGTCGAGAT
MUTS34AR	TGCATAATCATCACGATCTCCATCTGCATGAC
MUTS34AF	CAGGGACTATTCTTAGGTTATAGTCGAGAT
MUTG36AR	TGCCTGAGAATAATCATCACGATCTCCAT
MUTG36AF	CTATTCTTAGGTTATAGTCGAGATATT
MUTQ57AR	TGCTGCTATATGAACAGATAGTTGACTTG
MUTQ57AF	GATATTTACTCCCCATCAGGTATTAATAAAAGAC
MUTP62AR	TGCGGAGTAAATATCTTGTGCTATATGAAC
MUTP62AF	TCAGGTATTAATAAAAGACTACCAACTGCTGTAATAGGT
MUTF79AR	TGCAGCCCTGTCACCTATTACAGCAG
MUTF79F	AGTGCATATCTGCACACAGGAATTGAATGGAACTC
MUTQ118AR	TGCGACTTTTTGACCTCCAGCATCAGG
MUTQ118AF	AACAAAGCCCATCAATTTATTAATGCCGAAA

MUTH122AR	TGCGGCTTTGTT TTGGACTTTTTGACCTCC
MUTH122AF	CAATTTATTAATGCCGAAAAGTATCAAGC
MUTW133AR	TGCTGCTTGATACTTTTCGGCATTAAATAAATTG
MUTW133AF	GATGACCAAATCGAGAACCGCTACGGCTACACTGTT
SEQMUTLPXRF1	TATCGCATTATACGGCGCTC
SEQLPXRR1	GCAGATATGCACTAAAAGCCCTG
SEQMUTLPXRF2	CGCATCATCTATAGCCAAAGCTG
SEQMUTLPXRR2	CCAGAAATCCATATTTGGGGTG

ANEXO III



Tabla 8. Análisis *in silico* de la presencia de los genes implicados en modificaciones de lípido A en los genomas de *Y. enterocolitica* (O:8, O:3, O:9), *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*.

<i>gen</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>			<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
	O:8	O:3	O:9		
<i>dacB</i>	YE0424	Y11_36611	YE105_C0445	YPO3506	YPTB0470
<i>pmrA</i>	YE0423	Y11_36601	YE105_C0444	YPO3507	YPTB0469
<i>pmrB</i>	YE0422	Y11_36591	YE105_C0443	YPO3508	YPTB0468
<i>phoP</i>	YE1718	Y11_05611	YE105_C2452	YPO1634	YPTB2434
<i>phoQ</i>	YE1717	Y11_05601	YE105_C2453	YPO1633	YPTB2435
<i>lpxR</i>	YE3039	Y11_05741	YE105_C2442	-	-
<i>pmrC</i>	YE2150	Y11_08381	YE105_C2042	YPO2377	YPTB2291
<i>rscC</i>	YE1396	Y11_02651	YE105_C2723	YPO1217	YPTB1257
<i>rscD</i>	YE1398	Y11_02671	YE105_C2721	-	YPTB1259
<i>hfq</i>	YE0377	Y11_36121	YE105_C0398	YPO0373	YPTB0425
<i>pagP</i>	YE1762	Y11_06171	YE105_C2405	YPO1744	YPTB1622
<i>pmrF</i>	YE2191	Y11_07991	YE105_C2002	YPO2421	YPTB2329
<i>ugd</i>	YE2242	Y11_11051	YE105_C2285	YPO2174	YPTB2100
<i>rovA</i>	YE2144	-	YE105_C2048	YPO3944	YPYB2288

