



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
Facultat de Ciències
Departament de Biologia

TESIS DOCTORAL

Papel de la cadena O del
lipopolisacárido en la regulación
de factores de virulencia de
Yersinia enterocolitica.

Tesis doctoral presentada por
Catalina Maria Llompart Vázquez para optar al título de
Doctora en Biología

Palma de Mallorca, 2009

El Dr. José Antonio Bengoechea Alonso, como director de la Tesis titulada “Papel de la cadena O del lipopolisacárido en la regulación de factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica*”, realizada en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta y en la Fundación Caubet-CIMERA de les Illes Balears por Catalina Maria Llompart Vázquez, autoriza la presentación de la mencionada Tesis Doctoral puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Palma de Mallorca, 2009

Dr. José Antonio Bengoechea Alonso

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador otorgada por la *Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació del Govern de les Illes Balears* (2004/2008) y la ayuda del Fondo de Investigación Sanitaria (PI030801).

AGRAÏMENTS

Ara que arriba el moment de posar punt i final a aquesta Tesi, voldria fer arribar el meu agraïment a totes les persones que, d'una manera o altre, m'heu ajudat en aquest camí. S'acaba una etapa que ha estat molt important i positiva per a mi, i que ha resultat una experiència enriquidora en molts sentits...I tot això ha estat possible perquè he estat envoltada de gent que m'ha recolzat i animat en cada moment.

En primer lloc, agrair a la Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació del Govern de les Illes Balears la concessió de la beca predoctoral que m'ha permès realitzar aquesta Tesi. També vull expressar el meu agraïment a la gerència de l'Hospital Universitari Son Dureta i a la Fundació Caubet-CIMERA per totes les facilitats ofertes per al desenvolupament d'aquesta Tesi.

De manera especial vull fer constar el meu agraïment al meu director de Tesi, el Dr. José Antonio Bengoechea, per haver-me donat l'oportunitat de dur a terme la meva Tesi en el seu grup d'investigació i sobretot per la seva gran dedicació en el desenvolupament d'aquest projecte i en la meva formació. Per a mi és un exemple com a professional i com a persona, i em sento orgullosa de haver tingut l'oportunitat de treballar en el seu equip. A més, li vull donar les gràcies per saber treure el costat positiu de tot, per creure en mi i pel seu ajut i paciència en els meus moments de "llanto y rechinar de dientes".

Tota la gent del laboratori mereix una menció especial. A més, he tingut la sort de treballar en un grup d'investigació que al llarg de tots aquests anys s'ha fet cada vegada més gran...i tots i cada un dels qui hi heu format part heu fet que aquest camí hagi estat més planer, divertit i enriquidor. A en Micky, li vull agrair tot el que m'ajudares en els meus inicis al laboratori, per animar-nos a tots amb la teva manera de ser i per salvar-me quan ficava la pota. A na Vero, donar-li les gràcies per haver-me acompanyat des del primer dia fins al darrer en aquesta tasca, per ser sa meva "galleguiña" i per haver estat al meu costat en els moments bons i dolents. A sa meva "petita", na Camino, li vull agrair tantíssimes coses...des del primer dia que et vaig conèixer vares fer que tot a la feina fos més fàcil i divertit, sempre amb un somriure a la cara (encara que et demanés les coses mil milions de vegades). Hem compartit moltes coses, moltes confidències, rialles i bons moments, i em sent afortunada de tenir-te com a amiga. A na Catalina simplement agrair-te haver-me demostrat tantes vegades que ets una amiga incondicional, perquè sense demanar-te res sempre m'ho dones tot i perquè ha estat una gran ajuda poder comptar amb tu dins i fora del labo. A en David, en Pau Morey, en Pau Martí i en Quique ... vos trobaré molt a faltar!! Perquè

sou l'ànima del laboratori, perquè comptar amb gent com vosaltres ha fet que la feina hagi estat més fàcil i divertida i perquè vos heu encarregat de treure'm un somriure fins i tot en els pitjors moments... encara que sigui amb acudits dolents (ja sabeu a quin Pau li dic, no?). A en David i en Quique us vull donar especialment les gràcies per tot el que he après de vosaltres i per tot el que heu fet per mi en aquests darrers mesos, des de fer de psicòlegs fins a dissenyadors gràfics. A en Christian li agraeixo tot el seu interès i els molts detalls que ha tingut amb mi des de que va arribar al laboratori, sobretot sa meua "Yersinia-mascota". A ses "mamis" del laboratori, na Paloma i na Vicky, per fer que la feina de tots sigui molt més fàcil, per preocupar-vos de que tot funcionés bé al labo i per tantes coses que hem compartit entre experiments, cafès i berenars. També vull agrair a na Mari Pau i na Silvia tots els moments compartits en la seva estada al laboratori. A n'Antonio li agraeixo tots els seus ànims en l'etapa final de la Tesi. A n'Anna li vull agrair la paciència que té amb mi, perquè ha tingut la "mala sort" d'haver de compartir el meu caos, tant mental com de papers, en aquests darrers mesos, i sempre ho ha suportat amb un somriure...tant de bo pogués compartir més temps amb tu perquè em sembles una persona genial. I a tu Marieta del Mar, que seria del nostre labo sense la teua rialla matinerana, les teves cantades i ses nostres xerrades? Tens una energia contagiosa que m'ha ajudat a tirar endavant. Amb tu he après més del que creus i has estat sa meua "nina". Ara et tocarà posar-te al davant del grup "Yers", així que ànims!!, que vals molt. I, finalment, a na Junkal li vull agrair tot l'ajut i recolzament que m'ha dedicat aquests anys, per tot el que m'ha ensenyat, perquè la seva presència al laboratori ha estat molt enriquidora per mi i perquè sempre ha tingut un moment (o hores) per escoltar-me i donar-me una mà.

També vull donar les gràcies a tots els companys de feina de la meua primera etapa a Son Dureta. Dels inicis a la Unitat d'Investigació a Son Dureta en tenc un record entranyable. Des d'aquí vull fer arribar el meu agraïment per haver-me fet costat des del primer dia i per tots els bons moments compartits a na Mamen, na Carmen, en Pierola, n'Amanda, na Cati, na Mercedes, na Meri i a les meves primeres veïnes de laboratori, na Marta, na Maria i na Mariette. Agrair també a tots els membres del departament de Microbiologia de la UIB, als meus veïns del laboratori, na Patricia, na María, en Carlos i en Víctor, i a tots els companys de CIMERA, que sempre heu estat disposats a ajudar quan us he necessitat.

Als meus amics de sempre, na Manoli, na Cati, na Marta, en Joan Ramon, n'Armando, en Joan, en Joan Mir i en Gabi, simplement agrair-vos haver estat un dels meus pilars per no tornar-me boja en els moments més durs i sobretot per formar part de molts dels millors moments d'aquests anys de Tesi (rialles, sopars, vetllades,

festes, viatges, akelarres, bodes, es naixement de n'Aina...). Després de tot, esper que aquesta Tesi també la pugueu sentir un poquet vostra.

També a ses "bioloques" n'Antonia, na Marga, na Pepa i na Noemí us vull agrair els vostres ànims i recolzament. En molts moments heu estat de les poques persones que m'heu entès i heu fet que no em sentís un "bitxo raro".

A en Juanmi li he d'agrair tot. Ets la persona que més ha "patit" aquesta Tesi i et vull donar les gràcies per la teva paciència infinita, pel teu recolzament en els moments més difícils, per haver-te robat tantes hores, per fer que mai m'hagi sentit tota sola en aquesta tasca i per haver omplert la meva vida de bons moments i fer que aquests anys hagin estat tan especials per a nosaltres. I perquè sé que sempre et tenc al meu costat: GRÀCIES.

I finalment, vull dedicar unes línies d'agraïment a la meva família, que ara com sempre ha estat el meu suport incondicional. Als meus pares, perquè ho sou tot i us ho dec tot. Perquè sou el meu model a seguir i, sobretot, perquè em feis sentir molt orgullosa de tenir la família que tenc. A més, en aquests anys m'heu demostrat més que mai que, passi el que passi, sempre puc comptar amb vosaltres. A na Marieta, per ser tal com ets, tan divertida i tan buscaret. A més de ser sa meva germana, ets una persona molt especial per mi, com una llumeta a sa meva vida, i estar amb tu sempre m'anima. A s'Abuela, perquè encara que no ets aquí sé que sempre m'acompanyaràs en els moments que són importants per mi i et vull agrair haver-me inculcat responsabilitat i ganes de fer feina, valors que m'han ajudat molt en els moments més durs d'aquesta Tesi. Siguis on siguis, t'estimo. A es Padrí li he d'agrair haver estat la primera persona en animar-me a que fes la Tesi, quan ningú de la meva família acabava d'entendre perquè m'embarcava a un món com aquest. Suposo que sempre has sabut veure el que em fa il·lusió i has procurat que fos possible. Ah, i si no fos per ses boníssimes coques (famoses al laboratori) i dinarets que me prepares, les forces crec que no m'haurien bastat! A sa Padrina li vull agrair que hagi estat sempre fent-me costat, de manera senzilla, alegrant-se del meus avanços i desitjant el millor per mi, encara que sempre em demanis "però què és això que fas tu?" i no acabis d'entendre ben bé la meva feina. I al Tio Toni vull donar-li les gràcies per demostrar-me que hi és sempre que el necessit. Gràcies a tota la meva família per recolzar-me i estimar-me de manera incondicional.

Als meus pares, Pau i Catalina

A la meva germana, Maria Teresa

A en Juanmi

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ix
ABREVIATURAS	xv
INTRODUCCIÓN	1
1. La membrana externa y el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas	3
1.1. Estructura molecular y supramolecular del lipopolisacárido	3
1.2. Síntesis del lipopolisacárido.....	7
2. El género <i>Yersinia</i>	10
2.1. Características generales	10
2.2. Patogenicidad	11
2.3. Factores de virulencia.....	14
2.4. Estudios de genómica funcional en <i>Y. enterocolitica</i>	15
3. Factores de virulencia de <i>Y. enterocolitica</i>	17
3.1. Factores de virulencia codificados en el plásmido de virulencia pYV	17
3.1.1. YadA	18
3.1.2. El sistema de secreción tipo III Ysc.....	19
3.2. Factores de virulencia codificados en el cromosoma.....	29
3.2.1. El sistema de secreción tipo III del flagelo	29
3.2.2. El sistema de secreción tipo III Ysa.....	33
3.2.3. El sistema de secreción tipo II.....	35
3.2.4. Fosfolipasa A.....	36
3.2.5. Invasin	37

3.2.6. Ail	39
3.2.7. Ureasa.....	40
3.2.8. La isla de patogenicidad.....	41
3.2.9. El sistema Psp.....	42
3.2.10. La enterotoxina Y-STa	43
3.2.11. La cadena O del lipopolisacárido	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	55
1.1. Medios y condiciones de cultivo	55
2. Técnicas de biología molecular.....	57
2.1. Caracterización rápida del ADN plasmídico a partir de colonia	57
2.2. Métodos de transferencia genética.....	58
2.2.1. Transformación química con cloruro cálcico.....	58
2.2.2. Transformación por electroporación	59
2.2.3. Conjugación en medio sólido.....	60
3. Construcción de plásmidos y cepas.....	61
3.1. Construcción de cepas mutantes de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 8081	61
3.1.2. Construcción de los mutantes YeO8::pKNOCK-FlhDC y YeO8-R::pKNOCK-FlhDC por mutagénesis dirigida mediante recombinación en un punto	62
3.1.2. Construcción de los mutantes Δ sspABGB, Δ manCKm, Δ sspBKm, Δ clpXKm, Δ clpXPKm y Δ flhDC por mutagénesis dirigida mediante doble recombinación	62
3.1.2.1. Construcción del vector suicida pKNG- Δ sspABGB.....	62

3.1.2.2. Construcción de los vectores suicidas pKNG- $\Delta manCKm$, pKNG- $\Delta sspBKm$, pKNG- $\Delta clpXKm$ y pKNG- $\Delta clpXPKm$	62
3.1.2.3. Obtención de los mutantes YeO8- $\Delta sspABGB$, YeO8- $\Delta manCKm$, YeO8- $\Delta sspBKm$, YeO8- $\Delta clpXKm$ y YeO8- $\Delta clpXPKm$	65
3.1.2.4. Obtención de los mutantes YeO8- $\Delta manC$ y YeO8- $\Delta clpX$	66
3.1.2.5. Obtención del mutante YeO8- $\Delta flhDC$	67
3.1.2.6. Obtención de los dobles mutantes YeO8- $\Delta sspABGB-\Delta flhDC$, YeO8- $\Delta flhDC-\Delta manC$, YeO8- $\Delta flhDC-\Delta clpX$ y YeO8- $\Delta clpX-\Delta sspABGB$	68
3.2. Construcción de plásmidos para complementar las mutaciones en los genes u operones <i>sspAB</i> , <i>sspB</i> , <i>clpX</i> y <i>clpXP</i>	69
3.3. Construcción de un plásmido para sobreexpresar H-NS.....	70
4. Construcción de fusiones transcripcionales.....	70
4.1. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{virF}::cat$ y $P_{yopE}::cat$	70
4.2. Construcción de la fusión transcripcional $P_{hns}::lucFF$	71
4.3. Construcción de la fusión transcripcional $P_{rovA}::lucFF$	71
4.4. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{sspA}::lucFF$ y $P_{clpP}::lucFF$	72
4.5. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{sspA}::gfp$ y $P_{clpP}::gfp$	72
5. Medida de la actividad cloranfenicol acetiltransferasa	73
6. Medida de la actividad fosfatasa alcalina.....	74
7. Medida de la actividad luciferasa	75
8. Medida de la fluorescencia	76

9. Estudio de la expresión de H-NS en <i>Y. enterocolitica</i>	77
10. Secreción de Yops.....	77
11. Análisis de la secreción de Yops mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y tinción con Azul de Coomassie.....	79
12. Análisis de la citotoxicidad en células HeLa.....	79
13. Translocación de la proteína YopE en células HeLa.....	80
14. Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western Blot.....	81
15. Ensayo de motilidad.....	81
16. Estadística	82
RESULTADOS	83
1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA SE SECRECIÓN TIPO III Ysc EN UN MUTANTE DE <i>Y. enterocolitica</i> O:8 QUE NO EXPRESA LA CADENA O	85
1.1. La secreción de Yops disminuye en un mutante de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 que no expresa la cadena O	85
1.2. La expresión de <i>virF</i> y <i>yopE</i> está disminuida en un mutante de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 que no expresa la cadena O	87
1.3. Un mutante de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 que no expresa la cadena O no induce citotoxicidad en células HeLa	87
1.4. La sobreexpresión de <i>flhDC</i> se asocia con una menor secreción de Yops en <i>Y. enterocolitica</i> O:8.....	88
1.5. H-NS es un regulador positivo de la expresión de <i>flhDC</i> en <i>Y. enterocolitica</i> O:8	90
1.6. Un mutante de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 que no expresa la cadena O presenta niveles más altos de H-NS que la cepa silvestre	92
2. ESTUDIO DEL CIRCUITO DE REGULACIÓN QUE MODULA LA EXPRESIÓN DE <i>inv</i> Y <i>flhDC</i> EN UN MUTANTE DE <i>Y. enterocolitica</i> O:8 QUE NO EXPRESA LA CADENA O	95

2.1. La represión de <i>inv</i> en un mutante de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 que no expresa la cadena O es consecuencia de los altos niveles de FlhDC y no de variaciones transcripcionales de la expresión de <i>rovA</i>	95
2.2. Efecto de la proteasa ClpXP sobre la expresión de <i>inv</i> y <i>flhDC</i>	97
2.3. Relación entre SspA/SspB y la expresión de <i>inv</i> y <i>flhDC</i>	101
2.4. H-NS modula la expresión de <i>clpXP</i> y <i>sspAB</i> de <i>Y. enterocolitica</i> O:8	106
2.5. SspA/SspB participan en la regulación post-transcripcional de los niveles de H-NS en <i>Y. enterocolitica</i> O:8	106
DISCUSIÓN	109
1. La cadena O influye sobre la expresión del sistema de secreción tipo III Ysc	111
2. Expresión de <i>inv</i> en un mutante que no expresa la cadena O.....	116
3. Papel de ClpXP en la expresión de <i>inv</i> y <i>flhDC</i>	117
4. Papel de SspA/SspB en la expresión de <i>inv</i> y <i>flhDC</i>	120
5. Consideraciones finales.....	121
CONCLUSIONES	123
REFERENCIAS	127
ANEXO I	157
ANEXO II	173

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura del LPS de <i>E. coli</i>	4
Figura 2. Esquema de la estructura del LPS de <i>E. coli</i> K-12 y de sus mutantes rugosos.....	6
Figura 3. Esquema de la síntesis de la cadena O heteropolimérica (A) y homopolimérica (B)	9
Figura 4. Representación esquemática de las rutas de entrada y localización final de <i>Y. enterocolítica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> y <i>Y. pestis</i> en las infecciones humanas	14
Figura 5. El plásmido pYV de <i>Y. enterocolítica</i> 8081	17
Figura 6. Secreción de Yops por el inyectiosoma Ysc y translocación a través de la membrana de la célula eucariota.....	20
Figura 7. Representación esquemática del sistema de secreción tipo III Ysc de <i>Yersinia</i> (A) y micrografía de las agujas del inyectiosoma (B).....	23
Figura 8. Acción antifagocítica de las Yops.....	25
Figura 9. Inhibición de la respuesta inflamatoria	27
Figura 10. Elementos estructurales del sistema de secreción tipo III del flagelo.....	31
Figura 11. Dianas celulares y vías de señalización de los efectores translocados por el sistema de secreción tipo III Ysa de <i>Y.</i> <i>enterocolítica</i> biotipo 1B	34
Figura 12. Esquema del operón de la cadena O de <i>Y. enterocolítica</i> serotipo O:8.....	45
Figura 13. Esquema de la recombinación en un punto usando el vector suicida pKNOCK	61
Figura 14. Esquema de la construcción de los vectores suicidas para la obtención de mutantes por doble recombinación	63

Figura 15. Análisis de la expresión de Yops en el mutante que no expresa la cadena O	86
Figura 16. Análisis de la translocación de Yops y efecto citotóxico en un mutante que no expresa la cadena O	88
Figura 17. Análisis de la secreción y translocación de Yops en un mutante de la cadena O que no expresa <i>flhDC</i>	89
Figura 18. Análisis del efecto de H-NS sobre la secreción de Yops.....	91
Figura 19. Análisis de la expresión de H-NS en el mutante que no expresa la cadena O	92
Figura 20. Análisis de la expresión de <i>inv</i> en los mutantes YeO8- Δ <i>manC</i> y YeO8- Δ <i>flhDC</i> - Δ <i>manC</i>	96
Figura 21. Análisis de la motilidad en los mutantes YeO8- Δ <i>clpX</i> y YeO8- Δ <i>clpXP</i>	98
Figura 22. Análisis de la transcripción de <i>flhDC</i> en los mutantes YeO8- Δ <i>clpX</i> y YeO8- Δ <i>clpXP</i>	98
Figura 23. Análisis de la traducción de <i>inv</i> en los mutantes YeO8- Δ <i>clpX</i> y YeO8- Δ <i>clpXP</i>	99
Figura 24. Análisis de la transcripción de <i>rovA</i> en los mutantes YeO8- Δ <i>clpX</i> y YeO8- Δ <i>clpXP</i>	100
Figura 25. Análisis de la expresión de <i>inv</i> en los mutantes YeO8- Δ <i>manC</i> y YeO8- Δ <i>flhDC</i> - Δ <i>manC</i>	100
Figura 26. Análisis de la expresión de <i>inv</i> y <i>flhDC</i> en los mutantes YeO8- Δ <i>sspABGB</i> y YeO8- Δ <i>sspBKm</i>	102
Figura 27. Análisis de la motilidad en los mutantes YeO8- Δ <i>sspABGB</i> y YeO8- Δ <i>sspBKm</i>	103

Figura 28. Análisis del efecto de la mutación de <i>sspAB</i> y <i>sspB</i> sobre la expresión de <i>rovA</i>	103
Figura 29. Análisis del efecto de la mutación de <i>sspAB</i> y <i>sspB</i> sobre la expresión de <i>clpP</i>	104
Figura 30. Estudio de la expresión de <i>inv</i> y <i>flhDC</i> en el doble mutante <i>YeO8-ΔclpX-ΔsspABGB</i>	105
Figura 31. Estudio del nivel de expresión de H-NS	107
Figura 32. Modelo molecular del circuito compuesto por la cadena O, <i>sspAB</i> , <i>clpXP</i> , H-NS, <i>flhDC</i> e Inv en <i>Y. enterocolitica</i> O:8	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo y composición.....	56
Tabla 2. Cebadores utilizados en este estudio	159
Tabla 3. Cepas de <i>Y. enterocolitica</i> y <i>E. coli</i> utilizadas en este estudio.....	163
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio	167

ABREVIATURAS

Agua d.o.i.	Agua desionizada y purificada por ósmosis inversa
Ap	Ampicilina
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CCCP	Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona
Cm	Cloranfenicol
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
GFP	Del inglés "green fluorescent protein"
HeLa	Célula epitelial de carcinoma cervical humano Henrietta Lacks
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanolsulfónico
IP-Ysa	Isla de patogenicidad Ysa
IVET	Del inglés " <i>in vivo</i> expression technology"
kb	Kilobase
Kdo	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico
Km	Kanamicina
LB	Medio Luria Bertani
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	MAP quinasa

MKK	Quinasa de MAPK
MOPS	Ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico
pb	Par de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”)
PIPES	Ácido piperazina-N,N"-bis (2)-etanosulfónico
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonil
Psp	Del inglés “phage shock protein”
PVDF	Polivinilideno fluorado
pYV	Plásmido de virulencia de <i>Yersinia spp.</i>
R	Rugoso
Ra	Rugoso superficial
Re	Rugoso profundo
rpm	Revoluciones por minuto
S	Liso
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacríamida con SDS
Sm	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
TCA	Ácido tricloroacético
Tc	Tetraciclina
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
URF	Unidades relativas de fluorescencia
URL	Unidades relativas de luz

INTRODUCCIÓN

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

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por tener 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) (136, 205). 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 y supramolecular del lipopolisacárido

La molécula de LPS consta de tres partes: el lípido A, el núcleo y la cadena O.

La estructura química del lípido A expresado por *Escherichia coli* (**Figura 1**) 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 miristato (C14) y laureato (C12). 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 y la composición del disacárido. En el caso de *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' (124). 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* (254). Otras

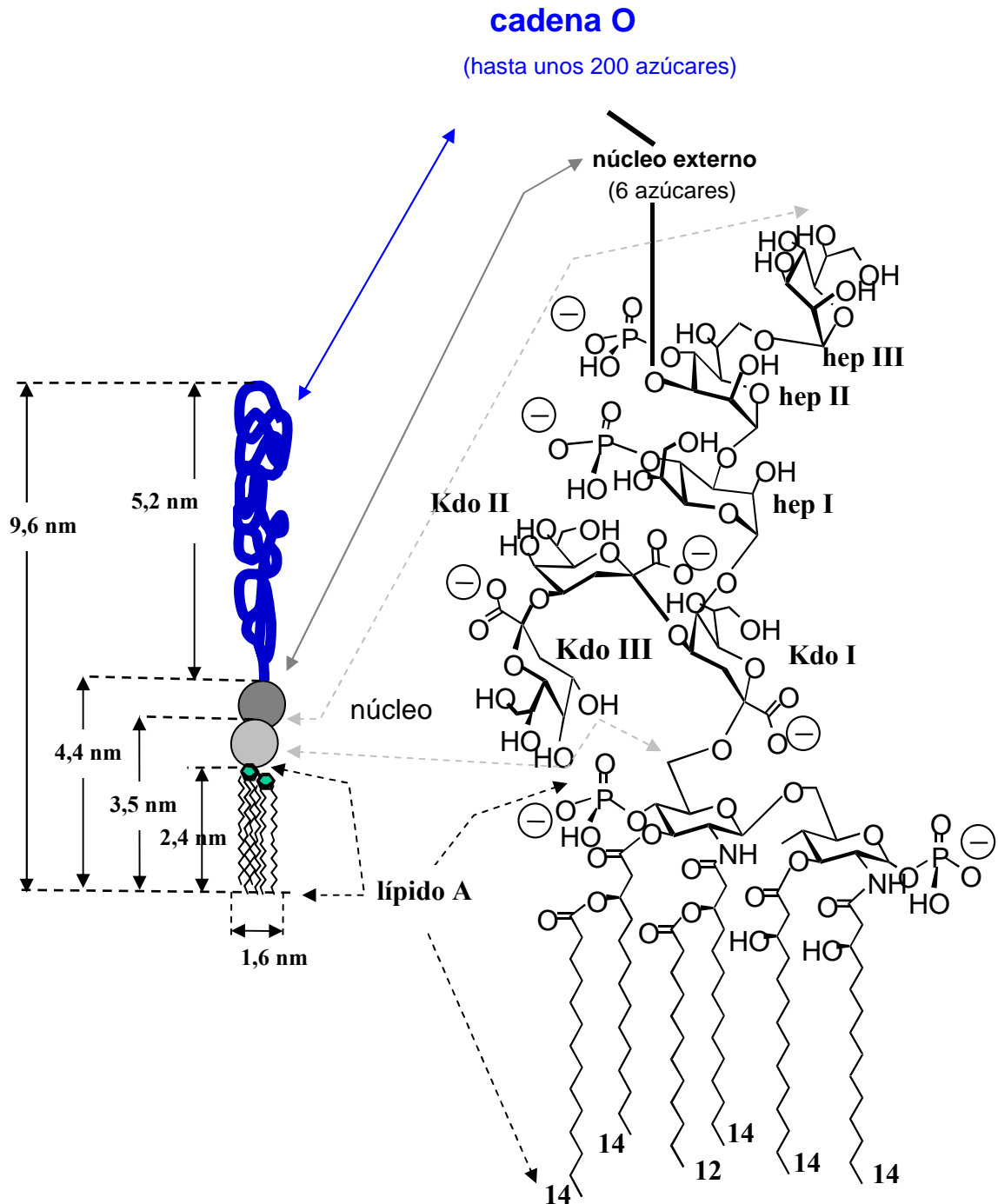


Figura 1. Estructura del LPS de *E. coli*. A la izquierda se presenta un modelo esquemático del LPS con las secciones principales y sus dimensiones. Tomada de: Moriyón y colaboradores, 2002. "Host reaction against Gram negative bacteria: The LPS case. En: J.P. Gorvel (ed.). Intracellular pathogens in membrane interactions and vacuole biogenesis. Landes Bioscience Publishers, Georgetown, Texas".

bacterias, como *Brucella* y *Bartonella*, poseen un ácido graso inusual: 27-OH-C18 (36). En cuanto a la composición del disacárido, algunas bacterias como *Nitrobacter*, *Brucella* y *Legionella* poseen 2,3-dideoxi-2,3-diamino-D-glucosa (GlcN3N) en lugar de GlcN2N (389). También existen variaciones en cuanto al grado de fosforilación. Así, *Rhizobium etti*, *Francisella* y *H. pylori* expresan un lípido A monofosforilado debido a la acción de una fosfatasa (199, 373, 382). 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. Algunas de estas modificaciones consisten en sustituciones de laureato por palmitato, hidroxilaciones de un grupo miristato, deacilaciones y/o la adición de fosfoetanolamina (pEtN), aminoarabinosa y palmitato (C16) al lípido A (290, 290).

Unido al lípido A se encuentra el núcleo. Éste es un oligosacárido que, a su vez, se divide en núcleo interno y núcleo externo. El núcleo interno está unido al lípido A y está formado por ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo) y heptosas (Hep). Los residuos Kdo presentan cargas negativas en el grupo carboxi y las heptosas a menudo están modificadas con grupos fosfato. Esta área densa de cargas negativas, junto con las cargas negativas del lípido A, constituye un lugar de unión de cationes divalentes y también de poliaminas, como la putrescina, la cadaverina, la espermina y la espermidina (225). 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 y grupos fosfatos contribuye a crear cierta heterogeneidad entre las moléculas de LPS presentes incluso dentro de un mismo cultivo bacteriano (216).

La cadena O es la región del LPS más expuesta al medio externo, por lo que sus características son esenciales para la supervivencia de la bacteria en diferentes ambientes. 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. Existen cadenas O heteropoliméricas y homopoliméricas. Las cadenas heteropoliméricas 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 azúcar dando lugar a un patrón de migración característico en forma de mancha.

El LPS descrito previamente, que posee núcleo y cadena O completos se denomina LPS liso (S). Se denomina de esta manera por el aspecto que tienen las colonias de bacterias que contienen este tipo de LPS. La pérdida de la cadena O, o de la cadena O y secciones del núcleo, genera colonias bacterianas con morfología rugosa y el LPS expresado por las bacterias se denomina LPS rugoso (R) superficial y profundo respectivamente (**Figura 2**).

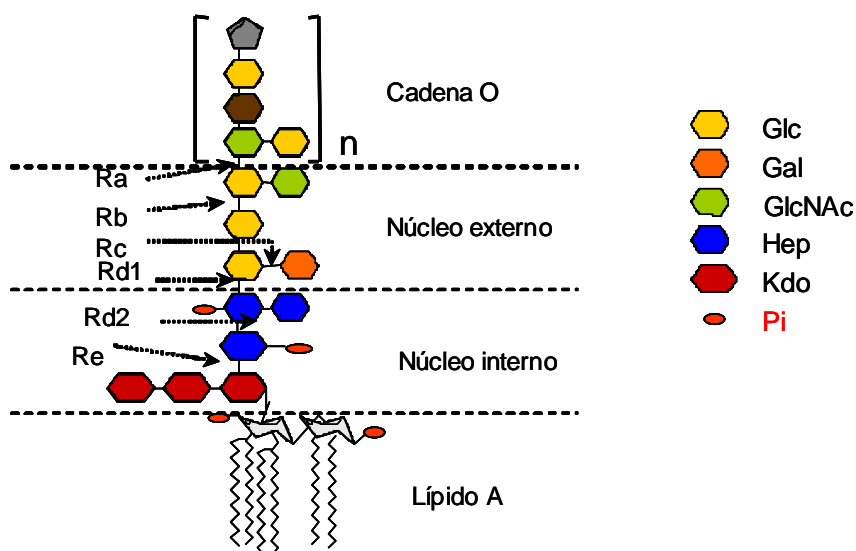


Figura 2. Esquema de la estructura del LPS de *E. coli* K-12 y de sus mutantes rugosos. Se representan esquemáticamente las estructuras desde rugoso superficial (Ra) hasta rugoso más profundo (Re).

1.2. Síntesis del LPS

Los genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis del lípido A se encuentran dispersos en el genoma bacteriano. Las enzimas implicadas en la síntesis del lípido A han sido identificadas y sus correspondientes genes han sido clonados y expresados en primer lugar en *E. coli* (290). El lípido A se sintetiza en la cara citoplasmática de la membrana interna. En su biosíntesis actúan de forma secuencial nueve enzimas (290). La vía comienza con la adición de 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 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 y la Kdo transferasa añade dos moléculas de Kdo generándose la molécula (Kdo)₂-lípido IV_A (58). Los últimos pasos de la síntesis concluyen con la formación de un LPS hexaacilado (59). Así, en primer lugar, se incorpora una molécula de miristato (C14), proceso catalizado por la aciltransferasa MsbB, y posteriormente una molécula de laureato (C12), proceso mediado por la aciltransferasa HtrB (82, 83). 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°C (73).

Como se ha descrito en el apartado 1.1., existen bacterias Gram negativas que tienen un lípido A con una estructura distinta a la presente en *E. coli*. A pesar de estas diferencias, las principales enzimas de la vía de síntesis del lípido A parecen funcionar de la misma manera y los cambios estructurales encontrados se explicarían por la existencia de enzimas adicionales (290).

La mayor parte de los genes implicados en la síntesis del núcleo en las bacterias Gram negativas se encuentran organizados en el operón *waa*. Así, en la síntesis del núcleo intervienen heptosiltransferasas que se encuentran en la cara citoplasmática de la membrana interna y añaden residuos de heptosa activados al (Kdo)₂-lípidio IV_A para completar el núcleo. Una vez completada la molécula lípido A-núcleo, se transloca a la cara periplasmática de la membrana interna.

En la biosíntesis de la cadena O heteropolimérica 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) (290). La síntesis comienza con la unión de un primer residuo glucosídico al und-P en un proceso catalizado por la galactosiltransferasa (WbaP) o la N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (WecA) según cual sea el primer azúcar de la cadena O, galactosa o N-acetilglucosamina, respectivamente (320). 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 3A**).

En el caso de las cadenas O homopoliméricas el proceso de síntesis es diferente (**Figura 3B**) (290). En primer lugar, se completa el polímero con residuos glucosídicos. A continuación, se transporta a la cara periplasmática por una proteína transportadora de la familia ABC. La longitud de la cadena viene determinada por la acción combinada de las glicosiltransferasas y la proteína Wzm (388).

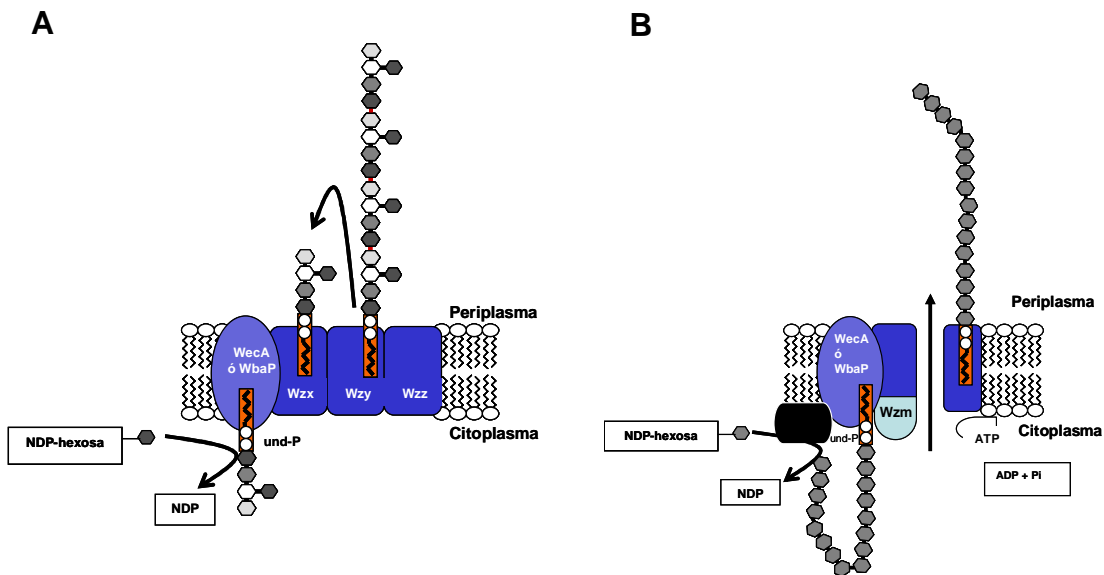


Figura 3. (A) Esquema de la síntesis de la cadena O heteropolimérica. **(B)** Esquema de la polimerización de la cadena O homopolimérica.

Así pues, por lo general el transporte de las cadenas O heteropoliméricas al espacio periplásmico está mediado por Wzx y el de las cadenas O homopoliméricas por transportadores tipo ABC. No obstante, *Klebsiella pneumoniae* serotipo O:12 y *Serratia marcescens* O:4 presentan cadenas O heteropoliméricas (con dos monosacáridos) que son translocadas a través de la membrana interna por transportadores ABC (189, 317).

Tras la síntesis del polisacárido, tanto si es un heteropolisacárido como un homopolisacárido, la ligasa WaaL lo transfiere a la molécula lípido A-núcleo. Finalmente, una vez formada la molécula completa de LPS, el complejo proteico Imp/RlpB transloca el LPS a la membrana externa (395).

2. 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* (28, 30, 31, 56, 241, 359, 360, 384). Únicamente las 3 primeras especies son patógenas para el hombre. 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* (14). 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*.

2.1. Características generales

Como miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, 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 rango amplio 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 peritricos (266). 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.

Al igual que para otras enterobacterias, 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 genómica (29). Achtman y colaboradores (1) han propuesto que *Y. pestis* es un clon derivado, hace 1500-2000 años, de *Y. pseudotuberculosis*. Skurnik y colaboradores (350) han sugerido, tras comparar la región génica que codifica la cadena O de *Y. pseudotuberculosis* O:1b y la región crítica 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 años (288). 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*.

2.2. Patogenicidad

Mientras que todas las cepas de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* son patógenas, sólo lo son algunas cepas de *Y. enterocolitica*. Las cepas patógenas de *Yersinia* pueden dividirse en cepas 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. Este grupo está comprendido por 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:8 (72). Aunque otros factores aún desconocidos pueden estar involucrados en el fenotipo de alta virulencia, una de las principales diferencias entre las cepas de *Yersinia* de alta y de baja patogenicidad es que éstas últimas no 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 organismo (68).

De las 3 especies patógenas humanas del género, *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, produciendo una respuesta intensa que se traduce en la aparición de bubas o adenopatías inflamatorias (de ahí el nombre de peste bubónica) (**Figura 4**). 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 4**). 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 humano (65).

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 (40, 217, 381). 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 atraviesa la pared intestinal a través de las células M llegando al tejido linfoide (placas de Peyer) donde induce una respuesta inflamatoria (152). 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 microabcesos monoclonales (152, 340) (**Figura 4**).

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 con diarrea. En adultos, cursa como una infección intestinal, que 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 hemocromatosis (65). En el caso de la infección por *Y. pseudotuberculosis*, se producen septicemias con relativa frecuencia, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (65).

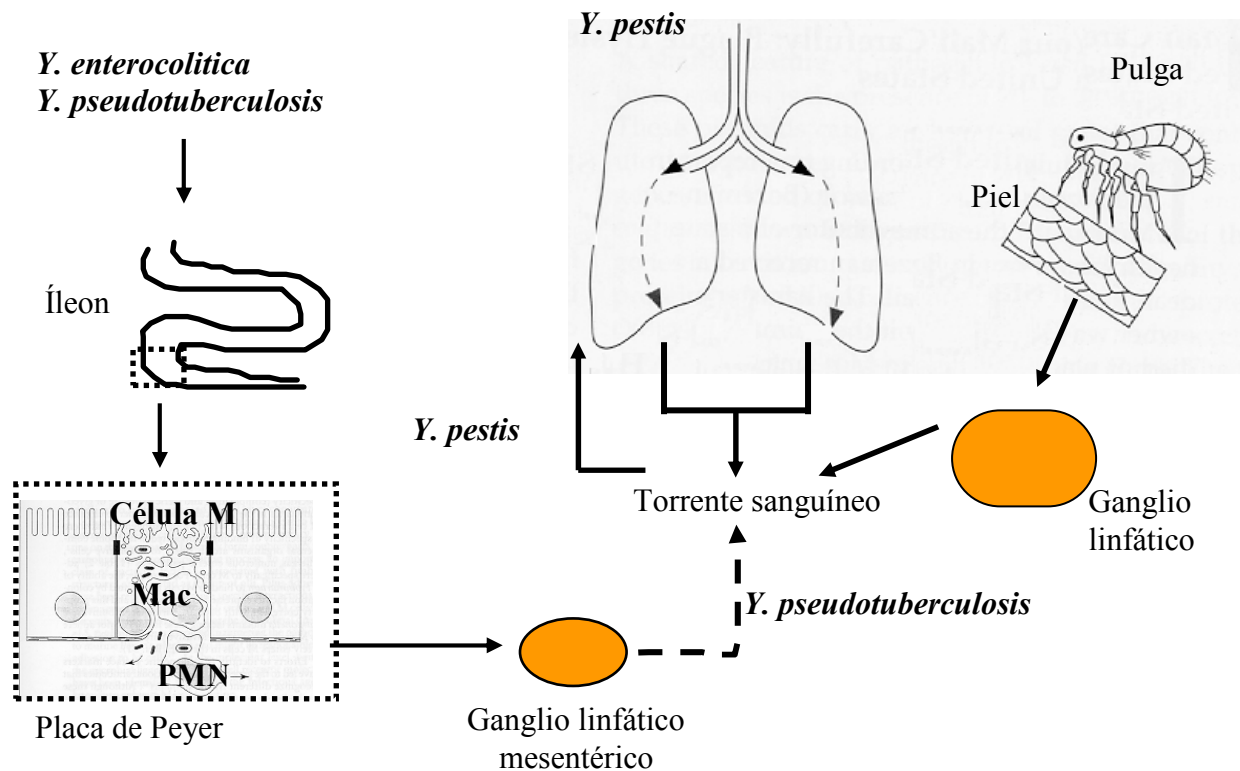


Figura 4. Representación esquemática de las rutas de entrada y localización final de *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis* en las infecciones humanas. (PMN, leucocitos polimorfonucleares; Mac, macrófago).

Cabe señalar que, aunque la replicación de *Yersinia* en el interior del huésped es principalmente extracelular, hay cada vez más evidencias de que las tres especies de *Yersinia* patógenas en humanos 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 (289, 410).

2.3. Factores de virulencia

Las tres especies patógenas de *Yersinia* tienen ciclos de vida bifásicos durante los cuales la expresión génica se adapta a diferentes ambientes. 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 (143, 364).

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 (“*Yersinia* adhesin A”) y Yops (“*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 el sistema de secreción tipo III (SSTT) Ysc, codificado en el mismo plásmido, que transloca directamente las proteínas al citoplasma de la célula huésped (90, 94, 286). Una vez allí, estas proteínas actúan como factores de virulencia, bloqueando numerosas vías de señalización de la célula diana (365), 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) (127, 356).

2.4. Estudios de genómica funcional en *Y. enterocolitica*

Las técnicas IVET (“*in vivo* expression technology”) y STM (“signature-tagged mutagenesis”) permiten identificar los genes cuya expresión es importante para la virulencia o el crecimiento bacteriano en modelos experimentales *in vivo*. Estas técnicas han sido utilizadas para identificar una colección de genes que promueven o están implicados en el proceso de infección de *Y. enterocolitica*.

En el estudio realizado por Darwin y colaboradores (98) empleando STM se identificaron genes, tanto cromosómicos como codificados en el plásmido pYV, implicados en la supervivencia y virulencia de *Y. enterocolitica* en el modelo de infección oral de ratón. Algunos de estos genes están implicados en la síntesis de componentes de la membrana externa, en la respuesta a estrés o en la captación de nutrientes, mientras que otros no presentan homólogos en otras bacterias y/o su función es aún desconocida. Es destacable que, en *Y.*

enterocolitica, la expresión del homólogo del gen *pspC* ("phage shock protein C") de *E. coli* es necesario para la supervivencia de la bacteria durante el proceso de infección cuando el SSTT Ysc está activo y funcional (98, 99).

Por otra parte, en *Y. enterocolitica* se han realizado dos estudios empleando IVET para identificar tanto aquellos genes que se activan en la fase inicial de infección, como los que se expresan en la fase sistémica de la misma (143, 403). En el primer caso los ratones se infectaron oralmente, mientras que en el segundo caso los ratones se infectaron intraperitonealmente. Prácticamente no se encontró solapamiento entre los genes que se expresan en la fase inicial y aquellos expresados en la fase sistémica de la infección (143, 403).

3. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Y. enterocolitica*

3.1. Factores de virulencia codificados en el plásmido de virulencia pYV

El plásmido pYV de *Y. enterocolitica* 8081 tiene unas 70 kb (**Figura 5**). Dicho plásmido de virulencia no es conjugativo, aunque sí contiene vestigios de genes de transferencia (180).

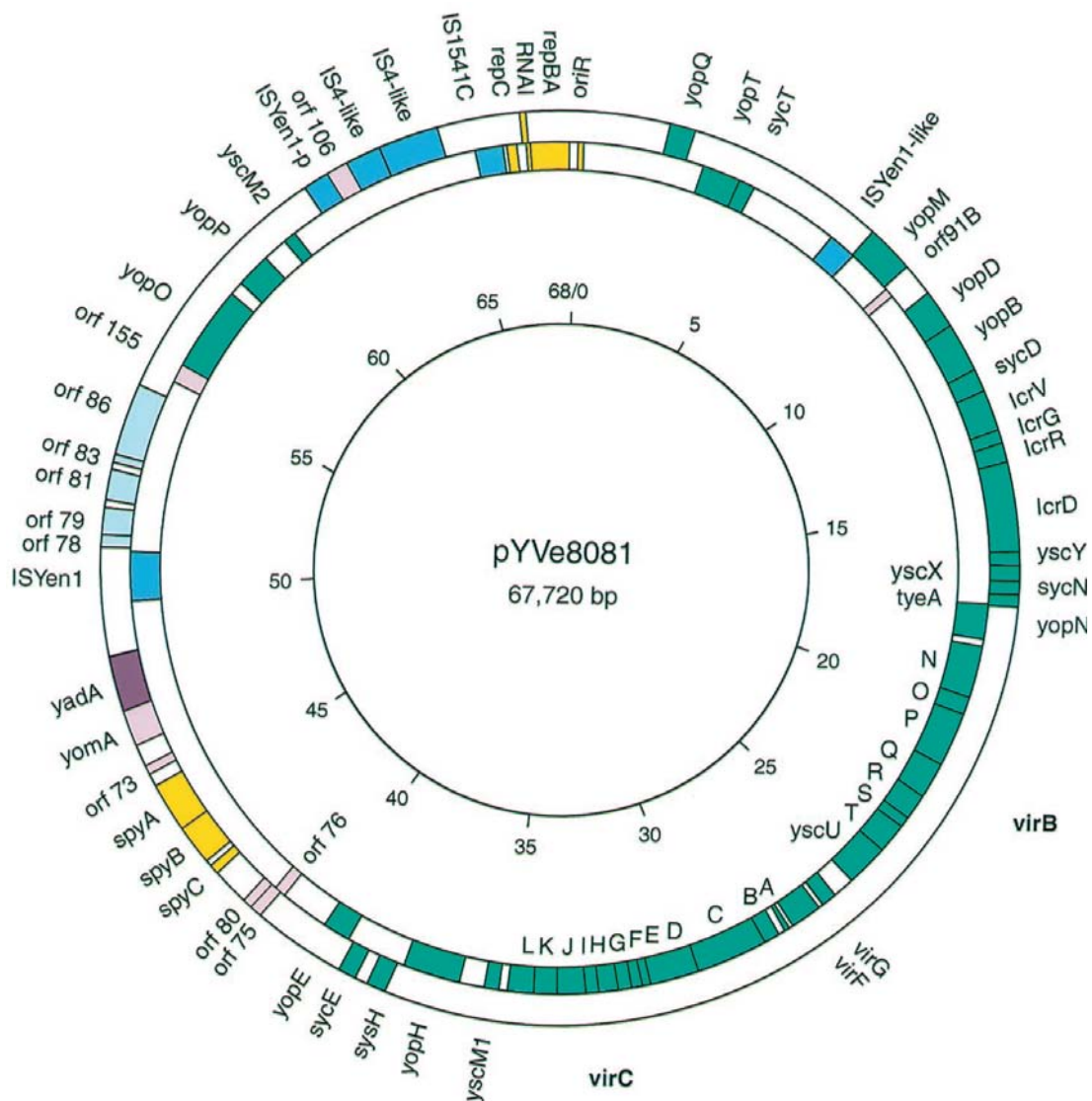


Figura 5. El plásmido pYV de *Y. enterocolitica* 8081. Mapa en el que se muestran los genes más significativos, los elementos IS (cajas en azul oscuro) y las regiones de replicación y partición (cajas amarillas). El círculo interior muestra la escala en kb. Amablemente cedida por Roggenkamp A. y colaboradores, 1995 (303).

3.1.1. 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* (379). No obstante, YadA sólo está implicada en la virulencia de *Y. enterocolitica* (4, 92). Así, un mutante *yadA* de *Y. enterocolitica* presenta una menor capacidad para colonizar el íleon de ratones infectados por vía oral o intraperitoneal (198, 280). En *Y. pestis* el gen *yadA* está mutado y no se expresa (311, 355).

La expresión de *yadA* está regulada por el activador transcripcional VirF (214, 351), codificado en el propio plásmido de virulencia. Dicha expresión es máxima a 37°C y no se induce por debajo de 30°C (51, 197). Al contrario de lo que ocurre con otros genes regulados por VirF, la expresión de *yadA* no es dependiente de Ca²⁺ (51, 343, 348).

Por otra parte, YmoA (“*Yersinia* modulator A”) también modula la expresión de *yadA* (93). YmoA es una proteína de bajo peso molecular (8 kDa) que pertenece a la familia de proteínas asociadas al nucleoide implicadas en la regulación de la expresión de diversos factores de virulencia en diferentes proteobacterias (229). En *Yersinia*, *ymoA* es un gen cromosómico y su mutación resulta letal en la cepa de *Y. enterocolitica* 8081 (121). Cabe señalar que la acción de YmoA parece depender de su unión a H-NS, otra importante proteína asociada al nucleoide (120, 264).

YadA forma estructuras homotríméricas (148, 226) u homotetraméricas (174) en la membrana externa de la bacteria. Estas estructuras recubren la superficie de la bacteria y le confieren características hidrofóbicas (174, 209, 233, 269). La estructura de YadA consta del extremo N-terminal seguido por el cuello y una parte peduncular que termina en el extremo C-terminal situado 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 (301, 366, 368). El extremo C-terminal es crucial para la estabilidad, oligomerización y anclaje de la molécula YadA a la superficie celular.

El papel de YadA como factor de virulencia en *Y. enterocolitica* está asociado a 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 (162, 183, 186, 231, 249, 349). Aunque no contribuye de manera importante en el inicio del proceso de infección (116, 280, 349), YadA es el principal factor de adhesión una vez la bacteria ha atravesado el epitelio intestinal, mediando la adherencia a células epiteliales (163), células fagocíticas profesionales (302) y proteínas de la matriz extracelular (122, 131, 331, 332). 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 (332, 333, 368), la laminina o la fibronectina. Esto permite a la bacteria adherirse a la submucosa intestinal y al mucus. La unión al colágeno mediada por YadA es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8 (368). Por otra parte, en el modelo de artritis reactiva en rata, la unión específica de YadA a las fibras de colágeno es fundamental para el desarrollo de la enfermedad (148, 149, 344).

En *Y. enterocolitica*, YadA es el factor más importante en la mediación de la resistencia al suero de este patógeno (20, 38, 46, 270, 284, 285). YadA se une al factor H, lo que impide la activación de la vía alternativa del complemento (79, 131, 285, 302), y al regulador C4bp, tanto de la vía clásica como de la vía de las lectinas del complemento. De esta manera, YadA evita la formación del complejo de ataque en la membrana externa de *Y. enterocolitica* (285), la opsonofagocitosis y la lisis bacteriana (204).

También se especula que YadA contribuye a la persistencia de la bacteria en las placas de Peyer gracias a su actividad antifagocítica (165, 307), pudiendo ser importante para que se de una adecuada inyección de Yops en células fagocíticas diana (45, 165, 233, 280, 309, 310, 348).

3.1.2. El sistema de secreción tipo III Ysc

El SSTT es un mecanismo que usan diversas bacterias Gram negativas para secretar proteínas efectoras al medio extracelular, o bien para inyectarlas en las membranas o el citosol de células eucariotas (91, 140). Uno de los SSTT

mejor estudiados es el sistema Ysc que comparten las tres especies patógenas del género *Yersinia*.

El SSTT Ysc está codificado en el plásmido de virulencia pYV y consta de cuatro componentes básicos: (i) el aparato de secreción tipo III formado por proteínas Ysc, (ii) las proteínas Yop efectoras (“*Yersinia* outer protein”), (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.

La secreción y translocación de los efectores Yop se desencadenan por el contacto íntimo entre la bacteria y una célula eucariota (**Figura 6**). La secreción también puede inducirse artificialmente *in vitro* creciendo las bacterias a 37°C en un medio rico pero deficiente en iones Ca^{2+} , lo cual origina la liberación masiva de Yops al medio de cultivo (245). Recientemente se ha descrito que se puede inducir la secreción de Yops creciendo las bacterias en un medio con baja concentración de sales y calcio a 26°C (400). Por tanto, factores ambientales distintos a la temperatura pueden influir en la regulación de este SSTT.

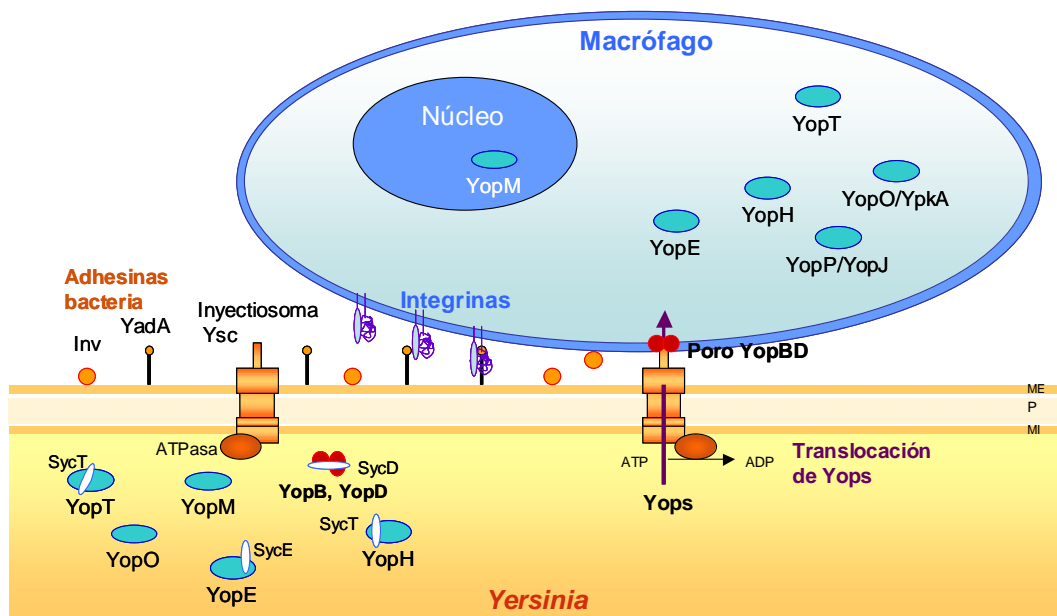


Figura 6. Secreción de Yops por el inyectosoma Ysc y translocación a través de la membrana de la célula eucariota. La señal que desencadena la secreción de Yops es el contacto íntimo con la célula eucariota, el cual está mediado por la interacción de las adhesinas y las integrinas de la membrana externa de la bacteria con la superficie de la célula huésped. (ME, membrana externa; P, peptidoglicano; MI, membrana interna). Adaptado de: Cornelis G. R., 2002 (90).

La transcripción de los genes *ysc* y *yop* está regulada por la temperatura siendo VirF el activador transcripcional que controla este proceso (91, 214, 351). Además, se ha demostrado que el grado de enrollamiento de la cromatina también modula la expresión de los genes *ysc* y *yop* (304, 305). A su vez, *virF* sólo se transcribe a 37°C y su expresión está modulada por la proteína tipo histona YmoA, codificada en el cromosoma y que inhibe la expresión de *virF* a temperatura ambiente (91, 93). Por otra parte, FlhDC, reguladores de la síntesis del flagelo, también inhiben la expresión de *virF* a través de FliA (44, 176).

Estructura y composición del aparato de secreción Ysc

El aparato de secreción del SSTT Ysc está compuesto por aproximadamente 25 proteínas y su estructura macromolecular consta de dos partes diferenciadas: el inyectiosoma y el aparato de translocación. El inyectiosoma abarca toda la envoltura bacteriana y termina con una estructura en forma de aguja que se expande hacia el exterior de la bacteria. Por su parte, las proteínas que forman el aparato de translocación son secretadas por el inyectiosoma y se asocian con la membrana de la célula huésped, donde parece que facilitan la translocación de las proteínas efectoras al citosol celular.

A. El inyectiosoma

El inyectiosoma permite la translocación de proteínas desde el citosol bacteriano al citosol de la célula huésped en un solo paso (89). Consta de tres estructuras diferenciadas (**Figura 7A**): (a) un dominio citoplasmático, (b) un canal transmembrana formado por proteínas de las membranas interna y externa, y (c) una estructura externa denominada “aguja” (47).

(a) Dominio citoplasmático

Es una estructura que sobresale de la membrana interna hacia el citosol bacteriano. Parece estar formada por las proteínas YscQ, que forman un anillo en la base de la estructura del inyectiosoma, y por YscN (393) (**Figura 7A**). Esta última es una proteína citoplasmática con función

ATPasa y que, probablemente, genera energía para el proceso de secreción.

Se ha propuesto que YscL podría ser la proteína que une este dominio citoplasmático con el canal transmembrana puesto que interacciona tanto con YscQ como con YscN (357).

(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 7A**).

Existe un conjunto de 8 a 10 proteínas que forman un núcleo altamente conservado entre todos los SSTT. Estas proteínas se localizan en las membranas de la envoltura bacteriana o bien en el citoplasma asociadas de manera laxa a la membrana. En *Yersinia* las que se conocen son:

- YscC: es una secretina localizada en la membrana externa, donde forma un par de estructuras en forma de anillo (210). YscW es una lipoproteína auxiliar necesaria para la inserción adecuada de YscC en la membrana externa (64, 210).
- YscJ es una lipoproteína que podría actuar de conector del aparato de secreción a través del periplasma (109).
- YscR/S/T parecen formar una estructura en forma de canal en la membrana interna (5).
- YscU y YscV podrían constituir la varilla y/o interaccionar con la membrana interna (10, 27).
- YscO e YscP parecen ser los componentes más externos del aparato de secreción (275).
-

(c) Aguja extracelular

Es una estructura extracelular alargada, rígida y hueca, que está unida al cuerpo basal (**Figuras 7A y 7B**). Se cree que a través de esta estructura se translocan/secretan las proteínas efectoras.

En *Yersinia*, la aguja está formada por la polimerización de monómeros de la proteína YscF que son secretados por el propio aparato de secreción Ysc (173).

La longitud de la aguja está regulada. Así, Journet y colaboradores (192) 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, señalizando la interrupción de la exportación de YscF una vez alcanzada la longitud de la estructura madura. El hecho de que la longitud de la aguja esté regulada indica que es un parámetro físico importante para su función. Además, parece que la longitud de la aguja ha sido ajustada evolutivamente en relación con las dimensiones de otras estructuras de la superficie de la célula huésped (255).

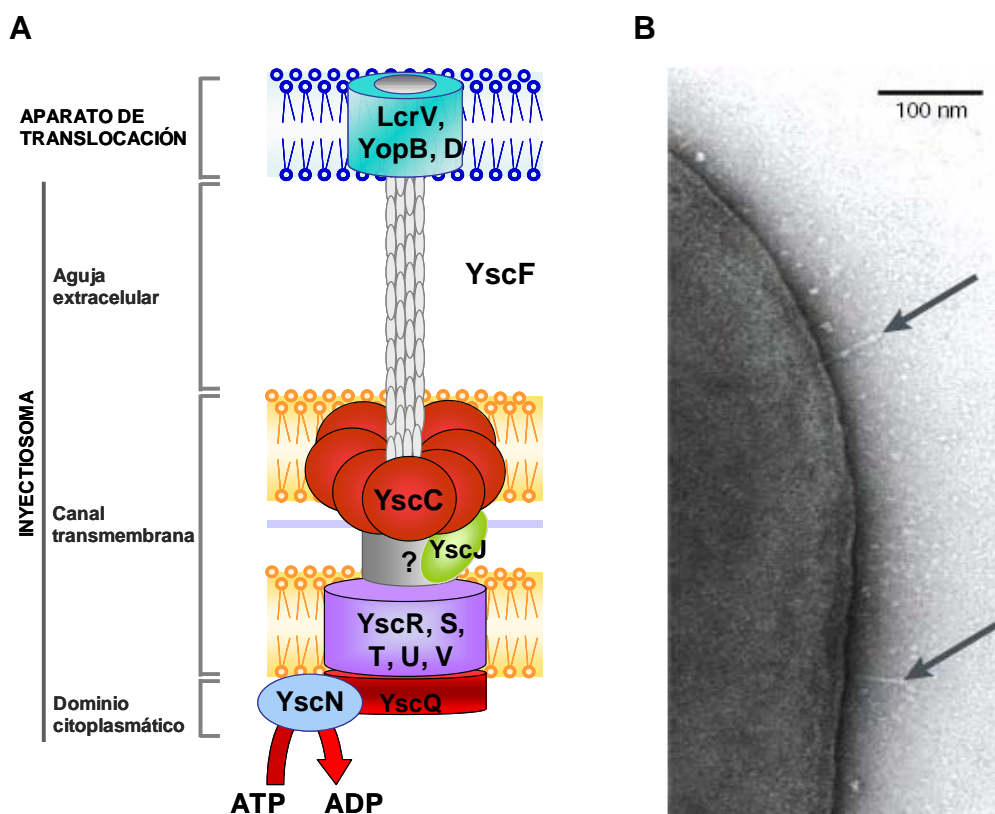


Figura 7. A. Representación esquemática del sistema de secreción tipo III Ysc de *Yersinia*. Adaptado de: Tampakaki A. P., 2004. (369). **B.** Micrografía tomada por microscopía electrónica de las agujas del inyectiosoma que sobresalen de *Y. enterocolitica* E40. Amablemente cedida por Cornelis G.R., 2002 (88).

B. El aparato de translocación

La translocación sólo ocurre en puntos de contacto directo entre el patógeno y la célula diana. YopB, YopD y LcrV son las tres proteínas que forman el canal a través del cual el inyectiosoma mantiene el contacto con la membrana plasmática de la célula huésped (89, 175) (**Figura 7A**). La evidencia disponible indica que YopB, YopD y LcrV interaccionan para formar el poro por el cual atravesarán las distintas Yops. Además, parece que estas tres proteínas ya forman el canal antes de que se dé el contacto con la célula huésped (282, 324).

Por otra parte, YopN es una de las proteínas secretadas por el inyectiosoma que parece actuar como tapón del aparato de translocación (232), impidiendo la secreción de proteínas efectoras tanto en presencia de calcio como en ausencia de contacto entre la bacteria y la célula eucariota (76). Aunque no se conocen bien los mecanismos moleculares que intervienen en esta regulación, YopN parece interaccionar con los componentes del canal de translocación (232).

Tipos y funciones de las proteínas Yop efectoras

Se han caracterizado seis proteínas efectoras en *Y. enterocolitica*: YopE, YopH, YopM, YopP, YopO y YopT (92). Muchas de sus dianas celulares son componentes que influyen en la inmunidad innata del huésped. Las Yops translocadas al interior de la célula huésped alteran procesos básicos de la célula eucariota, como la transducción de señales, la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico de membrana, la expresión de citoquinas y la muerte celular. Todo esto hace posible que *Yersinia* se multiplique extracelularmente y persista en el tejido linfoide.

A. Acción sobre el citoesqueleto

El citoesqueleto es una de las principales dianas de las Yops. 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

(145,146) y leucocitos polimorfonucleares (147,148). Las Yops que afectan al citoesqueleto actúan sobre las proteínas de la familia Rho GTPasas (RhoA, Rac-1 y Cdc42), las cuales son esenciales para el control de la dinámica del citoesqueleto (149-152). 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 8**).

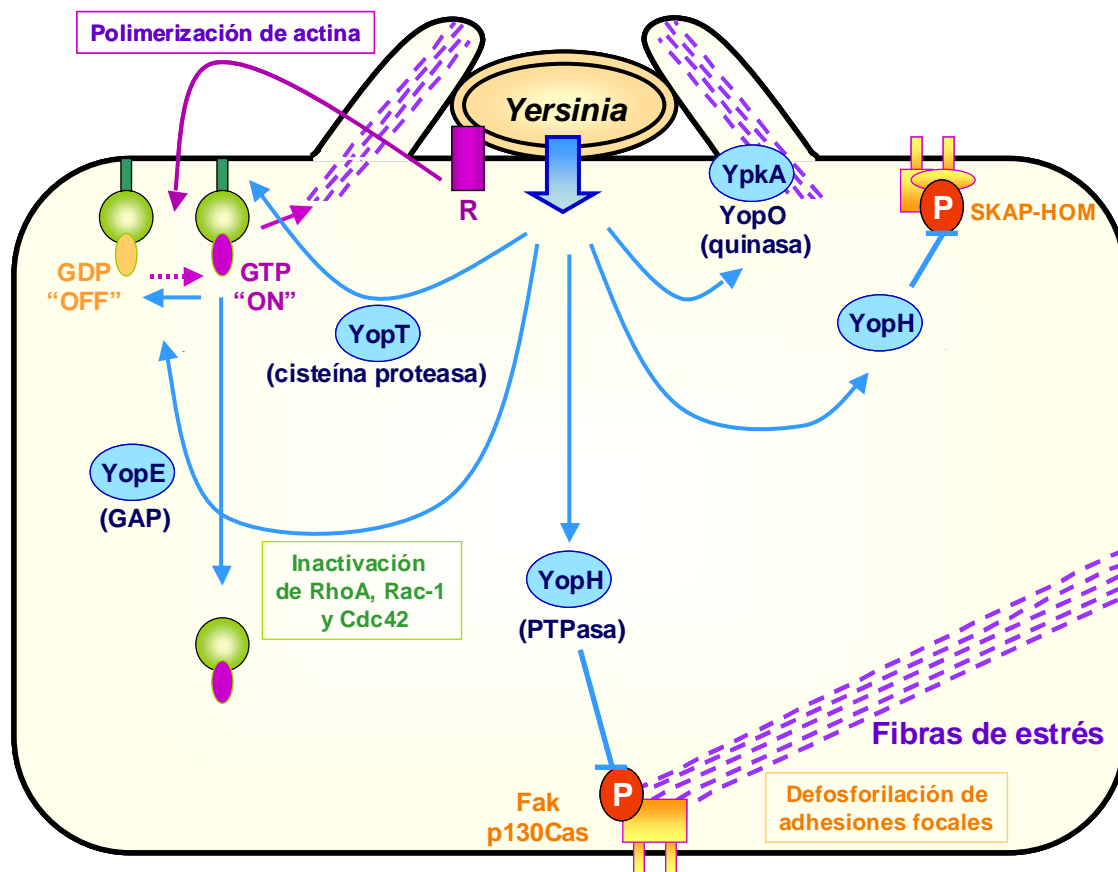


Figura 8. Acción antifagocítica de las Yops. Tras el contacto de la bacteria con el receptor del fagocito (R), se desencadena una cascada de señalización y los miembros de la familia Rho (RhoA, Rac-1, Cdc42) promueven la polimerización de actina. YopE hace que disminuya la expresión de Rac-1, Cdc42 y 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 interactúa 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. Adaptado de: Cornelis G. R., 2002 (90).

YopE: Es una proteína con actividad GAP (proteína activadora/aceleradora de GTPasas). Estas proteínas inactivan las Rho GTPasas (RhoA y Rac-1) al estimular la hidrólisis de GTP (41). Esto hace que se altere la estructura de los filamentos de actina y se inhiba la fagocitosis por macrófagos (308, 309, 358, 378). La desactivación de las Rho GTPasas 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 hace que se inhiba la maduración de la prointerleuquina-1 β en macrófagos (329). Se sabe que YopE interactúa con la chaperona específica SycE, que es necesaria para su liberación y translocación. Una vez translocada, YopE se localiza en la región perinuclear de las células de mamíferos (211).

YopH: Es una PTPasa (fosfotirosina fosfatasa) que inhibe la capacidad fagocítica de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (281, 358). YopH actúa defosforilando las adhesiones focales, impidiendo la señalización intracelular (42, 157).

YopT: Es una cisteína proteasa que elimina el grupo prenilo presente en GTPasas como RhoA, Rac-1 o Cdc42 (335), lo cual hace que la GTPasa se libere de la membrana y sea inactiva. Su función en la virulencia es redundante a la de YopE, pues también provoca un efecto citotóxico en las células epiteliales y la disrupción de las fibras de estrés del citoesqueleto de actina (3, 87).

YopO: Es una serina/treonina quinasa que se une a las GTPasas RhoA y Rac-1. Se activa por contacto con la actina. YopO impide que la bacteria sea fagocitada actuando sobre las integrinas 1 β (151, 287). Recientemente se ha demostrado que YopO fosforila el residuo Ser47 del mediador de procesos celulares G α q, lo cual impediría su acción en múltiples procesos celulares (261).

B. Acción sobre las vías de señalización inflamatorias

El segundo punto de acción de las Yops efectoras es el bloqueo de la respuesta inflamatoria (YopP y YopH) (**Figura 9**).

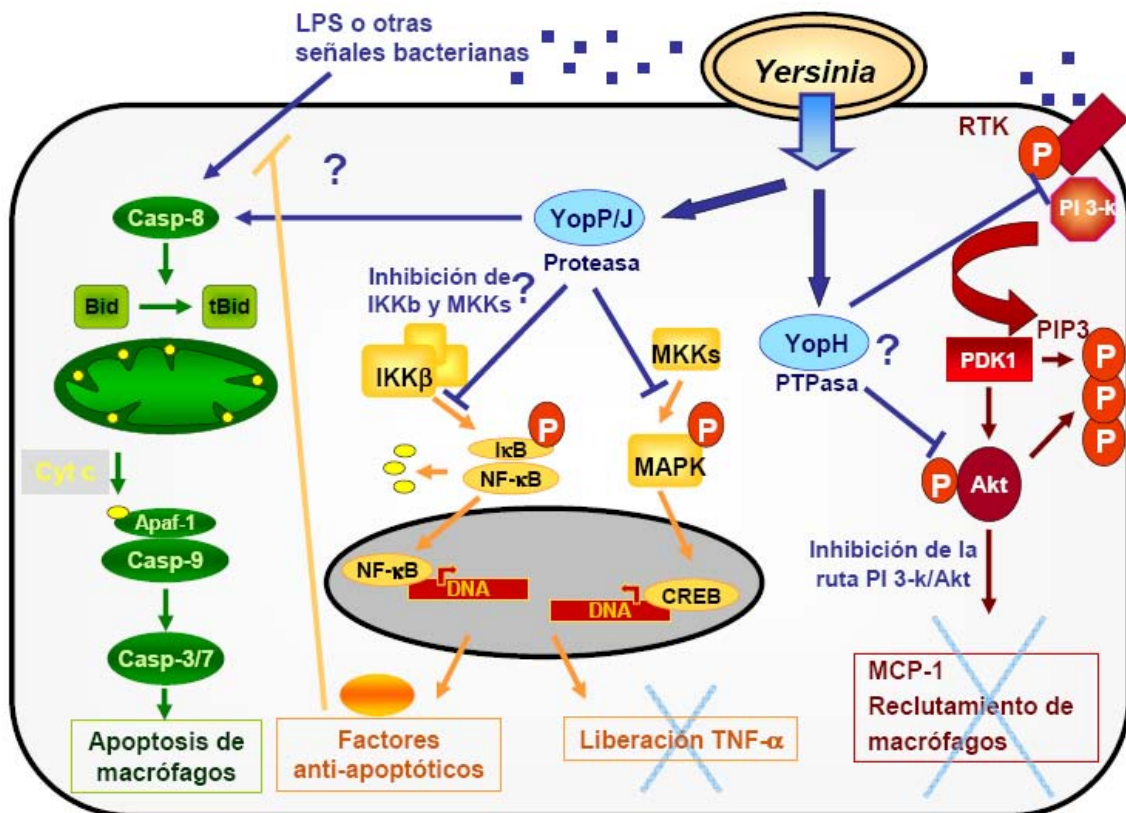


Figura 9. Inhibición de la respuesta inflamatoria. YopP se une y bloquea la quinasa $I\kappa B\beta$ (IKK β), la cual inhibe la fosforilación y degradación de I κ B, el inhibidor de NF- κ B. Esto a su vez previene la migración del factor de transcripción NF- κ B al núcleo. La ausencia de NF- κ B en el 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 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., 2002 (90).

YopP: Es una serina/treonina acetiltransferasa que altera la respuesta inflamatoria de la célula huésped reduciendo la liberación de las citoquinas proinflamatorias [TNF α en macrófagos (49) e IL-8 en células epiteliales y endoteliales (107)]. Todo ello es consecuencia de la inhibición de la activación de las vías de señalización de las MAP quinastas (49, 313) y de NF- κ B (49).

Además, YopP induce la apoptosis de macrófagos como consecuencia tanto de la inhibición de la vía NF- κ B como de la activación de la vía de la caspasa 3 (107). Finalmente, YopP contrarresta la inmunidad adaptativa induciendo la apoptosis de células dendríticas (123).

YopH: Además de bloquear la fagocitosis, 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 infección (325).

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 TNF α y de IFN γ , contrarrestando así el desarrollo de la respuesta inmune del huésped (60).

YopM: No se conoce su función, aunque se ha visto que es importante para la virulencia de *Y. enterocolitica* en ratón (50). Por otro lado, estudios *in vitro* indican que YopM se localiza en el núcleo de la célula huésped, donde puede que influya en la transcripción génica (24, 326).

Señal de secreción de las Yops

Los efectores del SSTT carecen de señales clásicas de secreción y existe cierta controversia sobre la naturaleza de esta señal. Se determinó que son necesarios un mínimo de 15 residuos del extremo aminoterminal para la secreción de Yops (11, 358). No obstante, la falta de similaridad entre las secuencias aminoterminales de los diferentes efectores hace que sea dudosa la naturaleza proteica de la señal (369). En otros estudios se ha propuesto que, al menos para algunas Yops, la señal de secreción se localiza en la región 5' del ARNm, de manera que las Yops serían traducidas a la vez que secretadas por la bacteria (12). Sin embargo, estudios cinéticos ponen en duda la señalización por parte del ARNm puesto que la respuesta antifagocítica de la bacteria debe ser muy rápida. Así, los datos sugieren, al menos en el caso de YopE, que es en el extremo aminoterminal de la proteína donde reside la señal

de secreción (223). Actualmente, la tendencia es considerar que la señal de secreción reside en la proteína en lugar de en el ARNm. No obstante, esto no excluye la posibilidad de que la secreción sea cotraduccional en estadios de infección más tardíos (293).

Chaperonas

Las Yops requieren chaperonas para que su secreción sea eficiente (383). Estas chaperonas se denominan Sycs y son pequeñas proteínas ácidas citosólicas. No se conoce su función exacta pero se ha propuesto que podrían prevenir el plegamiento de la proteína (362) o bien conferir una señal de secreción tridimensional a la proteína a la que asisten (39). Además, pueden estar implicadas en la organización de la secreción de Yops de manera que se secreten en un orden determinado (53, 396).

Algunas proteínas efectoras son escoltadas por chaperonas específicas, que normalmente están codificadas por un gen localizado cerca del que codifica la proteína a la que asisten. Este es el caso de SycE, SycH, SycT y SycN (222, 274). Existen otras chaperonas que no son tan específicas (274). Así, SycD ejerce como chaperona para YopB y YopD (262, 383). Los datos indican que SycD podría prevenir la asociación prematura entre YopB, YopD y LcrV (262, 383).

3.2. Factores de virulencia codificados en el cromosoma

3.2.1. 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 (5, 228, 404). 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 (177).

El SSTT del flagelo se requiere para exportar las proteínas que forman el flagelo a la superficie de la bacteria (228), aunque también secreta proteínas

que intervienen en las interacciones bacteria-huésped (404). Un ejemplo lo constituye la fosfolipasa A (YpIA), una proteína involucrada en la virulencia y no en la motilidad (400). Además de YpIA, el SSTT del flagelo también secreta otras proteínas denominadas Fops (“flagellar outer proteins”), cuya identidad y función aún se desconoce (404). La secreción *in vitro* de YpIA y del resto de Fops por el SSTT del flagelo ocurre al crecer la bacteria a 26°C en un medio con baja concentración de sales (404). Además, la expresión de FliA es necesaria para que se de dicha secreción (404)

Por otra parte, la síntesis del flagelo confiere a la bacteria motilidad tipo “swimming” y tipo “swarming” (405). El papel de dicha motilidad en la patogenicidad de *Yersinia* no está claro. Young y colaboradores (402) demostraron que la motilidad “swimming” permite que *Yersinia* migre a las células huésped e inicie el contacto, aunque no es esencial para la invasión de las mismas.

Estructura y regulación de la biosíntesis del flagelo

La estructura del flagelo consta de tres componentes principales: (i) el cuerpo basal, estructuralmente parecido al aparato de secreción tipo III, (ii) el gancho y (iii) el filamento (**Figura 10**). Como se ha explicado anteriormente, *Y. enterocolitica* presenta motilidad únicamente en un rango de temperatura de 21 a 29°C (266). En cambio, la temperatura no controla la expresión de todos los genes que forman parte del operón del SSTT del flagelo.

Al igual que en *E. coli* y *S. enterica*, 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 (8, 78, 227). El operón *flhDC* (genes tipo I) codifica 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. Además FlhDC tampoco interviene en la regulación mediada por la temperatura de los genes del flagelo (194, 405). Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heterotetramérico que activa la transcripción del operón *flhBAE* (genes tipo II) (218). Los genes tipo II codifican las proteínas estructurales y

acesorias del cuerpo basal, los componentes del gancho y las proteínas reguladoras FliA (σ^{28}) y FlgM (125, 181, 196). 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 flagelina (178). La expresión del operón *flhBAE* no está modulada por la temperatura (125), pero sí la expresión de *fliA*, que sólo se transcribe a temperaturas inferiores a 30°C (194, 195, 198). FliA es un factor sigma necesario para la transcripción de todos los genes tipo III (176, 194, 219, 267), de algunos operones tipo II (220) y del gen que codifica el factor anti-sigma FlgM (75). Entre los genes tipo III se encuentran los del operón *fleABC*, que codifica la flagelina, el gen *ylpA*, que codifica una fosfolipasa, y los que codifican componentes del motor del flagelo y proteínas quimiotácticas (195, 196).

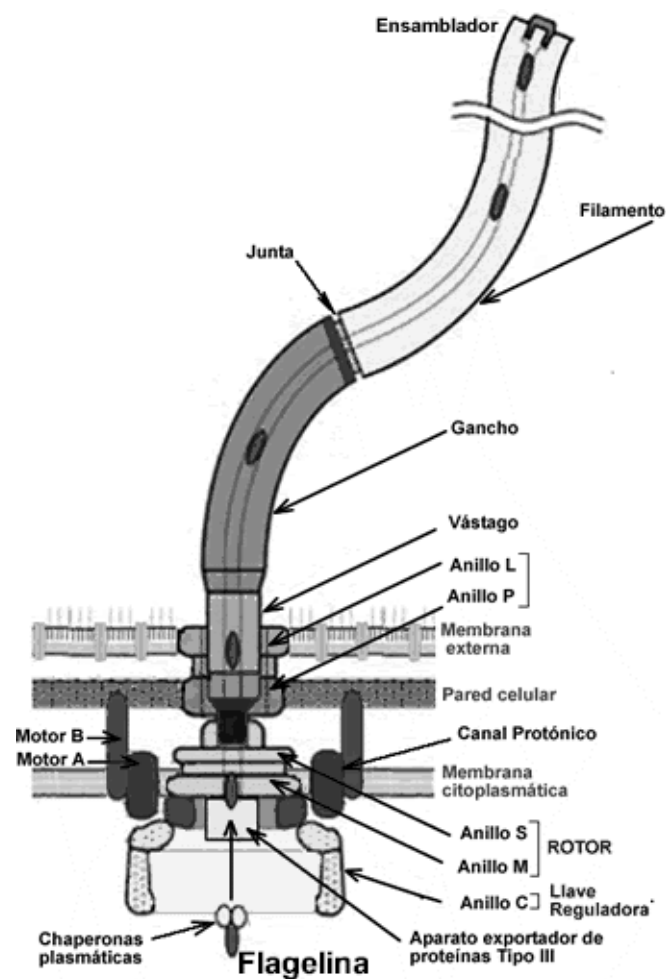


Figura 10. Elementos estructurales del sistema de secreción tipo III del flagelo.

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 (238, 252). Por consiguiente, la represión de la expresión de flagelina a 37°C debe ser uno de los factores que contribuyen a la pobre respuesta inflamatoria característica de las infecciones de *Yersinia* (43). De hecho, *Y. pestis* presenta varias mutaciones en el regulón del flagelo y no expresa FlhDC (108, 273).

FliA y FlhDC como reguladores de la expresión génica

Además de su función como reguladores del flagelo, FlhDC y FliA son reguladores globales que afectan a la expresión de un gran número de genes. Así, FliA afecta la expresión de factores de virulencia codificados en el plásmido pYV, probablemente inhibiendo la expresión del activador transcripcional VirF (176). Estos factores de virulencia son YadA, YscG y YscM (que forman parte del operón *virC*), el elemento de inserción altamente móvil ISYe1 (de función desconocida) y YopQ. FliA, junto con YmoA, media la termoregulación de la expresión de factores de virulencia codificados en el plásmido pYV. Además, a partir de los resultados obtenidos empleando análisis de micromatrices, se ha descrito que FliA también regula la expresión de los genes cromosómicos *yplA* e *inv* (328, 402). No obstante, utilizando el mismo tipo de análisis, otros autores no han observado dicha relación (176, 194).

Por su parte, FlhDC inhibe la expresión de los genes *ysc* y *yop* a temperaturas inferiores a 37°C (44), regula la síntesis de la fosfolipasa A (YpIA) (328) y modula los niveles de expresión de varios genes metabólicos, en concreto los implicados en el metabolismo del nitrógeno y en el ciclo de la urea (194). Con todo, FlhDC y FliA contribuyen a la regulación antagónica de los genes del flagelo y de los factores de virulencia codificados en el plásmido pYV (SSTT Ysc y YadA). El hecho de que los SSTT Ysc y del flagelo no sean funcionales en las mismas condiciones puede deberse a que, si se sintetizan a la vez, ambas estructuras interfieran entre sí o bien a que su ensamblaje requiere un elemento común.

3.2.2. El sistema de secreción tipo III Ysa

La isla de patogenicidad Ysa (IP-Ysa) se encuentra en el cromosoma de las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B (cepas de alta patogenicidad) y codifica el SSTT denominado Ysa (“*Yersinia* secretion apparatus”) (132, 155, 370, 400). De acuerdo con la secuencia y organización génica, el SSTT Ysa está estrechamente relacionado con el SSTT Mxi-Spa de *Shigella flexneri* y con el SSTT codificado en la SPI-1 de *S. enterica* (132). La expresión del SSTT Ysa se induce *in vitro* a 26°C, pH neutro/básico y elevada concentración de NaCl (155). Aunque no se conoce exactamente cuál es la función biológica del SSTT Ysa, desempeña un papel en la virulencia de *Y. enterocolitica*, puesto que se ha demostrado que contribuye a la colonización gastrointestinal durante las primeras fases de la infección en el modelo de infección oral de ratón (155, 376). Además, en este modelo de infección, la DL₅₀ de un mutante *ysa* es 10 veces superior que la DL₅₀ de la cepa silvestre (155, 234).

El *locus ysa-ysp* de la IP-Ysa contiene varios genes que codifican proteínas homólogas a otras presentes en todos los SSTT caracterizados hasta el momento (YsaJ, I, C, W, V, N, Q, R, S, T, U). Según análisis bioinformáticos, la mayoría de estas proteínas parecen formar parte del inyectosoma del aparato de secreción característico de los SSTT (132). El SSTT Ysa está regulado por el sistema de dos componentes YsrS/YsrR a través de YsaE/SycB y por RcsB (376, 380). La evidencia disponible indica que estos sistemas controlan la expresión de *ysaE*, que, a su vez, controla la transcripción de genes implicados en la síntesis del aparato de translocación del SSTT.

Por otra parte, las proteínas denominadas Ysp y la chaperona SycB se secretan mediante el SSTT Ysa. Algunos de los genes que codifican estas proteínas Ysp se localizan en la IP-Ysa, mientras que otros están dispersos en el cromosoma (234). El SSTT Ysa también puede secretar las proteínas YopE, YopN y YopP del SSTT Ysc (133, 400) (**Figura 11**). Además, el sistema Ysa también secreta la proteína YplA (400). Hasta el momento, se han identificado ocho efectores Ysp (YspA, YspE, YspF, Yspl, YspK, YspL, YspM y 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. (133, 234, 392) (**Figura 11**). 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 (202, 234, 235, 392).

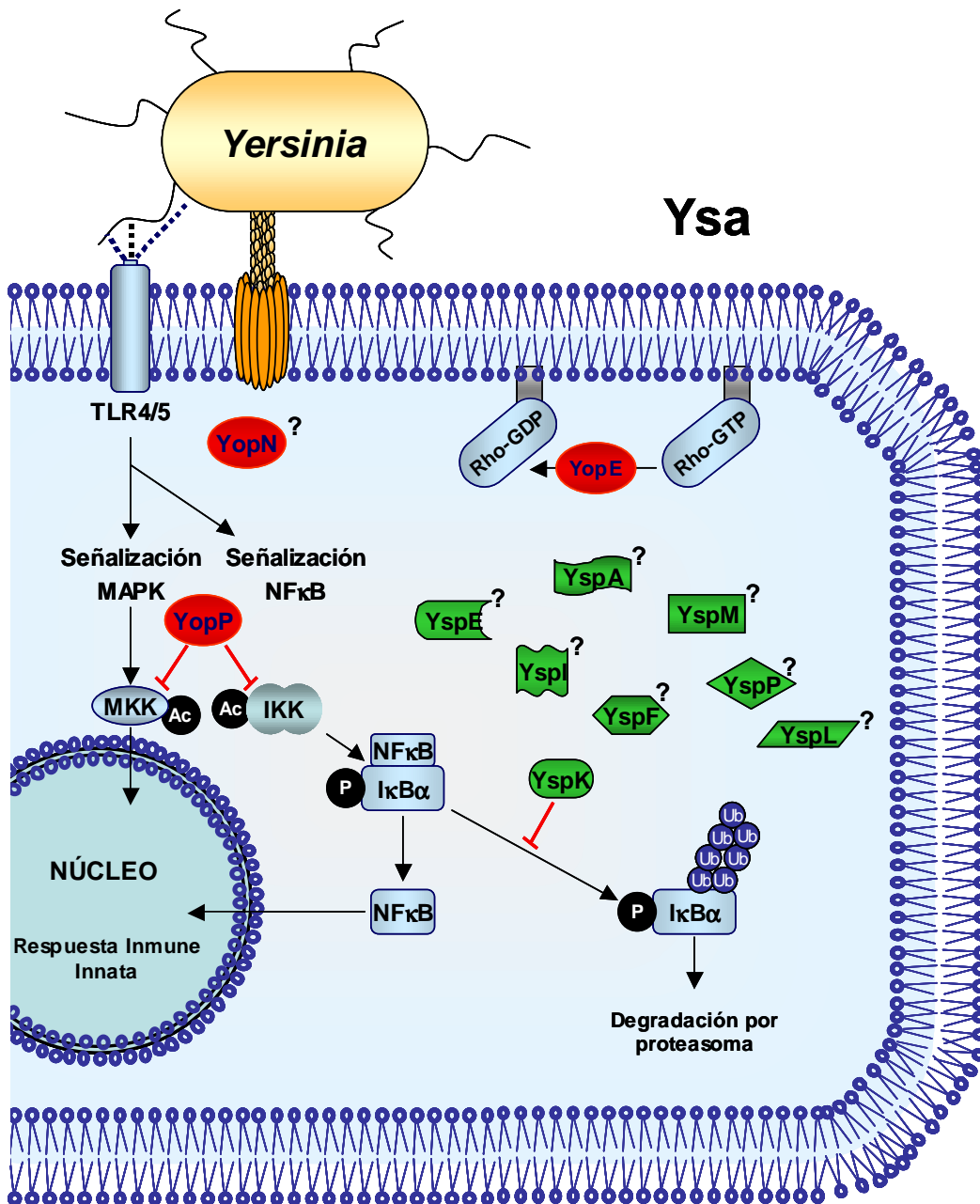


Figura 11. Dianas celulares y vías de señalización de los efectores translocados por el sistema de secreción tipo III Ysa de *Y. enterocolitica* biotipo 1B. Probablemente YopE y YopP ejercen la misma función que al ser secretados por el SSTT Ysc. YopN se inyecta en la célula pero no se conoce su función como proteína efectora. YspK interacciona con enzimas conjugadas con ubiquitina E2 y puede que interfiera en la degradación de I κ B α mediada por el proteasoma, con lo cual se inhibe la expresión de genes proinflamatorios. Adaptado de: Matsumoto H. y colaboradores, 2009 (235).

3.2.3. El sistema de secreción tipo II

Las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B, descritas como altamente patógenas, contienen una región de unos 200 kb en su cromosoma que no se encuentra en otras especies de *Yersinia* (370). Esta región es muy variable entre las diferentes cepas de *Y. enterocolitica* y se denomina región de plasticidad (PZ). Varios factores de virulencia se encuentran en esta región PZ, incluyendo una región similar a la isla de patogenicidad YAPI de *Y. pseudotuberculosis*, el SSTT Ysa, descrito anteriormente, y el sistema de secreción tipo II Yst1 (“*Yersinia* type II secretion 1”) (370).

Los sistemas de transporte tipo II se han descrito en diferentes enterobacterias (322). El operón cromosómico *yst1* presente en el biotipo 1B de *Y. enterocolitica* es muy similar al operón *eps* de *Vibrio cholerae*, el cual codifica las proteínas que median el transporte extracelular de proteínas como proteasas o la toxina de la cólera (188, 323). Los genes *yts1* se transcriben preferentemente a 37°C, pero se desconocen las proteínas que son transportadas por el sistema Yst1 así como su función (188).

El sistema de secreción tipo II Yst1 es necesario para la virulencia de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B en el modelo de infección oral de ratón. Un mutante *yst1* 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 intravenosa (188).

Por otra parte, todas las cepas aisladas de *Y. enterocolitica* codifican otro sistema de secreción tipo II, denominado *yts2*, el cual difiere significativamente de *yst1*, y que también se encuentra en el genoma de *Y. pestis* (188). Es probable que Yst2 no esté implicado en la virulencia de *Y. enterocolitica*, puesto que también está presente en las cepas consideradas avirulentas (188).

3.2.4. Fosfolipasa A

La fosfolipasa A (YplA) es una proteína extracelular de 35,5 kDa codificada por un gen tipo III del SSTT del flagelo (327, 328, 404). Todas las cepas de *Y. enterocolitica* codifican en su cromosoma el gen *yplA*, pero sólo las del biotipo 1 tienen actividad fosfolipasa (327). Por su parte, ni *Y. pestis* ni *Y. pseudotuberculosis* expresan YplA (327).

El gen *yplA* se expresa de manera coordinada junto con otros genes del flagelo a 26°C (328). La expresión de *yplA* se induce cuando la bacteria alcanza la fase de crecimiento exponencial y es máxima cuando el pH oscila entre 6.5-7.5 (328). 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). 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 temperatura (328).

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. 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. 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 (33, 327). Asimismo, YplA parece modular la respuesta inflamatoria del huésped (327).

Para ejercer su función, YplA debe ser secretada al medio extracelular. YplA puede ser secretada por cualquiera de los tres SSTT presentes en *Y. enterocolitica* y la contribución de cada uno de ellos depende de factores ambientales como la temperatura, la disponibilidad de calcio o la concentración de NaCl (400, 404). En bacterias que expresan YplA pero que no pueden secretarla, la proteína es degradada lo que indica que la acumulación

citoplasmática de YpIA podría ser perjudicial por degradar fosfolípidos intracelulares de manera descontrolada (404).

3.2.5. Invasin

Invasin (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*. En *Y. pestis* está inactivado por una mutación (341). Inv es una proteína de 92-103 KDa, formada por cinco dominios globulares que se proyectan hacia el exterior de la membrana externa (156). 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 (81, 156, 184, 185). Así pues, Inv media la adhesión e invasión del epitelio intestinal, a través de las células M, para que la bacteria alcance las placas de Peyer (81, 182, 249, 279, 298).

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* en *Y. enterocolitica* ocurre a 23°C y pH 8.0, o bien a 37°C y pH 5.5, en el inicio de la fase estacionaria (278). En *Y. pseudotuberculosis*, el efecto de la temperatura sobre la expresión de *inv* es similar, aunque la modulación por la disponibilidad de nutrientes y por el pH del medio de cultivo no ocurre igual que en *Y. enterocolitica* (257).

La regulación de *inv* en respuesta a señales ambientales en *Y. enterocolitica* está mediada por el activador transcripcional RovA (298) y por el complejo inhibidor H-NS-YmoA (120, 264). RovA (“regulator of virulence A”) pertenece a la familia de activadores transcripcionales MarR/SlyA, los cuales regulan la expresión de factores de virulencia fundamentales en la adaptación al estrés de diferentes bacterias (257). En el modelo de ratón de infección oral, un mutante *rovA* de *Y. enterocolitica* es menos virulento que la cepa silvestre o un mutante *inv*, lo que sugiere que RovA regula directa o indirectamente la expresión de otros factores de virulencia, además de Inv (113, 298). Además, si la ruta de infección es intraperitoneal, el mutante *rovA* no es tan atenuado

como si la ruta de infección es oral (113), indicando que RovA sobre todo está implicado en la colonización y supervivencia de la bacteria en el tejido linfoide. Para activar la expresión de *inv*, RovA se une a dos secuencias ricas en AT de la región promotora de *inv* (171). RovA también activa su propia transcripción uniéndose a secuencias específicas de su región promotora (171).

La transcripción de los genes *rovA* e *inv* está inhibida por la proteína asociada al nucleoide H-NS (“histone-like nucleoid structure protein”). Esta proteína 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 secuencias ricas en AT y que presentan una curvatura intrínseca. Regiones de este tipo están presentes en los promotores de *inv* y *rovA* (96, 112, 260, 363). La evidencia indica que la acción represora de H-NS está reforzada por la formación de heterómeros con proteínas de la familia Hha-YmoA (93, 120, 265). En *Yersinia*, *hns* es un gen esencial (120, 171).

Los sitios de unión de RovA y H-NS están superpuestos en las regiones promotoras de *inv* y *rovA* (171). Así, para activar la transcripción de estos genes, 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 (171, 374). Esto ocurre cuando la bacteria crece a temperatura ambiente, mientras que a 37°C el complejo H-NS-YmoA inhibe la expresión de ambos genes. Cabe señalar que la temperatura regula tanto la expresión como las modificaciones post-transcripcionales de RovA (257).

Por otra parte, OmpR regula negativamente la expresión de *inv* a 25°C en *Y. enterocolitica* O:9 (61). OmpR es el sensor de la osmolaridad del sistema de dos componentes OmpR/EnvZ (115, 314) y podría estar relacionada con la disminución de la expresión de *inv* observada en *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* al crecer en un medio de elevada osmolaridad (257, 278).

En *Y. pseudotuberculosis* RovA activa la transcripción de *inv* de la misma manera que en *Y. enterocolitica* (171, 257). 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 oral (298). Por otra parte, *Y. pseudotuberculosis* expresa RovM, una proteína de la familia tipo LysR, que, junto con H-NS, inhibe la expresión de *rovA* (168, 170). La mutación del gen *rovM* provoca un aumento de la internalización de *Y. pseudotuberculosis* en las células huésped y aumenta el número de bacterias que infectan las placas de Peyer y los órganos internos de los ratones infectados (169, 170).

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 y que está implicada en la virulencia de la bacteria (74, 138). Su homólogo en *Y. enterocolitica* es el *locus myf* que también parece estar regulado por RovA (Bengoechea, comunicación personal).

3.2.6. Ail

Ail es una proteína de 17kDa localizada en la membrana externa. Pertenece a la familia OmpX, cuya estructura se caracteriza por presentar ocho dominios transmembrana y cuatro bucles extracelulares (128, 248, 377). Está codificada en el cromosoma de todas las especies patógenas de *Yersinia*. Diferentes autores han descrito que Ail puede hallarse en la superficie de la bacteria parcialmente oculta por la cadena O del LPS (38). 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 (22, 25, 283).

En *Y. enterocolitica*, Ail sólo se expresa a 37°C y ejerce funciones importantes para la diseminación extracelular y la patogenicidad de la bacteria. Por una parte, Ail es un factor de adhesión e invasión de células del huésped, aunque no es necesaria para establecer la infección (247-249, 379). Por otra parte, Ail confiere a la bacteria resistencia al complemento (46, 247, 379). Así, Ail inhibe la activación de las vías del complemento uniéndose al regulador de la vía clásica C4bp (204) y al inhibidor de la vía alternativa, el factor H (37, 79).

En *Y. pestis*, Ail también media la adhesión e invasión celular (208). De hecho, la función de Ail como adhesina es crítica para la translocación de las proteínas Yop a las células del huésped (126). Por otra parte, Ail es el único factor que media la resistencia al complemento en *Y. pestis*, tanto a 26 como a 37°C (13, 22, 208, 263, 398).

3.2.7. Ureasa

Las ureasas son metaloenzimas que catalizan la hidrólisis de urea a ácido carbónico y amonio. Estas enzimas están presentes en multitud de organismos y su principal función es la de contribuir al metabolismo del nitrógeno.

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* (102). 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 rata (150). El papel de la ureasa como factor de virulencia en *Y. enterocolitica* es el de potenciar la supervivencia de la bacteria en los ambientes ácidos que encuentra la bacteria a lo largo del proceso de infección, como el estómago o el interior del fagosoma de macrófagos, leucocitos polimorfonucleares u otras células del huésped (102, 401). En estos ambientes, la producción de amonio por parte de la bacteria tampona el pH de su citoplasma, evitando el efecto letal que supondría su acidificación.

En *Y. enterocolitica*, la ureasa tiene una alta actividad en condiciones de pH ácido y una baja actividad en condiciones de pH neutro, para así poder usar la urea como fuente de nitrógeno y evitar la acumulación de amonio a niveles que podrían ser tóxicos para la bacteria. Este control de la actividad enzimática por el pH garantiza la supervivencia de la bacteria, permitiendo su adaptación a cambios bruscos de pH, como ocurre cuando la bacteria atraviesa el estómago. Así pues, la ureasa es activa en un amplio rango de pH pero, a diferencia de la mayoría de ureasas bacterianas, 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 (104, 401). *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 (104, 194). La ureasa de *Y. enterocolitica* no se activa por la urea o en condiciones limitantes de nitrógeno, lo cual no se ha descrito para ninguna otra bacteria ureolítica (104).

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* (242, 243, 346). No obstante, Gripenberg-Lerche y colaboradores (150) indican que dicha subunidad no está implicada en la inducción de artritis en aquellas ratas infectadas por vía intravenosa.

En *Y. pseudotuberculosis*, la ureasa no está implicada en la virulencia (300) y, probablemente, su función más importante sea la de contribuir al metabolismo del nitrógeno durante el período de vida saprofítico de este patógeno. Por otra parte, aunque *Y. pestis* posee el *locus ure* completo, no presenta actividad ureolítica debido a la presencia de un codón de parada prematuro en el gen *ureD* (103, 104, 334).

3.2.8. 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) presentan una isla de alta patogenicidad de 36-43 kb en su cromosoma, cuya función principal es la captación de hierro (62, 68, 101, 292). Esta isla de alta patogenicidad está ampliamente distribuida en enterobacterias como *E. coli*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (17, 200, 330).

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 (291, 292). La región conservada es de unas 30 kb y comprende genes implicados en la síntesis, transporte y regulación del sideróforo yersiniabactin (Ybt) (23, 63, 130, 165, 277, 291). Los genes del *locus ybt* están regulados negativamente por el complejo Fur-Fe²⁺ (69, 166, 361) 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 (129).

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 (142, 318).

3.2.9. 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 bacteriana (97). 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 (67, 172, 236). 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 expresión del sistema Psp se induce de manera potente y específica por la deslocalización de secretinas (99, 161, 221, 236). Las secretinas son una familia de proteínas oligoméricas que forman poros en la membrana externa (139) y deben asociarse a lipoproteínas para alcanzar su ubicación correcta en la membrana (160). 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 filamentoso (139). Otros factores que pueden desencadenar la activación del sistema Psp son condiciones extremas de temperatura u osmolaridad, tratamientos con etanol o la presencia de ionóforos (386). Todos estos son factores que alteran la envoltura celular de bacterias Gram negativas (32, 57, 97, 253) y, como consecuencia, probablemente se disipe el gradiente

electroquímico. Aunque no está totalmente demostrado, la función del sistema Psp sería la de paliar las alteraciones en la envoltura bacteriana con el fin de restaurar el gradiente electroquímico de la membrana (206).

En *Y. enterocolitica*, el sistema Psp está codificado en dos *loci* no adyacentes en el cromosoma, *pspF-pspABCDycjXF* y *pspG*. La regulación de la expresión de los promotores *pspA* y *pspG* es compleja y depende del activador transcripcional PspF. En condiciones normales, PspF está inhibido por la interacción directa con PspA (114, 117, 118). 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 (237, 385). 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 génica (2). Además de regular la expresión del regulón *psp*, PspA, PspB y PspC son las proteínas efectoras del sistema. PspA parece contribuir a restablecer el gradiente electroquímico (206). Por su parte, PspB y PspC son importantes para mantener el crecimiento en la bacteria en respuesta al estrés causado por la deslocalización de secretinas (99, 237). PspG parece ser también una proteína efectora, aunque su función es aún desconocida (145, 221).

El sistema Psp es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* en el modelo de infección oral de ratón (98). También es esencial para su supervivencia en condiciones de estrés causado por la sobreexpresión y deslocalización de secretinas (99, 145, 237). El hecho de que las secretinas sean un componente esencial de los SSTT debe explicar, al menos en parte, la importancia del sistema Psp en la virulencia de *Y. enterocolitica* (99).

3.2.10. La enterotoxina Y-STa

Y-STa (“*Yersinia* stable toxin”) es una enterotoxina termoestable codificada en el cromosoma de las cepas patógenas de *Y. enterocolitica* (106). Esta enterotoxina es una proteína de 30 aminoácidos que proviene del procesamiento de un polipéptido de mayor tamaño (106). La organización y el centro activo de la proteína Y-STa son muy similares a los de la enterotoxina

termoestable STa de *E. coli* (106). La expresión de la enterotoxina Y-STa está regulada por la temperatura (246). *In vitro*, su máxima expresión se alcanza a temperaturas de entre 20-25°C. A 37°C su expresión está inhibida a menos que la bacteria crezca en condiciones de elevada osmolaridad (246).

Por otra parte, 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 íleon (342). 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 (66, 146, 147, 239, 296, 342). Finalmente, ni *Y. pseudotuberculosis* ni *Y. pestis* producen ninguna enterotoxina (271, 272).

Como se ha descrito anteriormente, la infección de *Y. enterocolitica* en humanos da lugar a gastroenteritis con episodios de diarrea, fiebre y dolor abdominal (52, 95). Aunque el modelo de infección oral de ratón refleja el progreso de la infección en humanos (71, 72), los brotes de diarrea no ocurren y sólo se observan en la infección de conejos jóvenes. Así, en el modelo de infección oral de conejos jóvenes, se demostró 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* (105). No obstante, dicho mutante mantiene la capacidad de colonizar el intestino y de generar infecciones sistémicas (105).

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 guanosín monofosfato cíclico (cGMP) en las células del epitelio intestinal de ratones y conejos (179, 294, 295). Además, Y-STa regula las señales de calcio que modulan eventos celulares tanto en el núcleo como en el citoplasma de enterocitos de rata (315, 316). Parece que esta regulación del calcio intracelular podría ser responsable de los efectos de la enterotoxina en el huésped.

3.2.11. La cadena O del lipopolisacárido

La mayoría de las cadenas O de los LPSs de *Yersinia* presentan una estructura heteropolimérica. Únicamente son homopoliméricas las cadenas O de *Y. enterocolitica* O:3 (compuesta por 6-deoxi-L-altrosa) y *Y. enterocolitica* O:9 (compuesta por N-formil-perosamina) (70, 256). La cadena O de *Y. enterocolitica* O:8 está formada por un polisacárido que contiene entre siete y diez unidades repetidas de un pentasacárido (26, 406). *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-dideoxihexosa (321).



Figura 12. Esquema del operón de la cadena O de *Y. enterocolitica* serotipo O:8.

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* (345) (**Figura 12**). En aquellas cepas que expresan cadenas O homopoliméricas, los genes necesarios para la síntesis del núcleo externo se encuentran entre los genes *hemH* y *gsK* (354). En estas cepas los genes de la cadena O también están agrupados, pero localizados en otro sitio del genoma todavía desconocido. Han sido secuenciadas las regiones génicas necesarias para la síntesis de la cadena O de *Y. enterocolitica* O:8, O:3, O:9 y varios serotipos de *Y. pseudotuberculosis* (224, 297, 407-409).

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 que a 37°C, temperatura a la cual sólo presenta pequeñas trazas de polisacárido (6, 26). Además de la temperatura, existen otros factores importantes que afectan a esta síntesis como, por ejemplo, la

fase de crecimiento. La expresión de la cadena O de *Y. enterocolitica* serotipo O:3 es mayor durante la fase exponencial que en la fase estacionaria y, sólo en esta última, la temperatura es un factor regulatorio (212).

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 en la virulencia en diferentes modelos animales (25, 259, 408). 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 huésped (408). En otros dos modelos animales, conejos y cerdos, un mutante que no expresa la cadena O también es menos virulento que la cepa silvestre (258, 259). 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 O (98). 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 DL_{50} del mutante que no expresa la cadena O tras una infección oral en ratón es 100 veces mayor que la DL_{50} de la cepa silvestre, mientras que la DL_{50} del mutante del núcleo externo es 1000 veces mayor que aquella de la cepa silvestre (7, 353). Además, en este serotipo la cadena O juega un papel importante en la resistencia al sistema del complemento (7, 38, 352). En *Y. pseudotuberculosis* la cadena O también parece ser esencial para la virulencia. Utilizando la técnica de STM, Meccas y colaboradores (240) 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 péptidos antimicrobianos (55).

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* (25). Así, un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 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 YpIA (25). 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 STT del flagelo es poco conocida y a que *flhDC* regula otros sistemas además del flagelo (194).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha resumido en la introducción, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de la cadena O está coordinada con la expresión de otros factores de virulencia de *Y. enterocolitica* O:8 (25). Así, en un mutante que no expresa la cadena O, la expresión de *inv* es más baja que en la cepa silvestre. Además en este mutante *flhDC* está sobreexpresado y presenta hipermotilidad. Por otra parte, Bleves y colaboradores (44) demostraron que en *Y. enterocolitica* serotipo O:9 la mutación de *flhDC* conlleva un aumento en la secreción de Yops mientras que la sobreexpresión de *flhDC* la disminuye.

En este trabajo nos planteamos estudiar si la presencia o ausencia de la cadena O afecta a la expresión y/o la funcionalidad de otro importante factor de virulencia de *Y. enterocolitica*, el SSTT Ysc, y si éste es un proceso dependiente de *flhDC*.

Para estudiar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- i.- Estudiar si la expresión del SSTT Ysc está alterada en un mutante que no expresa la cadena O.
- ii.- Analizar el papel de *FlhDC* en la expresión del SSTT Ysc.

Por otro lado, Badger y colaboradores (18) demostraron que en *Y. enterocolitica* existe una regulación coordinada entre la expresión de *inv* y la motilidad. Por tanto, puesto que un mutante de *Y. enterocolitica* que no expresa cadena O presenta una alteración en los fenotipos de motilidad y de expresión de *inv* y *flhDC* (25), nos planteamos el siguiente objetivo:

- iii.- Analizar las bases moleculares que explican la conexión entre *inv*, *flhDC* y la cadena O.

MATERIAL 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 I).

La presencia o ausencia del plásmido de virulencia pYV en las cepas de *Y. enterocolitica* se determinó, en primer lugar, comprobando si las bacterias autoaglutinaban tras crecer en medio RPMI1640 sin rojo fenol (Labclinics) a 37°C (213). Las bacterias que poseen el pYV autoaglutinan debido a que expresan la proteína YadA. La presencia de pYV también se comprobó creciendo las bacterias en el medio Rojo Congo-oxalato magnésico (30% TSB, 15% agar, 2% galactosa, 0.05% Rojo Congo, 4.06% cloruro magnésico, 2.65% oxalato sódico) (299) a 37°C. En este medio, las colonias del género *Yersinia* que poseen el plásmido de virulencia forman pequeñas colonias rojas ya que la expresión de las Yops retrasa el crecimiento de la bacteria y la superficie de la misma capta el colorante Rojo Congo (299). 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 2, Anexo I) 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 rpm tanto a temperatura ambiente 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.

El **medio LB0** tiene la misma composición que el medio LB, pero sin NaCl.

Añadir 15 g de agar bacteriológico por litro para **LB agar** o **LB0 agar**.

CIN agar (OXOID)

Medio comercial para el crecimiento selectivo de *Y. enterocolitica* 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 (Tryptic soy broth) complementado con 20 mM oxalato sódico y 20 mM cloruro magnésico, de manera que el calcio está quelado.

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 (Tc): Utilizada a una concentración final de 12.5 $\mu\text{g/ml}$.
- Estreptomina (Sm): Utilizada a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.
- Trimetopina (Tp): 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 colaboradores (319). El ADN plasmídico fue purificado usando kits comerciales (*QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* y *Qiagen plasmid Midi Kit* de Qiagen, *IllustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit* de GE Healthcare). Las reacciones de PCR se realizaron empleando la enzima *GoTaq[®] Flexi* ADN polimerasa (Promega) o la enzima *Vent* ADN polimerasa (New England Biolabs) en aquellos casos en los que fue necesaria una mayor fidelidad. 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, *IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de GE Healthcare). Las enzimas de restricción del ADN (Promega), 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.

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 colaboradores (35) que facilita la discriminación de plásmidos por su tamaño. Brevemente, se inocularon 800 μ l de medio de cultivo en un tubo tipo Eppendorf[®] con aproximadamente la mitad de una colonia. El cultivo creció 18 h en agitación (180 rpm) a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Posteriormente, se tomó una alícuota del cultivo (300 μ l) y las bacterias se recogieron mediante centrifugación (17500 x g, 5 min). El precipitado se resuspendió en 40 μ l de reactivo de tinción (0.1% azul de bromofenol, 6% sacarosa) a los que se añadieron 14 μ l 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, 5 min) con el fin de separar la fase acuosa de la fase orgánica. Finalmente se cargaron 10 μ l 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, 100 ml de medio LB con 20 mM $MgSO_4$ se inocularon con 1 ml de un cultivo de *E. coli* en fase estacionaria crecido en LB (180 rpm, 16 h, 37°C). Este cultivo se incubó a 37°C con agitación (180 rpm) hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0.4-0.6. Las células se recuperaron por centrifugación (2000 x g, 5 min, 4°C) y se resuspendieron en 0.4 volúmenes (respecto al cultivo inicial) de TFB1 frío (30 mM acetato potásico, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15% (v/v) glicerol, pH 5.8). Las células se incubaron en hielo durante 5 minutos antes de ser recogidas de nuevo por centrifugación (2000 x g, 5 min, 4°C). Las células se resuspendieron en un volumen 1/25 (respecto al cultivo inicial) de TFB2 frío (10 mM MOPS o PIPES, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM RbCl, 15% (v/v) glicerol, pH 6.5) y se incubaron en hielo durante 60 min. Seguidamente se distribuyeron en alícuotas de 200 μ l, 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 μ l). Luego, la mezcla se incubó en hielo durante 30 min y, a continuación, fue sometida a un choque térmico de 90 s a 42°C en un baño termostático. Seguidamente, se mantuvo en hielo durante 2 min y se añadieron 800 μ l de medio SOC (composición por litro: 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0.6 g NaCl, 0.19 g KCl, 2.03 g $MgCl_2$, 2.46 g $MgSO_4$, 3.6 g glucosa) (158), previamente atemperado a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 h, en agitación (180 rpm). Finalmente, las bacterias se

plaquearon en placas de LB agar que contenían los antibióticos apropiados para la selección de transformantes, y se incubaron a 37°C durante 12-18 h.

2.2.2. Transformación por electroporación

La electroporación permite la captación de ADN mediante la permeabilización de las membranas provocada por una descarga eléctrica. (337). Para preparar las células electrocompetentes, tanto de *Y. enterocolitica* como de *E. coli* se siguió el protocolo descrito por Choi y Schweizer (80). Brevemente, se creció un cultivo bacteriano durante 16 h en 6 ml de medio LB en agitación (180 rpm) 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

Las células electrotransformadas se resuspendieron rápidamente en 800 µl de SOC (Composición por litro: 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0.6 g NaCl, 0.19 g KCl, 2.03 g MgCl₂, 2.46 g MgSO₄, 3.6 g glucosa) (158) y se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf® que se incubó 1-3 h en agitación (180 rpm) a la temperatura adecuada en función de la cepa transformada o el plásmido introducido.

2.2.3. Conjugación en medio sólido

En ocasiones, aquellos plásmidos que contienen la región *mob* se introdujeron en *Y. enterocolitica* 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 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 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

Los cebadores utilizados en reacciones de PCR para la construcción de los plásmidos así como las cepas y los plásmidos utilizados en este trabajo están descritos en las Tablas 2, 3 y 4, respectivamente (Anexo I).

3.1. Construcción de cepas mutantes de *Y. enterocolitica* O:8 8081

3.1.1. Construcción de los mutantes YeO8::pKNOCK-FlhDC y YeO8-R::pKNOCK-FlhDC mediante mutagénesis dirigida por recombinación en un punto

La obtención de mutantes de YeO8 y YeO8-R en el operón *flhDC* por recombinación en un punto se realizó usando el vector suicida pKNOCK-FlhDC (9, 25). Dicho vector tiene clonado un fragmento interno de la región codificante del operón *flhDC*. La replicación del vector pKNOCK requiere la proteína Pi y confiere resistencia al cloranfenicol. El plásmido pKNOCK-FlhDC se transfirió por conjugación a YeO8 y YeO8-R (apartado 2.2.3.). La selección de mutantes se realizó plaqueando las conjugaciones en placas de LB con Cm. La recombinación en un punto genera dos copias truncadas del gen a mutar en el genoma bacteriano (**Figura 13**). La correcta inserción del plásmido se comprobó por Southern Blot con sondas específicas.

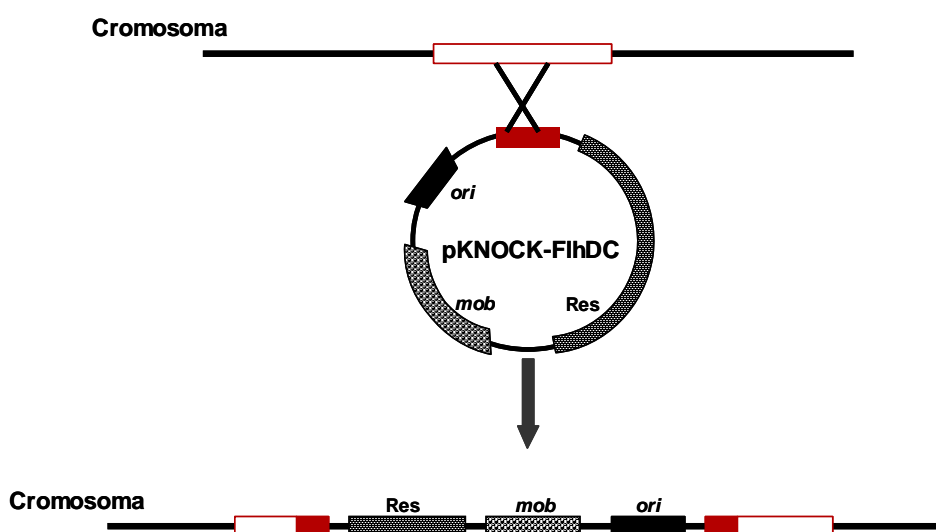


Figura 13. Esquema de la recombinación en un punto usando el vector suicida pKNOCK.

3.1.2. Construcción de los mutantes $\Delta sspABGB$, $\Delta manCKm$, $\Delta sspBKm$, $\Delta clpXKm$, $\Delta clpXPKm$ y $\Delta flhDC$ por mutagénesis dirigida mediante doble recombinación

3.1.2.1. Construcción del vector suicida pKNG $\Delta sspABGB$

El operón *sspAB* se amplificó mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y los cebadores YeO8SspAmutf y YeO8SspAmutr. Los cebadores se diseñaron a partir del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Yenterocolitica/). El fragmento de PCR obtenido (1800 pb) se purificó a partir de un gel de agarosa, se trató con la T4 polinucleótido quinasa y se clonó en el vector pEL (26), previamente digerido con *SmaI* y tratado con fosfatasa antártica. De esta manera se generó el plásmido pEL*sspAB* que se transformó en *E. coli* C600.

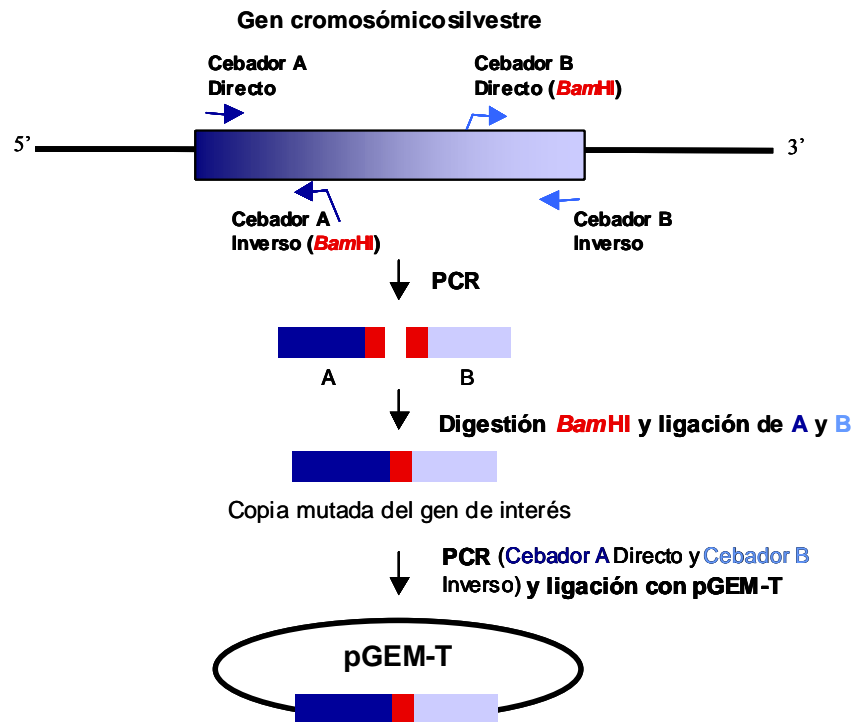
El plásmido pUC-4K se digirió con *EcoRI* escindiendo un fragmento de 1400 pb, correspondiente a un casete de resistencia a kanamicina (Gene Block, GB) que se purificó a partir de un gel de agarosa. Este casete se clonó en el plásmido pEL*sspAB*, digerido con *EcoRI* y tratado con fosfatasa antártica, obteniéndose el plásmido pEL*sspABGB*, que se transformó en *E. coli* C600.

El plásmido pEL*sspABGB* se digirió con *PvuII* generándose un fragmento de 3 kb que contenía el alelo $\Delta sspAB::GB$. Este fragmento se purificó a partir de un gel de agarosa y se clonó en el vector suicida pKNG101 (193) digerido con *SmaI*, obteniéndose pKNG- $\Delta sspABGB$, que se transformó en *E. coli* S17-1 λ pir.

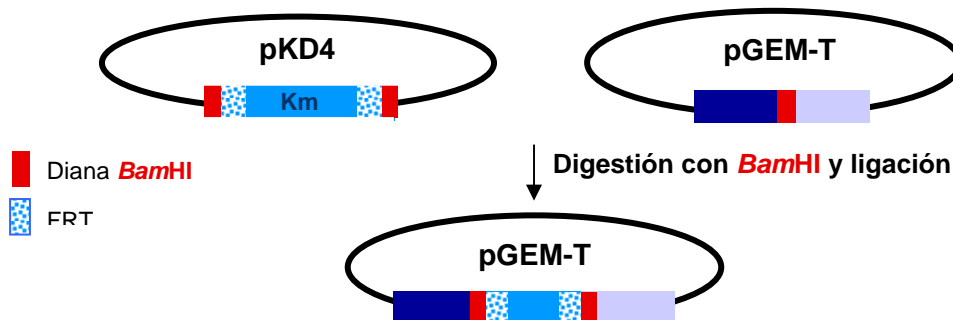
3.1.2.2. Construcción de los vectores suicidas pKNG- $\Delta manCKm$, pKNG- $\Delta sspBKm$, pKNG- $\Delta clpXKm$ y pKNG- $\Delta clpXPKm$

La construcción de mutantes de YeO8 en los genes *manC*, *sspB*, *clpX* y *clpXP* se basó en el método mostrado en la **Figura 14**.

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



B. Clonación del casete de resistencia a Km



C. Clonación en pKNG101

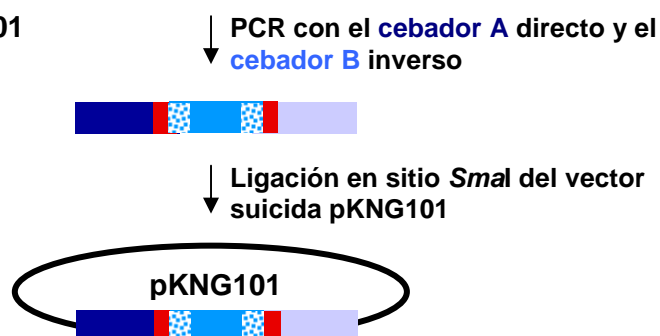


Figura 14. Esquema de la construcción de los vectores suicidas para la obtención de mutantes por doble recombinación.

En primer lugar, se amplificaron por 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 $\Delta manC$; UpsspBF/UpsspBR y DownSSpBF/DownSSpBR para el mutante $\Delta sspB$; UpclpXF/UpClpxR y DownClpXF/DownClpxR para el mutante $\Delta clpX$; y UpclpXF/UpClpxR y DownClpPF/DownClpPR para el mutante $\Delta clpXP$. Los cebadores se diseñaron a partir del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Yenterocolitica/). Para cada mutante, los cebadores inverso, de la primera pareja de cebadores, y directo, de la segunda pareja de cebadores, fueron diseñados de manera que en su extremo 5' incluían 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, tras lo cual ambos fragmentos se purificaron y se ligaron. 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 DELTAmancUpF y DeltamancdownR para el mutante $\Delta manC$; UpsspBF y DownSSpBR para el mutante $\Delta sspB$; UpclpXF y DownClpxR para el mutante $\Delta clpX$; y UpclpXF y DownClpPR para el mutante $\Delta clpXP$. Los fragmentos de PCR obtenidos (1569 pb para $\Delta manC$, 393 pb para $\Delta sspB$, 739 pb para $\Delta clpX$ y 617 pb para $\Delta clpXP$) se clonaron en el vector pGEM-T[®] Easy (Promega), generándose pGEMT- $\Delta manC$, pGEMT- $\Delta sspB$, pGEMT- $\Delta clpX$ y pGEMT- $\Delta clpXP$, respectivamente, y se transformaron en *E. coli* C600.

El plásmido pKD4 (100) contiene un casete que confiere resistencia a Km flanqueado por las secuencias FRT (“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, con la polimerasa *Vent* y los cebadores cassette-F1 y cassette-R1, 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- Δ *manC*, pGEMT- Δ *sspB*, pGEMT- Δ *clpX* y pGEMT- Δ *clpXP*, previamente digeridos con *Bam*HI y desfosforilados. De esta manera se generaron los plásmidos pGEMT- Δ *manCKm*, pGEMT- Δ *sspBKm*, pGEMT- Δ *clpXKm* y pGEMT- Δ *clpXPKm*, que se transformaron en *E. coli* C600. Se comprobó la orientación del casete de resistencia a Km clonado mediante PCR con los cebadores K1 Wanner, K2 Wanner o Kt Wanner, los cuales hibridan en diferentes puntos del casete de Km (100), en combinación con los cebadores usados en la amplificación de los fragmentos respectivos de los genes a mutar.

Finalmente, los plásmidos pGEMT- Δ *manCKm*, pGEMT- Δ *sspBKm*, pGEMT- Δ *clpXKm* y pGEMT- Δ *clpXPKm* se usaron como molde en reacciones de PCR con la polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores DELTAmancUpF y DeltamancdownR para el mutante Δ *manC*; UpsspBF y DownSSpBR para el mutante Δ *sspB*; UpclpXF y DownClpxR para el mutante Δ *clpX*; y UpclpXF y DownClpPR para el mutante Δ *clpXP*. Los fragmentos de PCR obtenidos (3.1 kb para Δ *manC*, 1.9 kb para Δ *sspB*, 2.2 kb para Δ *clpX* y 2.1 kb para Δ *clpXP*), se purificaron a partir de un gel de agarosa y se clonaron en el vector suicida pKNG101 (193) digerido con *Sma*I, obteniéndose pKNG- Δ *manCKm*, pKNG- Δ *sspBKm*, pKNG- Δ *clpXKm* y pKNG- Δ *clpXPKm*. Dichos vectores se transformaron en *E. coli* S17-1 λ pir.

3.1.2.3. Obtención de los mutantes YeO8- Δ *sspABGB*, YeO8- Δ *manCKm*, YeO8- Δ *sspBKm*, YeO8- Δ *clpXKm* y YeO8- Δ *clpXPKm*

El vector pKNG101 es un plásmido conjugativo que contiene un origen de replicación R6K, el gen *sacB* y un gen que confiere resistencia a Sm (193). 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 estreptomycin 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 Sm y 100 µg/ml Km.

Los merodiploides se crecieron en LB a 21°C con agitación durante 16 h y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en LB agar sin NaCl (LB0) y con 10% de sacarosa. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 días. De las colonias que crecieron se seleccionaron aquellas que no crecían en Sm y sí en Km, lo que indicó la pérdida del vector suicida. La sustitución del alelo silvestre por el mutado se comprobó mediante PCR y Southern Blot. En el caso del mutante $\Delta manC$, se confirmó la presencia de un LPS rugoso mediante DOC-PAGE seguido de tinción de plata.

3.1.2.4. Obtención de los mutantes YeO8- $\Delta manC$ y YeO8- $\Delta clpX$

Para eliminar el casete de resistencia a Km en los mutantes YeO8- $\Delta manCKm$ y YeO8- $\Delta clpXKm$ se les introdujo mediante electroporación el plásmido pCP20 que confiere resistencia a Ap y Cm, con un origen de replicación sensible a la temperatura y codifica la recombinasa FLP, cuya síntesis es inducible por temperatura (77, 100). Una vez transformadas, las células se incubaron durante 2 h a 26°C en agitación (180 rpm), 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 µl 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 los mutantes YeO8- $\Delta manC$ y YeO8- $\Delta clpX$.

3.1.2.5. Obtención del mutante YeO8- $\Delta flhDC$

Para obtener el mutante YeO8- $\Delta flhDC$ se usó el plásmido pGY22 descrito previamente (405), el cual contiene un fragmento de 500 pb del operón *flhDC* clonado en el vector suicida pEP185.2. Dicho vector es un plásmido conjugativo que contiene un origen de replicación R6K y confiere resistencia al cloranfenicol (203). Al igual que pKNG101, 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 Cm es que el vector se integre mediante recombinación homóloga en el cromosoma bacteriano. Por otra parte, para facilitar la selección de aquellas bacterias que hayan perdido el plásmido tras una segunda recombinación, se usó un sistema de selección basado en el enriquecimiento de cicloserina. La cicloserina sólo elimina las bacterias que están creciendo puesto que inhibe enzimas implicadas en la biosíntesis de la pared celular, mientras que el cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático. Aquellas bacterias que pierdan el vector suicida serán sensibles a Cm y no crecerán en medio LB con cloranfenicol, mientras que aquellas que no pierdan el vector suicida crecerán y serán, por tanto, eliminadas por la acción de la cicloserina.

El vector suicida pGY22 se movilizó por conjugación a *Y. enterocolitica* O:8 (apartado 2.2.3.). Para seleccionar los merodiploides, se plaquearon diluciones seriadas del producto final de la conjugación en CIN-agar (Oxoid) con Cm. Los transconjugantes se crecieron en LB a 21°C con agitación (180 rpm) durante 3-5 días, refrescando el cultivo a diario. Transcurrido ese tiempo, se inocularon 10 ml de LB conteniendo 10 µg/ml de Cm con 250 µl del cultivo, y se dejó crecer hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.2. A continuación, se añadió 1 ml de una solución de cicloserina (25 mg/ml) y se incubó el cultivo durante 3 h a

temperatura ambiente. Durante ese período de incubación, sólo aquellas bacterias en las que se hubiera dado una doble recombinación pudieron sobrevivir. Los recombinantes con un solo evento de recombinación fueron eliminados debido a que fueron sensibles a la cicloserina. Finalmente, las células se centrifugaron, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 10 ml de PBS. Se realizaron diluciones seriadas en PBS que se plaquearon en LB agar. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 días. De las colonias que crecieron se seleccionaron aquellas que no crecían en Cm, lo que indicó la pérdida del vector suicida. La sustitución del alelo silvestre por el mutado se comprobó mediante PCR y Southern Blot.

3.1.2.6. Obtención de los dobles mutantes *YeO8-ΔsspABGB-ΔflhDC*, *YeO8-ΔflhDC-ΔmanC*, *YeO8-ΔflhDC-ΔclpX* y *YeO8-ΔclpX-ΔsspABGB*

Para la construcción del doble mutante *YeO8-ΔsspABGB-ΔflhDC*, la cepa *YeO8-ΔsspABGB* se conjugó con la cepa de *E. coli* λpir transformada con el plásmido pGY22 (405). Una vez obtenido el merodiploide *YeO8-ΔsspABGB::pGY22*, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.2.5., para obtener el mutante doble.

Para la construcción de los dobles mutantes *YeO8-ΔflhDC-ΔmanCKm* y *YeO8-ΔflhDC-ΔclpXKm*, la cepa *YeO8-ΔflhDC* se conjugó con la cepa de *E. coli* λpir transformada con los plásmidos pKNG-*ΔmanCKm* y pKNG-*ΔclpXKm*, respectivamente. Una vez obtenidos los merodiploides *YeO8-ΔflhDC::pKNG-ΔmanCKm* y *YeO8-ΔflhDC::pKNG-ΔclpXKm*, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.2.3., para obtener los respectivos mutantes por doble recombinación. Para eliminar el casete de Km de los mutantes *YeO8-ΔflhDC-ΔmanCKm* y *YeO8-ΔflhDC-ΔclpXKm*, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.2.4. La pérdida del casete de Km se comprobó por PCR.

Para la construcción del doble mutante *YeO8-ΔclpX-ΔsspABGB*, la cepa *YeO8-ΔclpX* se conjugó con la cepa de *E. coli* λpir transformada con el plásmido pKNG-*ΔsspABGB*. Una vez obtenido el merodiploide *YeO8-ΔclpX::*

pKNG- Δ sspABGB, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.2.3., para obtener el mutante doble.

3.2. Construcción de plásmidos para complementar las mutaciones en los genes u operones *sspAB*, *sspB*, *clpX* y *clpXP*

Los genes u operones *sspAB*, *sspB*, *clpX* y *clpXP* junto con sus regiones adyacentes, incluyendo la región promotora, se amplificaron mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores YeO8SspAmutf y YeO8SspAmutr para amplificar *sspAB*; SSpBcomF y SSpBcomR para amplificar *sspB*, y ClpXPcomF y ClpXPcomR para amplificar *clpXP*. Los fragmentos de PCR obtenidos (1.8 kb para *sspAB*, 0.9 kb para *sspB* y 2.6 kb para *clpXP*) se purificaron a partir de un gel de agarosa. Los fragmentos de *sspAB* y *sspB* se fosforilaron empleando T4 polinucleótido quinasa y se clonaron en el plásmido de medio número de copia pTM100 (244), previamente digerido con *Scal*, obteniéndose los plásmidos pTMsspAB y pTMsspB, respectivamente. Todos los fragmentos clonados fueron secuenciados para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación. Los plásmidos se electroporaron en *E. coli* C600. En estos plásmidos cada gen está bajo el control de su propio promotor. Estos plásmidos se introdujeron en las distintas cepas de *Yersinia*, mediante electroporación o conjugación con ayuda de la cepa de *E. coli* HB101/pRK2013.

Por otra parte, el fragmento de PCR *clpXP* purificado se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* y se clonó en el plásmido de medio número de copia pBAD30 (154) digerido con *EcoRI* y *XbaI*, obteniéndose el plásmido pBAD*clpXP*. El fragmento clonado se secuenció para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación. En este plásmido el operón *clpXP* está bajo el control de su propio promotor. Dicho plásmido se electroporó en *E. coli* C600 y se introdujo en las distintas cepas de *Yersinia* por

electroporación. Este plásmido se empleó para complementar tanto la mutación del gen *clpX* como la mutación del operón *clpXP*.

3.3. Construcción de un plásmido para sobreexpresar el gen *hns*.

El gen *hns* se amplificó mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y los cebadores denominados YeO8H-NSF y YeO8H-NSR. El fragmento de PCR (687 bp) se purificó a partir de un gel de agarosa, se digirió con *EcoRI* y *KpnI*, y se clonó en el plásmido pBAD30 (154) digerido con *EcoRI* y *KpnI*, obteniéndose el plásmido pBAD30*hns*. El fragmento clonado se secuenció para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación.

4. CONSTRUCCION DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES

4.1. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{virF}::cat$ y $P_{yopE}::cat$

Las regiones promotoras de los genes *virF* y *yopE* se amplificaron mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores *virFPf/virFPr* y *YopEPf/YopEPr*, respectivamente. Los cebadores se diseñaron a partir del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Y_enterocolitica/). Los fragmentos de PCR obtenidos (342 pb para la región promotora de *virF*, 442 pb para la región promotora de *yopE*) se purificaron a partir de un gel de agarosa, se digirieron con *BamHI* y *HindIII*, y se clonaron en el plásmido pKK232.8 (Amersham Pharmacia Biotech), digerido con *BamHI* y *HindIII* para generar pKKP*virF* y pKKP*yopE*, que contienen las fusiones transcripcionales $P_{virF}::cat$ y $P_{yopE}::cat$, respectivamente. pKKP*virF* contiene el gen *cat* sin su propio promotor. Los fragmentos clonados se secuenciaron para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación.

4.2. Construcción de la fusión transcripcional $P_{hns}::lucFF$

La región promotora del gen *hns* se amplificó por PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y los cebadores ProHNSF y ProHNSRr. Los cebadores se diseñaron a partir del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Y_enterocolitica/). El fragmento de PCR obtenido (917 pb) se purificó a partir de un gel de agarosa, se digirió con *EcoRI*, y se clonó en el plásmido pGPL01 (153) digerido con *EcoRI* y *SmaI* para generar pGPLYePro*hns*, que contiene la fusión transcripcional $P_{hns}::lucFF$. pGPL01 contiene el gen *lucFF* sin su propio promotor y un origen de replicación R6K (153). El fragmento clonado se secuenció para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación. Un fragmento de ADN obtenido mediante digestión del plásmido pGPLYePro*hns* con *PstI* y *HindIII*, conteniendo la fusión transcripcional $P_{hns}::lucFF$, se clonó en el plásmido pUC18 (399) digerido con *PstI* y *HindIII* para obtener pUCYePro*hns*.

4.3. Construcción de la fusión transcripcional $P_{rovA}::lucFF$

La región promotora del gen *rovA* se amplificó mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y los cebadores YeO8ProvAf y YeO8ProvAr. Los cebadores se diseñaron a partir del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Y_enterocolitica/). El fragmento de PCR obtenido (1078 pb) se purificó a partir de un gel de agarosa y se clonó en el plásmido pUC18 (399) digerido con *HincII* para obtener pUCProvA. El fragmento clonado se secuenció para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación. A continuación, el gen *lucFF* se amplificó mediante PCR utilizando como molde el plásmido pRV34 (Venho R. y Skurnik M, construcción no publicada), la polimerasa *Vent* y los cebadores BCCP-1 y BCCP-2. El fragmento de PCR obtenido (1.4 kb) se purificó a partir de un gel de agarosa y se clonó en pUCProvA, previamente digerido con *KpnI* y tratado con el fragmento Klenow, para obtener pUCProvA*lucFF*, que contiene la fusión transcripcional $P_{rovA}::lucFF$. Finalmente, el fragmento *ProvA**lucFF* se amplificó

por PCR utilizando como molde el plásmido pUCProvAlucFF, la polimerasa *Vent* y los cebadores YeO8ProvAf y BCCP-2. El fragmento de PCR obtenido (2.5 kb) se purificó a partir de un gel de agarosa, se fosforiló con la T4 polinucleótido quinasa y se clonó en el sitio *EcoRV* del plásmido suicida pRV1 (399) para obtener pRVProvAlucFF.

4.4. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{sspA}::lucFF$ y $P_{clpP}::lucFF$

Las regiones promotoras de los operones *sspAB* y *clpXP* se amplificaron mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores PsspAF/PsspAR y ProClpPF/ProClpPR, respectivamente. Los cebadores se diseñaron a partir del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Y_enterocolitica/). Los fragmentos de PCR obtenidos (579 pb para la región promotora de *sspAB* y 603 pb para la región promotora de *clpXP*) se purificaron a partir de un gel de agarosa, se digirieron con *EcoRI*, y se clonaron en el plásmido pGPL01Tp digerido con *EcoRI* y *SmaI* para obtener pGPLTpP*clpP* y pGPLTpP*sspA*, que contienen las fusiones transcripcionales $P_{sspA}::lucFF$ y $P_{clpP}::lucFF$, respectivamente. pGPL01Tp es un derivado del plásmido pGPL01 (153) en el que se clonó un casete que confiere resistencia a trimetropina, obtenido mediante digestión con *PstI* del plasposón p34S-Tp (110), en el sitio *PstI* del gen de la β -lactamasa de pGPL01. pGPL01Tp confiere únicamente resistencia a trimetropina. Las regiones promotoras clonadas se secuenciaron para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación.

4.5. Construcción de las fusiones transcripcionales $P_{sspA}::gfp$ y $P_{clpP}::gfp$

Las regiones promotoras de los operones *sspAB* y *clpXP* se amplificaron mediante PCR utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y las parejas de cebadores PsspAF/PsspAR y ProClpPF/ProClpPR, respectivamente. Los cebadores se diseñaron a partir del

genoma secuenciado de *Y. enterocolitica* O:8 8081 (Wellcome Trust Sanger Institute; www.sanger.ac.uk/Projects/Y_enterocolitica/). Los fragmentos de PCR obtenidos (579 pb para la región promotora de *sspAB* y 603 pb para la región promotora de *clpXP*) se purificaron a partir de un gel de agarosa, se digirieron con *EcoRI* y se clonaron en el plásmido pPROBE'-gfp[LVA] digerido con *EcoRI-SmaI* (251) para obtener pPROBEProsspA y pPROBEPproclpP, que contienen las fusiones transcripcionales $P_{sspA}::gfp$ y $P_{clpP}::gfp$. Los fragmentos clonados se secuenciaron para comprobar que no se habían introducido errores durante la amplificación.

5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CLORANFENICOL ACETILTRANSFERASA

La determinación de la actividad cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) se realizó según el protocolo descrito por Fournier y colaboradores (134). Para la preparación de la muestra, las cepas indicadoras con la construcción $P_{virF}::cat$ se crecieron en medio TSB, mientras que las cepas indicadoras con la construcción $P_{yopE}::cat$ se crecieron en medio TSBox. En todos los casos, las cepas se incubaron a 21°C durante 16 h con agitación. A continuación, los cultivos se diluyeron en TSB o TSBox (1:15) y se crecieron a 21°C durante 2.5 h, con agitación. Seguidamente, los cultivos se crecieron a 37°C durante 1.5 h, con agitación. Tras medir la DO_{540} de los cultivos, las bacterias se recogieron por centrifugación (17500 x g, 15 min, 4°C), se lavaron con 1 ml de solución 1 M Tris-HCl (pH 8) y finalmente se resuspendieron en 800 µl de 1 M Tris-HCl (pH 8). Las muestras se sonicaron a 4°C (4 ciclos de 30 s de sonicación y 30 s de reposo) empleando un sonicador (BRANSON *Digital sonifier*) con la micropunta de 1/8" de diámetro y usando una amplitud del 10%. Los restos celulares se precipitaron por centrifugación (17500 x g, 5 min, 4°C) y los sobrenadantes se guardaron para medir la actividad CAT.

Previo a la medida de la actividad CAT, se determinó la concentración de proteínas presentes en los sobrenadantes. Para ello se siguió un protocolo basado en el método descrito por Bradford, según el cual las proteínas

presentan afinidad por el azul de Coomassie (54). Se preparó un banco de diluciones patrón con diferentes concentraciones de BSA (PIERCE) en 1 ml de agua. Por otra parte, se diluyó un determinado volumen de muestra en 1 ml de agua. A continuación se añadió 1 ml de una mezcla 1:1 de *Coomassie Protein Assay Reagent* (PIERCE):Agua a todas las preparaciones (patrón y muestras) y se mezclaron usando un agitador tipo vórtex. Finalmente, la absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de 595 nm utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec 500 pro, Biochrom).

Para la medición de la actividad CAT, se dispusieron 100 μ l de sobrenadante (aprox. 30 μ g de proteína) en un tubo tipo Eppendorf® y se añadieron 1 ml de reactivo (1 ml de DNTB [4 mg/ml en 1 M Tris-HCl, pH 8], 200 μ l de 5 mM AcetilCoA y 9 ml de agua) y 11 μ l de 10 mM Cm. Tras agitar la mezcla, se midió la DO₄₁₂ a los 5 s y 65 s. Los resultados de la actividad CAT se expresaron como unidades de enzima por μ g de proteína y se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad CAT} = \frac{\text{DO}_{412} \text{ 65 s} - \text{DO}_{412} \text{ 5 s}}{13.6 \times \mu\text{g de proteína}}$$

Las medidas se realizaron por duplicado en tres ocasiones independientes.

6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA

Para analizar la traducción de *inv*, se usó la construcción previamente descrita por Pepe y colaboradores (278), en la que se mide la actividad fosfatasa alcalina en cepas indicadoras portadoras de la construcción *inv::phoA* (278), y se utilizó el protocolo descrito por Manoil y colaboradores (230). 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 s 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.

7. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Los niveles de expresión de los genes *rovA*, *hns* y de los operones *flhDC*, *sspAB* y *clpXP* de *Y. enterocolitica* 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* (apartados 4.2, 4.3 y 4.4). Las cepas indicadoras se crecieron en LB durante 16 h con

agitación, a 21 ó 37°C en función de la determinación a realizar. Los cultivos se refrescaron en las mismas condiciones de cultivo y se dejaron crecer hasta alcanzar una DO_{540} de 1.2 (aprox.). En ocasiones, se determinó la actividad luciferasa de un mismo cultivo a diferentes DO_{540} . En todos los casos, se mezclaron 100 μ l del cultivo bacteriano 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 (Hidex o *Lumat LB 9507* de Berthold Technologies). Los resultados se expresaron como unidades relativas de luz (URL) por DO_{540} (URL/ DO_{540}). Las medidas se realizaron por duplicado en al menos tres ocasiones independientes.

8. MEDIDA DE FLUORESCENCIA

La expresión de los operones *sspAB* y *clpXP* se analizó en cepas portadoras del plásmido con la fusión transcripcional entre la región promotora de dichos operones y el gen *gfp* (fusiones transcripcionales $P_{sspA}::gfp$ y $P_{clpP}::gfp$, plásmidos pPROBEProsspA y pPROBEPproclpP). Las cepas indicadoras se crecieron en LB durante 16 h con agitación, a 21°C. Los cultivos se refrescaron en las mismas condiciones de cultivo y se dejaron crecer hasta alcanzar una densidad óptica DO_{540} de 1.2. Las células se recogieron mediante centrifugación (2000 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 un 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 pPROBEProsspA y pPROBEPproclpP.

9. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE H-NS EN *Y. enterocolitica*

Para el análisis de la expresión de H-NS, las cepas de *Y. enterocolitica* se crecieron en LB o en TSB, a 21 o a 37°C, o bien en TSBox (medio con Ca²⁺ quelado) a 37°C, en función del experimento. Todos los cultivos se crecieron durante 16 h y se refrescaron hasta alcanzar diferentes DO₅₄₀, en función del experimento. En ese momento se realizaron diluciones seriadas del cultivo, que se plaquearon en LB agar con el antibiótico adecuado para determinar con exactitud el número de ufc por ml. Se centrifugaron 1.5 ml de la suspensión celular (17500 x g, 5 min, 4°C) y el precipitado se resuspendió en un determinado volumen de 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 μl y se normalizó entre muestras según el número de u.f.c por ml. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) y Western Blot usando anticuerpo anti-HNS (apartado 14).

10. 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°C y total ausencia de iones calcio (164, 245). Para analizar la secreción de Yops, las bacterias se crecieron en LB a 21°C durante 16 h. A continuación, el cultivo se diluyó 1:50 en 25 ml de medio TSBox en matraces de 100 ml de capacidad. El cultivo se creció durante 3 h a 21°C con agitación (180 rpm). Transcurrido este tiempo, el cultivo se transfirió a 37°C y se continuó la incubación en agitación (180 rpm) durante 3 h más. Al finalizar este período, se midió la DO₅₄₀ 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 (2000 x g, 30 min, 4°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°C, los precipitados se

recogieron por centrifugación (2000 x *g*, 30 min, 4°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 μl y se normalizó entre muestras según el número de ufc por ml. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su análisis mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie, que se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 11.

Por otra parte, para poder analizar no sólo la secreción de Yops al medio extracelular sino también la cantidad de Yops presente en el citosol de la bacteria, se realizó el protocolo descrito anteriormente con las siguientes modificaciones:

Las bacterias se crecieron en 2 ml de LB a 21°C durante 16 h. A continuación se inocularon 600 μl del cultivo en 25 ml de medio TSB_{Box}, usando matraces de 100 ml de capacidad. El cultivo se creció durante 2 h a 21°C con agitación (180 rpm). Transcurrido este tiempo, el cultivo se transfirió a 37°C y se continuó la incubación durante 1 h en agitación (180 rpm). A continuación, se midió la DO₅₄₀ del cultivo, se recogió una muestra de 1.5 ml del cultivo y las células se recuperaron por centrifugación (17500 x *g*, 3 min, 4°C). Por una parte, el precipitado bacteriano se resuspendió en tampón de carga 1X y se guardó a -20°C hasta su análisis por SDS-PAGE y Western Blot, usando un anticuerpo anti-YopE (apartado 14). Por otra parte, para extraer las Yops secretadas, se recogió 1 ml de sobrenadante al cual se añadió ácido tricloroacético (10% p/v). La mezcla se agitó usando un agitador tipo vórtex y se mantuvo en hielo durante 1 h como mínimo. Tras centrifugar la muestra (17500 x *g*, 30 min, 4°C), se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de acetona fría. El precipitado se recogió por centrifugación (17500 x *g*, 15 min, 4°C), y el tubo tipo Eppendorf® con el precipitado se dejó abierto durante 16 h para que se evaporara la acetona. Finalmente, la muestra se resuspendió 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 μl

y se normalizó entre muestras según el número de ufc por ml. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) y Western Blot, usando un anticuerpo anti-YopE (apartado 14).

11. 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 desnaturizantes de poliacrilamida con SDS se utilizó el equipo MINI-PROTEAN II™ de Bio-Rad. Se empleó un gel de poliacrilamida desnaturizante con SDS con un gradiente del 4% (gel de compactación) al 12% (gel de resolución). Se cargaron 20 µl por pocillo de las muestras previamente hervidas durante 5-10 min a 100°C, para su desnaturización. 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 70 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 1-4 h con una solución de 10% metanol y 10% ácido acético. Transcurrido este tiempo el gel se mantuvo en agua d.o.i..

12. ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS HeLa

El cultivo y la infección de células HeLa para ensayos de citotoxicidad se realizó siguiendo métodos ya descritos (135). Las células se crecieron en monocapa hasta alcanzar una confluencia del 80% y se infectaron con diferentes cepas de *Y. enterocolitica* con una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula durante 1 h (100:1). Después de fijar y permeabilizar las

células, se tiñó el citoesqueleto de actina con isotiocianato de faloidina-fluoresceína, y las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia.

13. TRANSLOCACIÓN DE LA PROTEÍNA YopE EN CÉLULAS HeLa

Para analizar la translocación de la proteína YopE al citosol de células HeLa, éstas se crecieron en placa de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) en medio RPMI 1640 (LabClinics) complementado con 1% de HEPES y 10% de STF. Al alcanzar una confluencia del 80%, las células se infectaron con diferentes cepas de *Y. enterocolitica* con una multiplicidad de infección 100:1 durante 3 h. A continuación, las células se lavaron dos veces con 500 µl de PBS y se añadieron 100 µl de una solución 500 µg/ml de proteinasa K en PBS. Tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente, la proteinasa K se inactivó añadiendo 100 µl de una solución 4 mM de PMSF. A continuación, las células se lisaron con 100 µl de una solución 1% de digitonina en PBS. Con la ayuda de un descamador celular, las células se recogieron en tubos tipo Eppendorf® y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, mezclando las muestras con un agitador tipo vórtex ocasionalmente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (17500 x g, 20 min, 4°C) y se recogieron 160 µl del sobrenadante, a los que se añadieron 40 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]). Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) y Western Blot usando anticuerpo anti-YopE (apartado 14).

14. ANÁLISIS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT

El análisis electroforético de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 11, pero utilizando un gradiente de poliacrilamida del 5% (fase de compactación) al 15% (fase de resolución).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana usando un sistema de transferencia semihúmeda (TRANS-BLOT[®] SD SemiDry Transfer Cell de Bio-Rad) y aplicando un voltaje de 10 V durante 35 min. Para el análisis de H-NS, se usó una membrana de PVDF de 0.45 μm de poro (*Immobilon-P membrane* de Millipore), mientras que en el caso de YopE se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro (Whatman[®] PROTRAN[®]). 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 PBS). 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 PBS). A continuación, se incubó la membrana durante 18 h a 4°C y agitación con el anticuerpo primario. Para la detección de H-NS se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-HNS (donado por el Dr. Antonio Juárez), diluido 1:50000 en tampón de bloqueo. 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, se incubó la membrana 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 (1 h, temperatura ambiente, agitación). Antes del revelado, se lavó la membrana dos veces con tampón de lavado (15 min, temperatura ambiente, 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.

15. ENSAYO DE MOTILIDAD

Las bacterias se crecieron en 1% triptona a 21°C durante 16 h. Por otro lado, se prepararon placas de Petri con medio de motilidad (1% triptona y 0.3% agar). Diversos trabajos han demostrado que éste es el medio óptimo para estudiar la motilidad del género *Yersinia* spp. (25, 402, 405). 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 ensayos independientes.

16. 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) de una cola o el test *t* de *Student* de dos colas, empleando el programa informático GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de *P* fue inferior de 0.05.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III Ysc EN UN MUTANTE DE *Y. enterocolitica* O:8 QUE NO EXPRESA LA CADENA O.

1.1. La secreción de Yops disminuye en un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O

En primer lugar, se analizó la secreción de Yops por la cepa silvestre *Y. enterocolitica* O:8 (YeO8) y el mutante que no expresa la cadena O (YeO8-R). A 37°C en medio TSB suplementado con 20 mM oxalato sódico y 20 mM cloruro magnésico (TSBox), YeO8 secretó mayores cantidades de Yops al sobrenadante del cultivo que YeO8-R (**Figura 15A**). El plásmido pLZ116, que complementa la expresión de la cadena O en YeO8-R (408), restauró la secreción de Yops a los niveles de la cepa silvestre (**Figura 15A**), indicando que la disminución de la secreción está relacionada con la ausencia de la cadena O. Dado que YeO8-R es un mutante que no expresa la cadena O seleccionado por su resistencia a la infección con un bacteriófago cuyo receptor es la cadena O de YeO8 (408), se utilizó un mutante definido que no expresa la cadena O por recombinación del vector suicida pRV*ddhB* (25). Este vector contiene un fragmento de 0.6 kb del gen *ddhB* del operón de la cadena O (25). Al igual que YeO8-R, YeO8::pRV*ddhB* secretó cantidades inferiores de Yops al sobrenadante del cultivo que YeO8 (**Figura 15A**). No se observaron diferencias en la tasa de crecimiento entre YeO8, YeO8-R y YeO8::pRV*ddhB* ni a temperatura ambiente, ni a 37°C, ni en condiciones de restricción de calcio (resultados no mostrados).

La menor secreción de Yops por parte de YeO8-R podría ser debida a que en esta cepa éstas se expresan en menor cantidad y/o a que no son secretadas con la misma eficacia que en la cepa silvestre. Para comprobarlo, se realizó un ensayo de secreción de Yops y se analizó por Western Blot la cantidad de YopE presente tanto en el citosol de YeO8 y YeO8-R como los niveles de YopE secretados por ambas cepas. Tras 1 h de incubación a 37°C, se observó que la cantidad de YopE presente en el precipitado bacteriano era

inferior en YeO8-R que en YeO8 (**Figura 15B**). Además, no se detectó YopE en el sobrenadante de YeO8-R (**Figura 15B**).

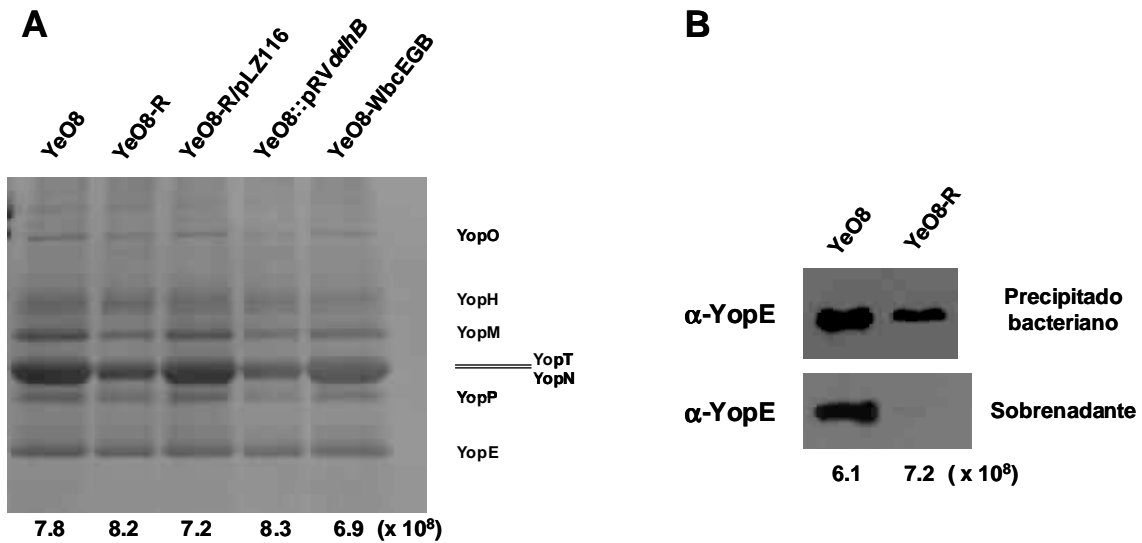


Figura 15. Análisis de la expresión de Yops en un mutante que no expresa la cadena O. (A) Electroforesis de las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos en condiciones de restricción de Ca^{2+} analizados mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. (B) Análisis por Western Blot de la cantidad de YopE presente en los precipitados y sobrenadantes de cultivos en condiciones de restricción de Ca^{2+} después de 1 h de incubación a 37°C . En la parte inferior de cada carril de los paneles A y B se indica el número de bacterias correspondientes al volumen cargado de sobrenadante. Los resultados en todos los paneles son representativos de tres experimentos independientes.

A continuación, se determinó cuál es la longitud mínima de la cadena O necesaria para que los niveles de secreción de Yops sean equivalentes a los de la cepa silvestre. Para ello se analizó la secreción de Yops por la cepa YeO8-WbcEGB, que expresa una sola unidad de cadena O en el LPS al presentar una mutación no polar en el gen *wzy* (polimerasa de la cadena O) (26). Este mutante secretó cantidades similares de Yops que YeO8, indicando que la presencia de una unidad de cadena O es suficiente para que los niveles de secreción de Yops sean los mismos que los de la cepa silvestre (**Figura 15A**).

1.2. La expresión de *virF* y *yopE* está disminuida en un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O

Una posible explicación a la menor secreción de YopE por YeO8-R sería que la expresión de *yopE* estuviera disminuida o incluso reprimida en YeO8-R. Por otra parte, como la expresión de los genes *yop* está regulada por la temperatura, y la expresión de muchos de ellos está activada por el regulador transcripcional VirF (85, 214, 351), también pudiera ser que la expresión del gen *virF* estuviera alterada en YeO8-R.

Para estudiar si la expresión de *virF* y de *yopE* está alterada en YeO8-R se construyeron las fusiones transcripcionales $P_{virF}::cat$ y $P_{yopE}::cat$ en las cuales las regiones promotoras de *virF* o de *yopE* controlan la expresión de *cat*. Estas fusiones se introdujeron en YeO8 y YeO8-R y se determinó la actividad CAT. La fusión $P_{virF}::cat$ se expresó a un nivel más alto en YeO8 que en YeO8-R (248.0 ± 106.3 y 94.0 ± 12.4 U/ μ g de proteína, respectivamente; [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]). Además, la expresión de la fusión $P_{yopE}::cat$ fue también significativamente superior en YeO8 que en YeO8-R (435.8 ± 54.2 y 15.7 ± 0.9 U/ μ g de proteína, respectivamente; [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]). Estos resultados sugieren que la ausencia de la cadena O actúa negativamente sobre la transcripción de elementos del virulón *yop*.

1.3. Un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O no induce citotoxicidad en células HeLa

La inyección de YopE en el citosol de células HeLa por parte de YeO8 induce la interrupción y condensación de la estructura de los microfilamentos de actina de las células (309, 378). Este fenómeno ha recibido el nombre de citotoxicidad y es una de las formas más sensibles para detectar la translocación de Yops al citosol de la célula eucariota (312). Puesto que en YeO8-R la expresión y la secreción de YopE son inferiores que en la cepa silvestre, se estudió si la capacidad de YeO8-R de inducir citotoxicidad también estaba reducida. La **Figura 16A** muestra como las células HeLa infectadas con

YeO8-R presentan los microfilamentos de actina intactos, lo cual se correlacionó con la falta de translocación de YopE por parte de YeO8-R (Figura 16B). El plásmido pLZ116 complementó estos fenotipos (Figuras 16A y 16B).

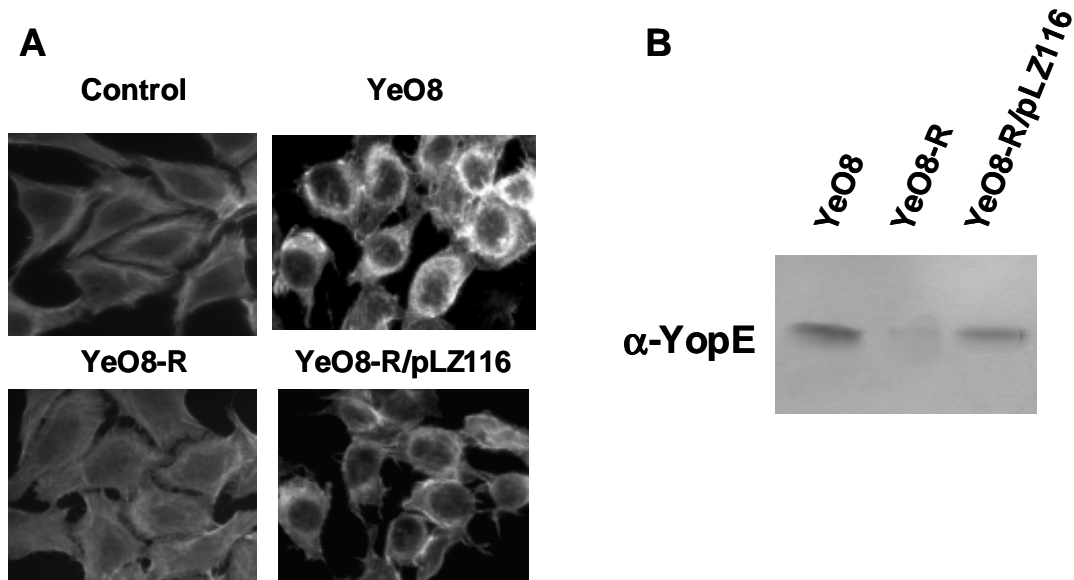


Figura 16. Análisis de la translocación de Yops y efecto citotóxico en un mutante que no expresa la cadena O. (A) Desorganización de los filamentos de actina en células HeLa infectadas con YeO8, YeO8-R o YeO8-R/pLZ116. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia. (B) Translocación de YopE en las células HeLa por YeO8, YeO8-R, o YeO8-R/pLZ116. Los resultados en todos los paneles son representativos de tres experimentos independientes.

1.4. La sobreexpresión de *flhDC* se asocia con una menor secreción de Yops en *Y. enterocolitica* O:8

Bleves y colaboradores (44) demostraron que el virulón *yop* y el operón *flhDC* están relacionados. Estos autores describieron que un mutante *flhDC* de *Y. enterocolitica* serotipo O:9 secreta más Yops que la cepa silvestre, lo cual sugiere que *flhDC* reprime la expresión del virulón *yop* (44). Más aún, la sobreexpresión de *flhDC* en la cepa silvestre disminuyó la secreción de Yops (44). Estos resultados y el hecho de que *flhDC* esté sobreexpresado en YeO8-R (25) sugieren que la represión de la secreción de Yops en YeO8-R puede ser consecuencia, directa o indirecta, de la sobreexpresión de *flhDC*. Sin embargo, Young y Young (400) no encontraron ningún vínculo entre *flhDC* y el virulón *yop* en YeO8.

Con el fin de comprobar si la sobreexpresión de *flhDC* en YeO8-R es responsable de la disminución de la secreción de Yops, se analizó dicha secreción en YeO8-R deficiente para *flhDC*. Esta cepa se construyó por mutagénesis dirigida usando el vector suicida pKNOCK-FlhDC (25). Este vector ya ha sido utilizado por nuestro grupo para construir mutantes no motiles de *Yersinia* (25). El mutante YeO8-R deficiente en *flhDC* secretó niveles más altos de Yops que YeO8-R y la cantidad fue similar a la secretada por YeO8 (**Figura 17A**). Además, empleando el mismo vector suicida, se construyó una cepa de YeO8 mutante para *flhDC* (25). Esta cepa secretó niveles de Yops más altos que YeO8-R, pero similares a los secretados por YeO8 y por el mutante YeO8-R deficiente en *flhDC* (**Figura 17A**). Estos resultados sugieren que los niveles elevados de FlhDC y/o de otra proteína regulada por FlhDC son los responsables de la represión del virulón *yop* en YeO8-R.

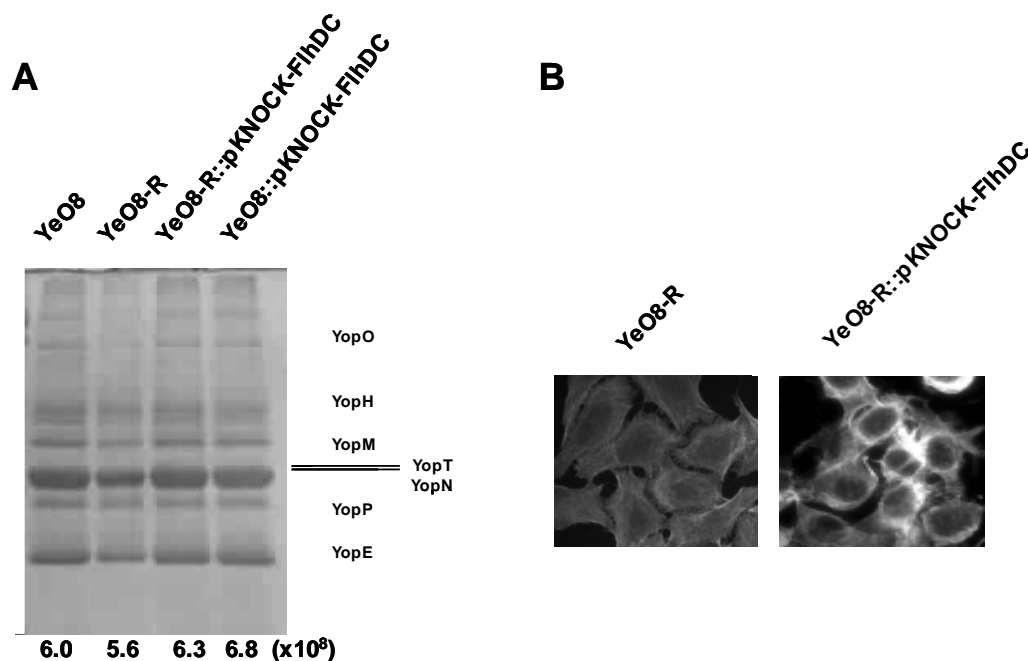


Figura 17. Análisis de la secreción y translocación de Yops en un mutante de la cadena O que no expresa *flhDC*. (A) Electroforesis de las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos en condiciones de restricción de Ca^{2+} analizados mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. En la parte inferior de cada carril se indica el número de bacterias correspondientes al volumen cargado de sobrenadante. (B) Desorganización de la actina inducida por YeO8-R::pKNOCK-FlhDC, un mutante que no expresa la cadena O ni *flhDC*. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia. Como control se incluyen células no infectadas. Los resultados en todos los paneles son representativos de tres experimentos independientes.

Por otra parte, la infección de células HeLa con YeO8-R deficiente en *flhDC* desencadenó la condensación de los microfilamentos de actina (**Figura 17B**). Por tanto, la mutación de *flhDC* en YeO8-R también restablece la citotoxicidad dependiente de la translocación de YopE (**Figura 16A**).

1.5. H-NS es un regulador positivo de la expresión de *flhDC* en *Y. enterocolitica* O:8

En *E. coli*, H-NS es un activador de la expresión de *flhDC* (34) y, por consiguiente, se planteó si la sobreexpresión de *flhDC* en YeO8-R podría deberse a la existencia de niveles anómalos de H-NS. Lo primero que se comprobó fue si la expresión de *flhDC* estaba regulada por H-NS. Para ello se introdujo la fusión transcripcional $P_{flhDC}::lucFF$ (pRFIhDCO8 [(25)]) en las cepas de *E. coli* BSN26 y BSN27, cepa silvestre y mutante isógeno que no expresa H-NS respectivamente (191), y se midió la actividad luciferasa. La cantidad de luz fue inferior en el mutante deficiente en *hns* que en la cepa silvestre ($5,367 \pm 656$ y $221,300 \pm 10,611$ URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]). Estos resultados sugieren que H-NS también podría actuar como activador de *flhDC* en *Yersinia*.

A continuación se estudió el efecto de H-NS sobre la expresión de *flhDC*, analizando si la sobreexpresión de H-NS en YeO8 induce la sobreexpresión de *flhDC*. Con este fin, se introdujo el plásmido de medio número de copia pBAD*hns*, en el cual *hns* está bajo el control de su propio promotor, en YeO8 que contenía la fusión transcripcional $P_{flhDC}::lucFF$ (25), y se midió la cantidad de luz. La expresión de *flhDC* fue significativamente superior ($P < 0.05$ por análisis de la varianza [ANOVA] de una cola) en la cepa que portaba el plásmido pBAD*hns* ($30,590 \pm 840$ URL/DO₅₄₀) que en la cepa que contenía pBAD30 ($8,473 \pm 208$ URL/DO₅₄₀) o la cepa que no contenía ningún plásmido ($12,360 \pm 2,413$ URL/DO₅₄₀). En *Y. enterocolitica* la sobreexpresión de *flhDC* está relacionada con un aumento de la motilidad (25, 405). Por tanto, se determinó el efecto de sobreexpresar H-NS en la motilidad de YeO8 en el medio de motilidad (1% triptona y 0,3% agar [(25, 405)]). Previamente se ha demostrado que la motilidad de *Yersinia* es óptima en este medio en

comparación con el medio LB (25, 405). La cepa de YeO8 portadora del plásmido pBAD*hns* presentó una mayor motilidad (3.2 ± 0.3 cm [$P < 0.05$ análisis de la varianza [ANOVA] de una cola]) que la cepa portadora de pBAD30 (2.0 ± 0.1 cm) o que YeO8 sin ningún plásmido (1.9 ± 0.2 cm).

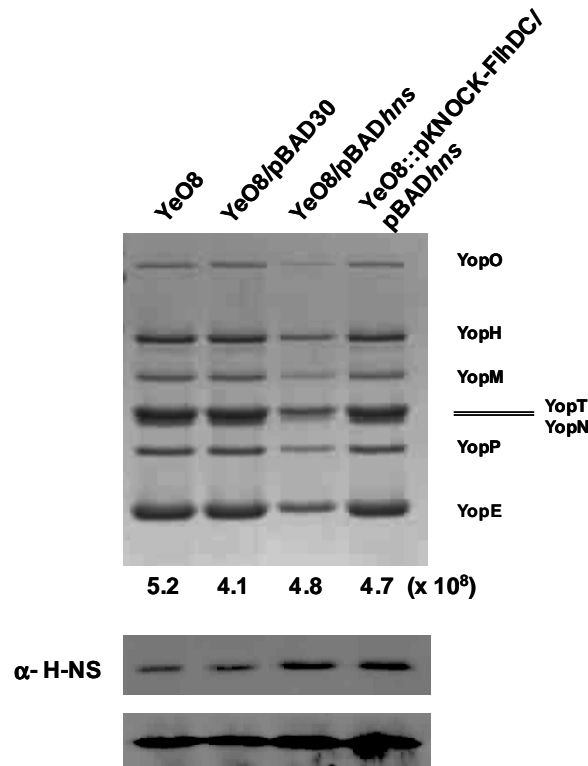


Figura 18. Análisis del efecto de H-NS sobre la secreción de Yops. Electroforesis de las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos en condiciones de restricción de Ca^{2+} mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. En la parte inferior se muestran los niveles de H-NS presentes en las cuatro cepas crecidas en TSBox a 37°C analizados por Western Blot. El panel inferior muestra los niveles de una proteína inespecífica que también fue detectada por el anticuerpo anti-HNS en los lisados celulares totales. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

A continuación, se estudió si la sobreexpresión de H-NS en YeO8 causaba una reducción en la secreción de Yops. Los resultados mostrados en la **Figura 18** demuestran que YeO8 con pBAD*hns* secretó menos Yops que YeO8 con pBAD30 o YeO8 sin ningún plásmido. Por otra parte, la cepa YeO8 mutante para *flhDC* con el plásmido pBAD*hns* secretó cantidades similares de Yops que YeO8 (**Figura 18**), respaldando así la hipótesis de que H-NS altera la secreción de Yops mediante su influencia sobre la expresión de FlhDC y/o otra proteína regulada por FlhDC.

Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de H-NS en YeO8 recapitula algunos de los fenotipos de YeO8-R: la sobreexpresión de *flhDC* y una mayor motilidad así como una menor secreción de Yops que la cepa silvestre.

1.6. Un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O presenta niveles más altos de H-NS que la cepa silvestre

Los resultados obtenidos sugieren que H-NS podría estar sobreexpresado en YeO8-R. Para comprobar esta hipótesis, se midieron por Western Blot los niveles de H-NS en YeO8 y YeO8-R crecidas tanto a temperatura ambiente, a 37°C y a 37°C en condiciones de restricción de calcio (Figura 19). Los niveles de H-NS en YeO8-R fueron consistentemente superiores que los encontrados en YeO8 en todas las condiciones probadas.

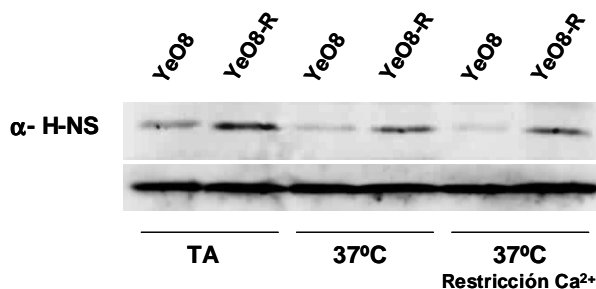


Figura 19. Análisis de la expresión de H-NS. Análisis por Western Blot de la expresión de H-NS por parte de YeO8 y YeO8-R crecidas en TSB a 21°C (TA: temperatura ambiente), a 37°C o en TSB_{ox} a 37°C (sin Ca²⁺). El panel inferior muestra los niveles de una proteína inespecífica que también fue detectada por el anticuerpo en los lisados celulares totales. Los niveles de proteína son comparables entre carriles, indicando que se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Para determinar si las diferencias en los niveles de H-NS encontrados en YeO8 y YeO8-R son debidos a cambios en la transcripción de *hns*, se construyó la fusión transcripcional $P_{hns}::lucFF$. El plásmido obtenido, pUCYeProHNS, se introdujo en YeO8 y YeO8-R, y se midió la cantidad de luz. La expresión de *hns* no fue significativamente diferente entre YeO8 y YeO8-R crecidas tanto a temperatura ambiente ($1,231,000 \pm 210,800$ y $1,275,000 \pm 138,800$ URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P > 0.05$ por el test *t* de Student de dos

colas]), como a 37°C ($206,100 \pm 7,398$ y $209,600 \pm 14,990$ URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P > 0.05$ por el test *t* de *Student* de dos colas]), o en condiciones de restricción de calcio ($546,800 \pm 73,270$ y $599,900 \pm 64,140$ URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P > 0.05$ por el test *t* de *Student* de dos colas]). Por tanto, estos resultados indican que las diferencias entre los niveles de proteína H-NS no se pueden explicar por diferencias a nivel transcripcional de *hns*. Esto sugiere que la ausencia de la cadena O afecta a la regulación post-transcripcional de H-NS.

El análisis de la secreción de Yops y de la expresión de *flhDC* en un mutante *hns* de YeO8-R aportaría información valiosa. No obstante, no se pudo construir este mutante, puesto que *hns* es un gen esencial en *Yersinia* (25, 120, 171). Williamson y colaboradores (391) describieron que la proteína H-NST, derivada de H-NS pero sin el dominio de unión al ADN codificada por *E. coli* enteropatógena (EPEC), actúa como un dominante negativo de H-NS. H-NST_{EPEC} ha sido utilizada por Baños y colaboradores (21) para demostrar la regulación global dependiente de H-NS en *Y. enterocolitica* O:9. Sin embargo, la expresión de H-NST_{EPEC} en YeO8 causó importantes deficiencias en el crecimiento de la bacteria, lo que impidió cualquier análisis posterior.

2. ESTUDIO DEL CIRCUITO DE REGULACIÓN QUE MODULA LA EXPRESIÓN DE *inv* Y *flhDC* EN UN MUTANTE DE *Y. enterocolitica* O:8 QUE NO EXPRESA LA CADENA O

A pesar de que el mutante YeO8-R se complementó con el plásmido pLZ116, para profundizar en el estudio de los efectos de la ausencia de la cadena O sobre la regulación de otros factores de virulencia se construyó un nuevo mutante que no expresa la cadena O mediante doble recombinación homóloga. Este nuevo mutante contiene una delección en *manC*. ManC es esencial para la síntesis de manosa, azúcar que forma parte de la cadena O de YeO8 (347). El mutante obtenido, YeO8- Δ *manC*, recapituló todos los fenotipos anteriormente descritos para YeO8-R (resultados no mostrados).

2.1. La represión de *inv* en un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O es consecuencia de los altos niveles de FlhDC y no de variaciones transcripcionales de la expresión de *rovA*

Bengoechea y colaboradores (25) demostraron que los niveles de expresión de *flhDC* en YeO8-R son superiores a los de la cepa silvestre. Por el contrario, los niveles de *inv* son inferiores en YeO8-R respecto a los de la cepa silvestre. Tanto en *Y. enterocolitica* como en *Y. pseudotuberculosis*, se ha demostrado que RovA es el activador transcripcional de *inv* y contrarresta la represión causada por el complejo H-NS-YmoA (120, 264, 298). Por consiguiente, la reducción de la expresión de *inv* en un mutante de YeO8 que no expresa la cadena O podría ser causada por una menor expresión del activador transcripcional RovA en dicha cepa. Para comprobarlo, se construyó la fusión transcripcional $P_{rovA}::lucFF$ (pRVP $_{rovA}$ LucFF) y se introdujo en las cepas YeO8 y YeO8- Δ *manC*. Sin embargo, la expresión de *rovA* no fue significativamente diferente entre YeO8 y YeO8- Δ *manC* ($57,590 \pm 3,034$ y $65,070 \pm 4,148$ URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P > 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]). Estos resultados indican que la disminución de la expresión de *inv* en YeO8- Δ *manC* respecto a la cepa silvestre no se debe a una menor

transcripción de *rovA* en el mutante. En cualquier caso, no se puede descartar que la regulación post-transcripcional de RovA esté alterada en YeO8- $\Delta manC$.

Por otra parte, Badger y Miller (18) demostraron que la motilidad y la expresión de *inv* están regulados de forma coordinada en *Y. enterocolitica*. Así, la expresión de *inv* está reducida en un mutante con hipermotilidad. Dado que el aumento de la motilidad está relacionado con la sobreexpresión de *flhDC* (25, 405) y que *flhDC* está sobreexpresado en los mutantes de YeO8 deficientes en la cadena O, se planteó la posibilidad de que la sobreexpresión de *flhDC* podría ser responsable de la menor expresión de *inv* en dichos mutantes. Para comprobar esta hipótesis, se construyó el mutante doble YeO8- $\Delta flhDC$ - $\Delta manC$ y se midieron los niveles de *inv* comparándolos con aquellos de YeO8, y YeO8- $\Delta manC$. Todas estas cepas contenían la fusión traduccional *inv::phoA* descrita por Pepe y colaboradores (278). Los niveles de *inv* en el mutante YeO8- $\Delta flhDC$ - $\Delta manC$ fueron superiores a los obtenidos en la cepa YeO8- $\Delta manC$ y comparables a los obtenidos en YeO8 (**Figura 20**). Estos resultados sugieren que los niveles elevados de FlhDC y/o de otra proteína regulada por FlhDC contribuyen a la represión de *inv* en YeO8- $\Delta manC$.

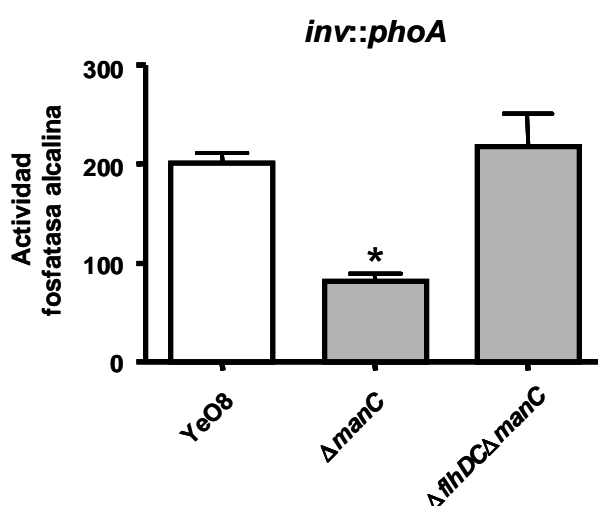


Figura 20. Análisis de la expresión de *inv* en los mutantes YeO8- $\Delta manC$ y YeO8- $\Delta flhDC$ - $\Delta manC$. Expresión de *inv* en YeO8, YeO8- $\Delta manC$ ($\Delta manC$) y YeO8- $\Delta flhDC$ - $\Delta manC$ ($\Delta flhDC$ - $\Delta manC$). *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$, test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.2. Efecto de la proteasa ClpXP sobre la expresión de *inv* y *flhDC*

Se ha descrito que, en *S. enterica* serovar *Typhimurium*, la proteasa dependiente de ATP ClpXP está implicada en la regulación post-transcripcional de los niveles de FlhDC (372). Así, un mutante ClpXP presenta hipermotilidad y expresa niveles elevados de FlhDC (371, 372). Por tanto, la hipermotilidad y los niveles elevados de FlhDC en los mutantes que no expresan la cadena O de YeO8 se podrían explicar si la ausencia de la cadena O afectara a la expresión y/o funcionalidad de la proteasa ClpXP. En primer lugar, se estudió la expresión del operón *clpXP* en YeO8 y YeO8- Δ *manC*. Con este fin, se construyó la fusión transcripcional $P_{clpP}::lucFF$, se introdujo en las cepas indicadas anteriormente y se midió la actividad luciferasa. La expresión del operón *clpXP* fue inferior en YeO8- Δ *manC* que en YeO8 (107100 ± 4316 y 411400 ± 19110 URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]).

Para analizar si los bajos niveles de expresión de *clpXP* observados en un mutante de la cadena O explicaban la hipermotilidad de este mutante así como los elevados niveles de expresión de *flhDC* (25), se construyó un mutante deficiente en *clpXP*, YeO8- Δ *clpXP**Km*, y se analizó su motilidad. Esta cepa presentó una mayor motilidad que la cepa silvestre (**Figura 21**). Dado que la subunidad ClpP se puede asociar con las ATPasas ClpA ó ClpX (144, 201, 394) es posible que el fenotipo de hipermotilidad del mutante *clpXP* no sea causado por la ausencia de la proteasa ClpXP. Para comprobar esta posibilidad, se construyó un mutante deficiente en *clpX*, YeO8- Δ *clpX*, y se estudió su motilidad. En la **Figura 21** se muestra que YeO8- Δ *clpX* presentó una motilidad mayor que la cepa silvestre. Estos resultados demuestran que es la ausencia de ClpXP y no la de ClpAP la responsable de la hipermotilidad del mutante *clpXP*.

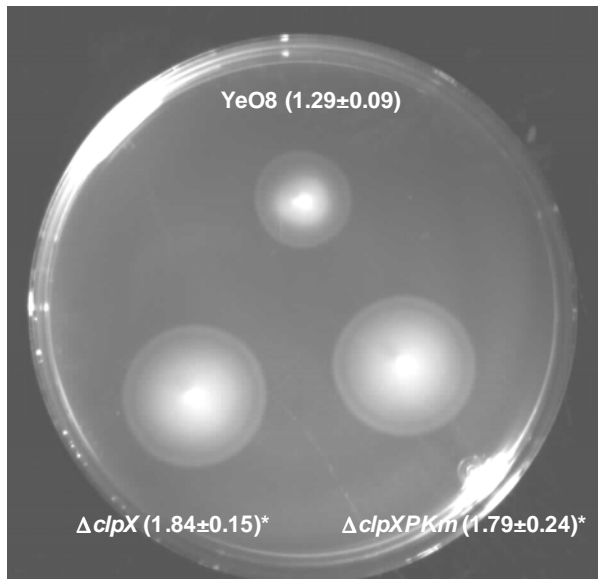


Figura 21. Análisis de la motilidad en los mutantes YeO8- Δ clpX y YeO8- Δ clpXP. Motilidad de las cepas YeO8, YeO8- Δ clpX (Δ clpX) y YeO8- Δ clpXPkm (Δ clpXPkm) crecidas a 21°C. Ensayo de motilidad en placas de medio de motilidad (1% triptona-0,3% agar). Los resultados muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre.

Para determinar si el aumento en la motilidad observado en las cepas YeO8- Δ clpX y YeO8- Δ clpXPkm se correlaciona con una mayor expresión de *flhDC* en dichas cepas, se les introdujo la fusión transcripcional $P_{flhDC}::lucFF$ y se midió la actividad luciferasa. Se observó que la expresión de *flhDC* no fue diferente entre las cepas mutantes y la cepa silvestre (**Figura 22**). Puesto que el aumento de la motilidad no se debe a un aumento en la expresión del operón *flhDC* en los mutantes YeO8- Δ clpX y YeO8- Δ clpXPkm es probable que, al igual que ocurre en *Salmonella* (371, 372), ClpXP controle post-transcripcionalmente los niveles de FlhDC.

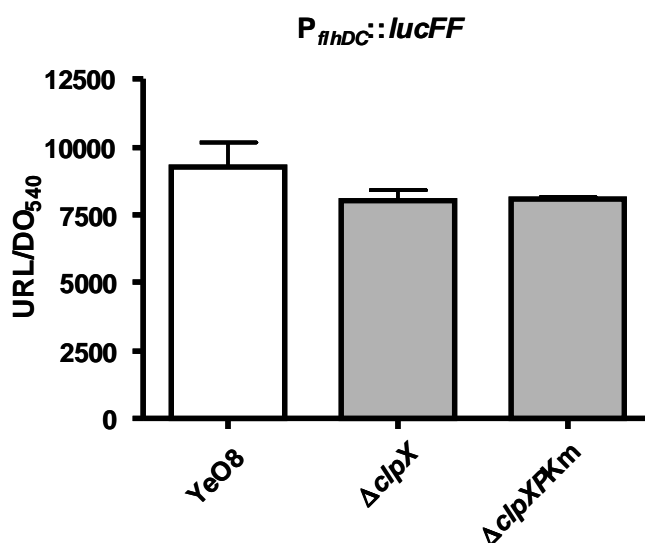


Figura 22. Análisis de la transcripción de *flhDC* en los mutantes YeO8- Δ clpX y YeO8- Δ clpXP. Expresión de *flhDC* en YeO8, YeO8- Δ clpX (Δ clpX) y YeO8- Δ clpXPkm (Δ clpXPkm). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por quintuplicado.

A continuación, se estudió la expresión de *inv* en los mutantes deficientes en *clpX* y *clpXP*. Para ello se introdujo la fusión traduccional *inv::phoA* en *YeO8-ΔclpX* y *YeO8-ΔclpXPkm* (278). Los resultados muestran que los niveles de expresión de *inv* en los mutantes son significativamente inferiores a los que presenta la cepa silvestre (**Figura 23**). Estos resultados indican que la expresión reducida de *inv* en un mutante que no expresa la cadena O puede ser causada por una expresión reducida de la proteasa ClpXP.

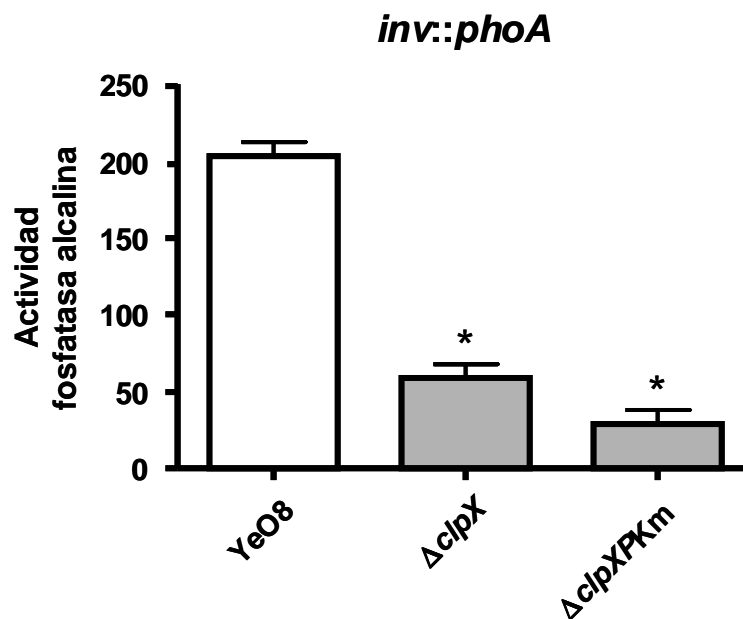


Figura 23. Análisis de la traducción de *inv* en los mutantes *YeO8-ΔclpX* y *YeO8-ΔclpXP*. Expresión de *inv* en *YeO8*, *YeO8-ΔclpX* ($\Delta clpX$) y *YeO8-ΔclpXPkm* ($\Delta clpXPkm$). *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Para descartar que la menor expresión de *inv* en los mutantes *clpX* y *clpXP* fuera debida a una menor expresión de *rovA*, se introdujo la fusión transcripcional $P_{rovA}::lucFF$ en estas cepas y se determinó la actividad luciferasa. La expresión de *rovA* no fue diferente entre las cepas mutantes y la cepa silvestre, ($P > 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas) (**Figura 24**).

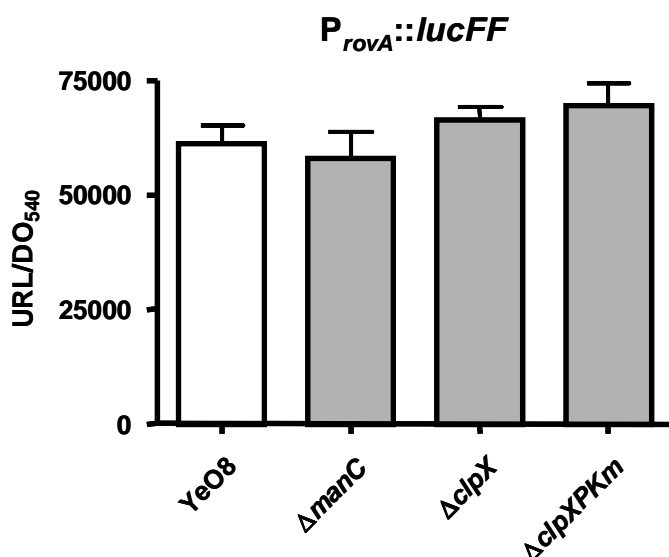


Figura 24. Análisis de la transcripción de *rovA* en los mutantes *YeO8-ΔclpX* y *YeO8-ΔclpXP*. Expresión de *rovA* en *YeO8*, *YeO8-ΔmanC* ($\Delta manC$), *YeO8-ΔclpX* ($\Delta clpX$) y *YeO8-ΔclpXPKm* ($\Delta clpXPKm$). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por quintuplicado.

De la misma manera que *YeO8-ΔmanC*, *YeO8-ΔclpX* presenta un fenotipo de hipermotilidad (**Figura 21**) y una expresión reducida de *inv*. Por tanto, se estudió si, al igual que en *YeO8-ΔmanC*, la mutación de *flhDC* restaura la expresión de *inv*. Para ello se introdujo la fusión *inv::phoA* en el doble mutante *YeO8-ΔflhDC-ΔclpX* y se determinó la actividad fosfatasa alcalina. En el doble mutante para *flhDC* y *clpX* el nivel de expresión de *inv* fue superior que en *YeO8-ΔclpX* y similar al obtenido en la cepa silvestre (*YeO8*) (**Figura 25**). Estos resultados indican que niveles elevados de FlhDC y/o de otra proteína regulada por FlhDC contribuyen a la represión de *inv* en *YeO8-ΔclpX*.

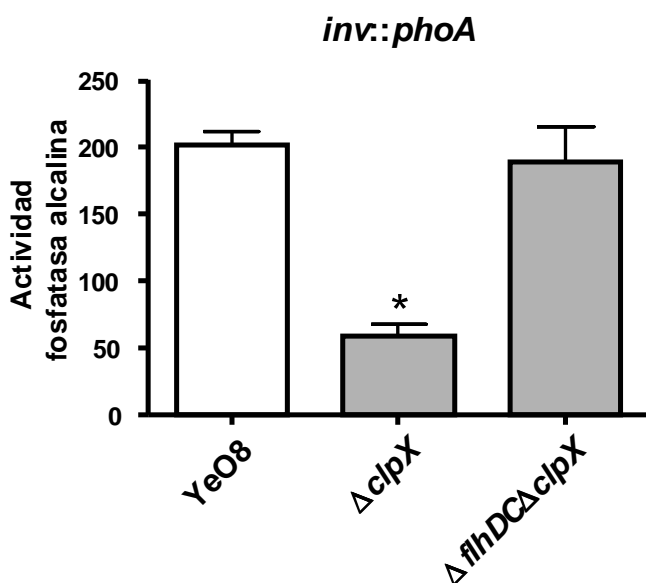


Figura 25. Análisis de la expresión de *inv* en los mutantes *YeO8-ΔclpX* y *YeO8-ΔflhDC-ΔmanC*. Análisis de los niveles expresión de *inv* a nivel traduccional en *YeO8*, *YeO8-ΔclpX* ($\Delta clpX$) y *YeO8-ΔflhDC-ΔclpX* ($\Delta flhDC\Delta clpX$). *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.3. Relación entre SspA/SspB y la expresión de *inv* y *flhDC*

SspA (“stringent starvation protein A”) está codificada junto con SspB en el operón *sspAB* del cromosoma de *Y. enterocolitica*. Es una proteína asociada a la ARN polimerasa. En *Y. enterocolitica*, se ha descrito que la expresión de *inv* y la motilidad están coordinadas por un circuito regulador en el que está implicada SspA, aunque se desconocen las bases moleculares de dicha regulación (18). Por tanto, se estudió si *sspA* y/o *sspB* forman parte del circuito en el que participan la cadena O, H-NS, *flhDC* e *inv*. En primer lugar, se analizó si la expresión de *sspA* está alterada en YeO8- Δ *manC*. Para ello, se introdujo la fusión transcripcional $P_{sspA}::lucFF$ en YeO8 y YeO8- Δ *manC* y se midió la actividad luciferasa. La expresión de *sspA* fue significativamente inferior en el mutante que no expresa la cadena O que en la cepa silvestre ($69,240 \pm 4,145$ y $236,000 \pm 12,360$ URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]).

Con el fin de estudiar el papel de SspA/SspB en la expresión de *inv* y *flhDC*, se construyeron los mutantes YeO8- Δ *sspABGB* y YeO8- Δ *sspBKm* y, posteriormente, se les introdujeron las fusiones *inv::phoA* y $P_{flhDC}::lucFF$ para analizar los niveles de expresión de *inv* y *flhDC* respectivamente. Los resultados muestran que la expresión de *inv* en los mutantes YeO8- Δ *sspABGB* y YeO8- Δ *sspBKm* fue inferior que aquella en la cepa silvestre (**Figura 26A**). Por otra parte, en ambos mutantes la expresión de *flhDC* fue inferior que en la cepa silvestre, de un modo significativo (**Figura 26B**). El plásmido pTM*sspAB* restauró parcialmente la expresión de *inv* y totalmente la expresión de *flhDC* en el mutante YeO8- Δ *sspABGB*; sin embargo el plásmido pTM*sspB* no restauró los niveles de expresión de *inv* y de *flhDC* en el mutante YeO8- Δ *sspBKm*.

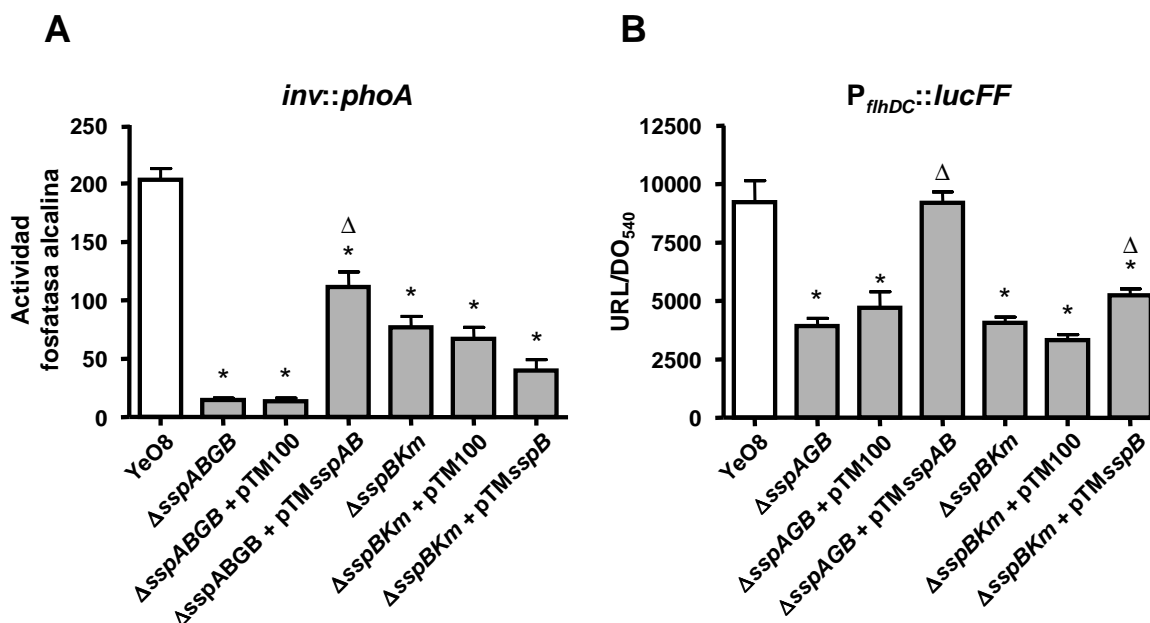


Figura 26. Análisis de la expresión de *inv* y *flhDC* en los mutantes *YeO8- Δ sspABGB* y *YeO8- Δ sspBKm*. **(A)** Expresión de *inv* en *YeO8*, *YeO8- Δ sspABGB* (Δ sspABGB), *YeO8- Δ sspABGB/pTM100*, *YeO8- Δ sspABGB/pTMsspAB*, *YeO8- Δ sspBKm* (Δ sspBKm), *YeO8- Δ sspBKm/pTM100* y *YeO8- Δ sspBKm/pTMsspB* crecidas a 21°C. **(B)** Expresión de *flhDC* en *YeO8*, *YeO8- Δ sspABGB* (Δ sspABGB), *YeO8- Δ sspABGB/pTM100*, *YeO8- Δ sspABGB/pTMsspAB*, *YeO8- Δ sspBKm* (Δ sspBKm), *YeO8- Δ sspBKm/pTM100* y *YeO8- Δ sspBKm/pTMsspB* crecidas a 21°C. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre. Δ , indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto al mutante correspondiente con el plásmido control pTM100. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes, realizados por triplicado.

Para comprobar si la disminución de la expresión de *flhDC* observada en las cepas *YeO8- Δ sspABGB* y *YeO8- Δ sspBKm* se correlaciona con un fenotipo de menor motilidad, se realizó un ensayo de motilidad con dichas cepas. La **Figura 27** muestra que las cepas *YeO8- Δ sspABGB* y *YeO8- Δ sspBKm* presentaron una menor motilidad que la cepa silvestre.

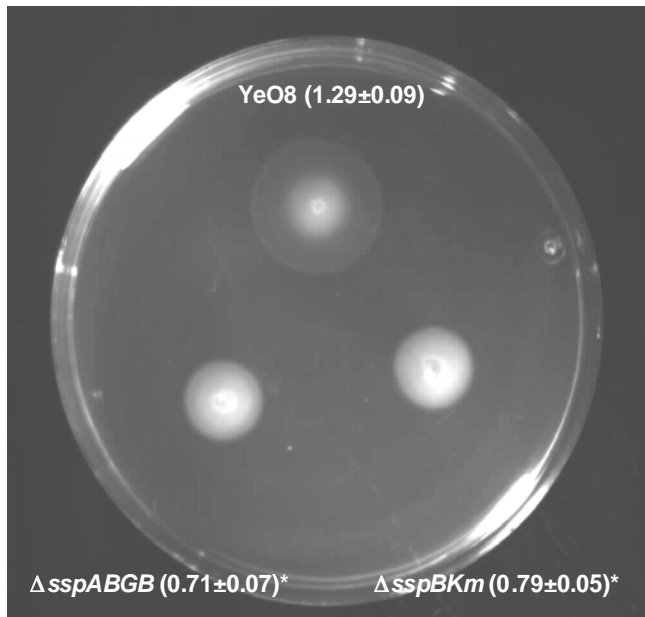


Figura 27. Análisis de la motilidad en los mutantes YeO8- Δ sspABGB y YeO8- Δ sspBKm. Motilidad de las cepas YeO8, YeO8- Δ sspABGB (Δ sspABGB) y YeO8- Δ sspBKm (Δ sspBKm) crecidas a 21°C. Ensayo de motilidad en placas de medio de motilidad (1% triptona-0,3% agar). Los resultados muestran la media y desviación estándar de cuatro experimentos independientes. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre.

A continuación, se planteó si la disminución de la expresión de *inv* en los mutantes YeO8- Δ sspABGB y YeO8- Δ sspBKm (**Figura 26A**) podría deberse, al menos en parte, a la disminución de la expresión de *rovA*. Para comprobarlo se midió la actividad luciferasa en las cepas YeO8- Δ sspABGB y YeO8- Δ sspBKm que contenían la fusión transcripcional $P_{rovA}::lucFF$. Curiosamente, la expresión de *rovA* fue superior en YeO8- Δ sspABGB que en la cepa silvestre, mientras que en el mutante YeO8- Δ sspBKm la expresión de *rovA* fue inferior que en la cepa silvestre (**Figura 28**).

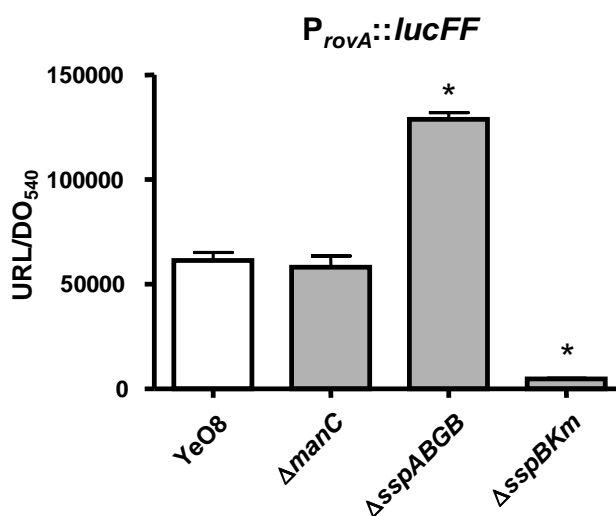


Figura 28. Análisis del efecto de la mutación de *sspAB* y *sspB* sobre la expresión de *rovA*. Expresión de *rovA* en YeO8, YeO8- Δ sspABGB (Δ sspABGB) y YeO8- Δ sspBKm (Δ sspBKm) crecidas a 21°C. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Todos los resultados anteriores muestran que tanto *sspAB* como *clpXP* están implicados en el control de la expresión de *inv* y *flhDC* en YeO8. Además, la expresión de *sspAB* y *clpXP* está disminuida en un mutante que no expresa la cadena O respecto a la cepa silvestre. Se planteó comprobar si alguno de estos operones influye sobre los niveles de expresión del otro. En primer lugar, se estudió la expresión de *sspAB* en YeO8- $\Delta clpX$ y YeO8- $\Delta clpXP Km$. La actividad luciferasa de $P_{sspA}::lucFF$ fue similar entre la cepa silvestre y ambos mutantes ($163,600 \pm 11,260$; $148,700 \pm 6453$; y $168,100 \pm 8,735$ URL/DO₅₄₀, respectivamente; [$P > 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]). A continuación, se construyeron las cepas indicadoras para analizar la expresión de *clpXP* en los mutantes YeO8- $\Delta sspABGB$ y YeO8- $\Delta sspBKm$. Los resultados muestran que la expresión de *clpXP* en los mutantes YeO8- $\Delta sspABGB$ y YeO8- $\Delta sspBKm$ fue inferior que aquella de la cepa silvestre (**Figura 29**). El plásmido pTM*sspAB* restauró totalmente la expresión de *clpXP* en el mutante YeO8- $\Delta sspABGB$; de igual modo, con el plásmido pTM*sspB* se consiguió restaurar la expresión de *clpXP* en el mutante YeO8- $\Delta sspBKm$ al nivel de la cepa silvestre (**Figura 29**).

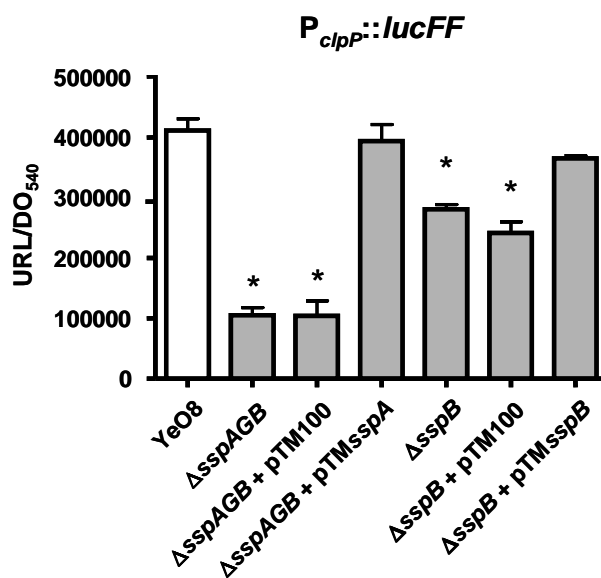


Figura 29. Análisis del efecto de la mutación de *sspAB* y *sspB* sobre la expresión de *clpP*. Expresión de *clpXP* en YeO8, YeO8- $\Delta sspABGB$ ($\Delta sspABGB$), YeO8- $\Delta sspABGB/pTM100$ ($\Delta sspABGB/pTM100$), YeO8- $\Delta sspABGB/pTMsspA$ ($\Delta sspABGB/pTMsspA$), YeO8- $\Delta sspBKm$ ($\Delta sspBKm$), YeO8- $\Delta sspBKm/pTM100$ ($\Delta sspBKm/pTM100$) y YeO8- $\Delta sspBKm/pTMsspB$ ($\Delta sspBKm/pTMsspB$) crecidas a 21°C. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes.

Los resultados anteriores plantearon la posibilidad de que para recapitular los fenotipos del mutante que no expresa la cadena O fuese necesario construir un mutante doble deficiente en *clpX* y *sspAB*. Así, se estudió la expresión de *inv* y *flhDC* en el mutante YeO8- Δ *clpX*- Δ *sspABGB*. Los datos muestran que las expresiones de *inv* (**Figura 30A**) y *flhDC* (**Figura 30B**) fueron inferiores en el mutante YeO8- Δ *clpX*- Δ *sspABGB* que en la cepa silvestre y similares a aquellos del mutante YeO8- Δ *sspABGB* (**Figura 30A y B**).

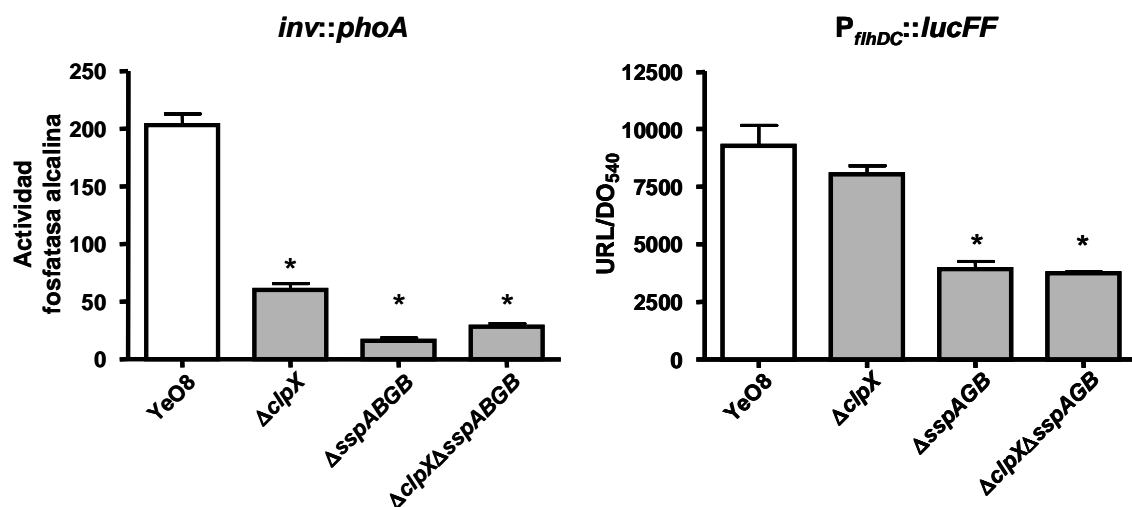


Figura 30. Estudio de la expresión de *inv* y *flhDC* en el doble mutante YeO8- Δ *clpX*- Δ *sspABGB*. (A) Expresión de *inv* en YeO8, YeO8- Δ *clpX* (Δ *clpX*), YeO8- Δ *sspABGB* (Δ *sspABGB*) y YeO8- Δ *clpX*- Δ *sspABGB* (Δ *clpX* Δ *sspABGB*) crecidas a 21°C. (B) Expresión de *flhDC* en YeO8, YeO8- Δ *clpX* (Δ *clpX*), YeO8- Δ *sspABGB* (Δ *sspABGB*) y YeO8- Δ *clpX*- Δ *sspABGB* (Δ *clpX* Δ *sspABGB*) crecidas a 21°C. *, indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes, realizados por triplicado.

Sin embargo, la motilidad del mutante YeO8- Δ *clpX*- Δ *sspABGB* fue significativamente superior que aquella de la cepa silvestre (1.39 ± 0.17 y 0.88 ± 0.09 cm, respectivamente [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]).

2.4. H-NS modula la expresión de *clpXP* y *sspAB* de *Y. enterocolitica* O:8

Teniendo en cuenta que H-NS está sobreexpresado en un mutante que no expresa la cadena O, se estudió si H-NS controlaba la expresión de *clpXP* y *sspAB*. Debido a la imposibilidad de construir un mutante *hns* en *Yersinia*, por las razones anteriormente comentadas, se determinó la expresión de las fusiones $P_{sspAB}::gfp$ y $P_{clpXP}::gfp$ en una cepa de *E. coli* (BSN26) y en un mutante isógeno que no expresa H-NS (BSN27) (191). Las medidas de fluorescencia determinaron que la expresión de *clpXP* fue significativamente superior en BSN27, que no expresa *hns*, que en la cepa silvestre BSN26 (1168 ± 47 y 489 ± 116 URF, respectivamente; [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]). La expresión de *SspA/SspB* fue también significativamente superior en BSN27 que en BSN26, la cepa silvestre, (61.6 ± 11.9 y 27.9 ± 8.8 URF, respectivamente; [$P < 0.05$ por el test *t* de Student de dos colas]). Estos resultados indican que H-NS, y/o otra proteína regulada por H-NS, controla negativamente la expresión de *clpXP* y *SspA/SspB* de YeO8.

2.5. *SspA/SspB* participan en la regulación post-transcripcional de los niveles de H-NS en *Y. enterocolitica* O:8

Una vez que hemos demostrado que H-NS influye sobre la expresión de *SspA/SspB* y *clpXP* se analizaron por Western Blot los niveles de H-NS en los mutantes deficientes en *clpX* y *SspA/SspB*. Tal y como era de esperar, el mutante YeO8- $\Delta manC$, al igual que el mutante no definido deficiente en la cadena O YeO8-R (**Figura 19**), expresó mayor cantidad de H-NS que la cepa silvestre (**Figura 31**). Por otro lado, el mutante *clpX* expresó niveles similares de H-NS que la cepa silvestre, mientras que tanto YeO8- $\Delta sspAGB$ como YeO8- $\Delta sspBKm$ expresaron mayor cantidad de H-NS que la cepa silvestre (**Figura 31**).

Por otra parte, aunque ya habíamos demostrado que H-NS es un activador transcripcional de *flhDC* en YeO8 (apartado 1.5), se comprobó si *flhDC* tiene algún efecto sobre los niveles de expresión de H-NS observados en

el mutante que no expresa la cadena O. Sin embargo, la cantidad de H-NS expresada por el mutante doble $YeO8-\Delta flhDC-\Delta manC$ fue similar que aquella expresada por $YeO8-\Delta manC$, lo que sugiere que *flhDC* no tiene ningún efecto sobre los niveles de H-NS en la bacteria.

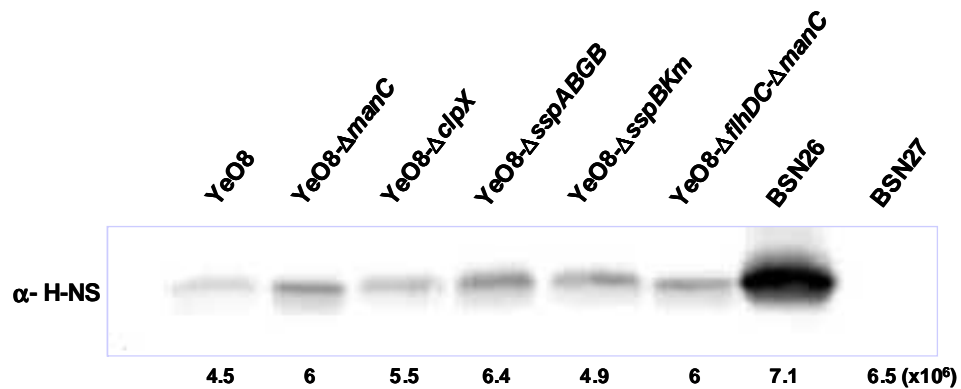


Figura 31. Estudio del nivel de expresión de H-NS. Análisis por Western Blot de la expresión de H-NS en *YeO8*, *YeO8- $\Delta manC$* , *YeO8- $\Delta clpX$* , *YeO8- $\Delta sspABGB$* , *YeO8- $\Delta sspBKm$* , *YeO8- $\Delta flhDC-\Delta manC$* , BSN26 (Control positivo) y BSN27 (Control negativo), crecidas a 21°C. En la parte inferior de cada carril se indica el número de bacterias correspondientes al volumen cargado de lisado celular. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado la importancia de la cadena O del LPS en la virulencia de *Y. enterocolitica* empleando diferentes modelos animales (25, 259, 408). Además, Bengoechea y colaboradores (25) demostraron que la expresión de la cadena O está coordinada con la expresión de otros factores de virulencia de *Yersinia* (25), aunque estos autores no analizaron las bases moleculares de dicha coordinación. Así pues, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido dilucidar las bases moleculares que explicarían la expresión coordinada de la cadena O y determinados factores de virulencia de *Y. enterocolitica*. En este trabajo, se han definido los mecanismos moleculares por los cuales en un mutante que no expresa la cadena O aumenta la expresión de *flhDC*, el operón de regulación del flagelo, mientras que disminuye la expresión tanto de *inv*, que codifica una proteína de la membrana externa esencial en la fase inicial del proceso de infección, como del SSTT Ysc (**Figura 32**). Los resultados indican que los nodos de este circuito son las proteínas codificadas por el operón *sspAB*, H-NS, la proteasa ClpXP y FlhDC. Es importante señalar que aquí se describe por primera vez el papel de FlhDC en la regulación de dos de los factores de virulencia más importantes de *Y. enterocolitica*, *Inv* y el SSTT Ysc.

1. LA CADENA O INFLUYE SOBRE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III Ysc

Para sobrevivir y diseminarse en los órganos del huésped, *Y. enterocolitica* expresa y secreta todo un conjunto de proteínas efectoras, codificadas en el virulón Yop del plásmido pYV, las cuales previenen la activación de respuestas inflamatorias y evitan que la bacteria sea fagocitada por macrófagos y neutrófilos (90, 94, 286). Bengoechea y colaboradores determinaron que un mutante de la cadena O de YeO8 es incapaz de multiplicarse en los nódulos linfáticos mesentéricos y el hígado (25). A partir de estos resultados, podría interpretarse que la ausencia de cadena O hace que la bacteria sea más sensible a los sistemas de defensa del huésped. Aunque no se descarta esta posibilidad, en este trabajo se planteó la idea de que los sistemas de los que dispone la bacteria para eludir los mecanismos de defensa

del huésped, como por ejemplo el SSTT Ysc (86), no sean totalmente funcionales en una cepa que no expresa la cadena O. De hecho, nuestros resultados indican que la cadena O está relacionada con la expresión y/o funcionalidad del SSTT Ysc, puesto que en un mutante que no expresa la cadena O la secreción de Yops es inferior a la que presenta la cepa silvestre. Por otro lado, los datos obtenidos demuestran que en una cepa de YeO8 que expresa una sola unidad de la cadena O la secreción de Yops es equivalente a la de la cepa silvestre. Este hecho, junto con la observación que el LPS expresado por la cepa silvestre a la temperatura de expresión del SSTT Ysc (37°C) equivale prácticamente al LPS expresado por el mutante anterior, hace pensar que la sustitución del núcleo del LPS con una sola unidad de la cadena O es necesaria para la correcta expresión/funcionalidad del SSTT Ysc (6, 26). Quizás esto es lo que explica que la sustitución del núcleo-lípido A con una unidad de la cadena O sea tan eficiente en *Y. enterocolitica*. Merece la pena señalar que en otros modelos también se ha encontrado una conexión entre la expresión y/o funcionalidad de los SSTT y la estructura del LPS. En *P. aeruginosa* se ha descrito que la ausencia de la cadena O se correlaciona con un aumento de la secreción de su SSTT y su citotoxicidad *in vitro* (16). Aunque dichos resultados no se correlacionan con los obtenidos en nuestro estudio, es razonable pensar que los distintos estilos de vida y patogenicidad de *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica* expliquen las diferencias. La glicosilación de la cadena O de *S. flexneri* se asocia con cambios en la longitud de la molécula de LPS lo que influye en la interacción del SSTT con la superficie de la célula eucariota y, por tanto, en la actividad del SSTT (387).

Como se ha demostrado en este trabajo, la ausencia de la cadena O actúa negativamente sobre la transcripción de VirF, el regulador transcripcional de elementos del virulón Yop (91, 214, 351) y, como se esperaba, sobre la transcripción de YopE, una de las proteínas efectoras del virulón Ysc, tomada como modelo de regulación de expresión de las proteínas efectoras (92, 306, 358, 378). Por consiguiente, es razonable postular que la menor secreción de Yops observada en el mutante de YeO8 que no expresa la cadena O sea consecuencia de la menor expresión del activador transcripcional del SSTT Ysc en esta cepa, de manera que disminuye tanto la

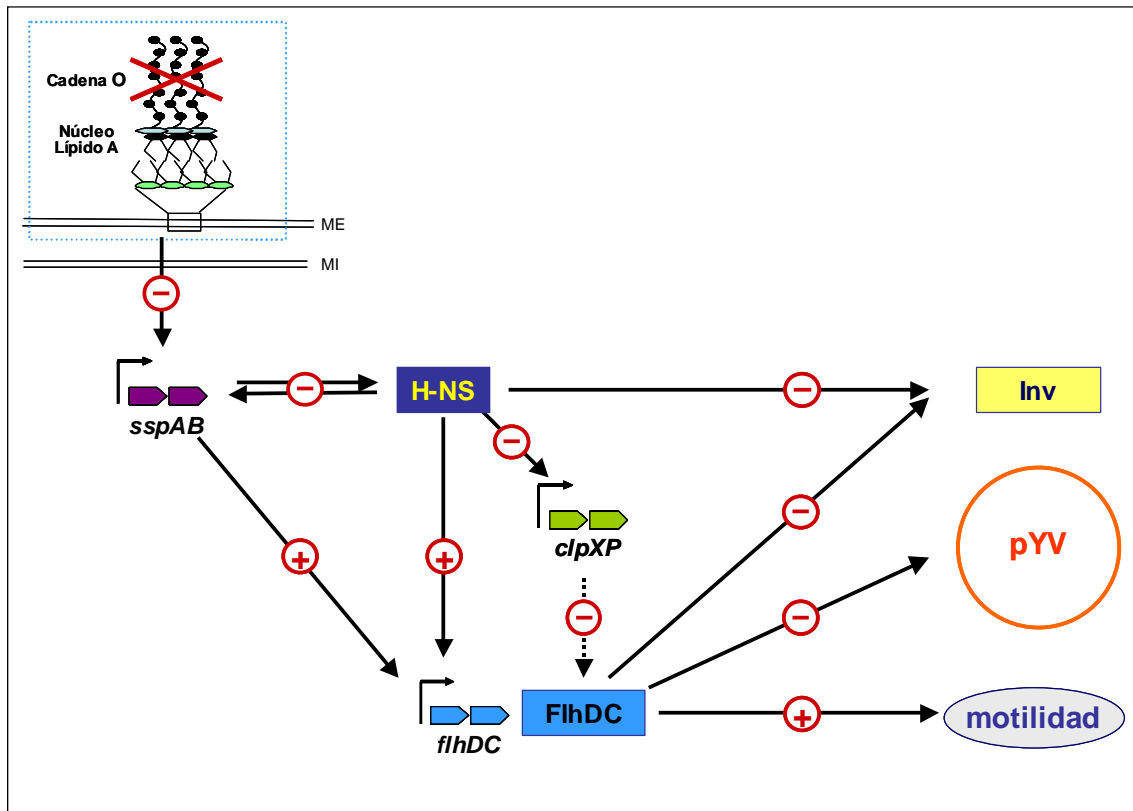


Figura 32. Modelo molecular del circuito compuesto por la cadena O, *sspAB*, *clpXP*, H-NS, *flhDC* e *Inv* en *Y. enterocolitica* O:8. Los genes están representados por flechas de bloque y las proteínas como cajas; las flechas con signo positivo indican aumento de la transcripción o bien regulación positiva sobre los niveles de proteína o de un determinado fenotipo; las flechas con signo negativo indican disminución de la transcripción o regulación negativa sobre los niveles de proteína o de un determinado fenotipo.

expresión de las proteínas efectoras como su secreción y translocación al citosol de las células eucariotas. Por otra parte, el hecho de que la secreción de Yops esté disminuida pero no anulada por completo en el mutante que no expresa la cadena O sugiere que el ensamblaje del SSTT no está afectado en el mutante lo que permite descartar, por consiguiente, efectos estructurales asociados a la ausencia de la cadena O. Es más, un análisis mediante microscopía electrónica del inyectiosoma expresado por el mutante que no expresa la cadena O reveló que si bien esta cepa expresó menor número de inyectiosomas en su superficie que la cepa silvestre, éstos eran exactamente iguales que los expresados por la cepa silvestre (Bengoechea y Cornelis, resultados no publicados).

Desde el punto de vista molecular, en este trabajo hemos demostrado que la disminución en la secreción de Yops en el mutante que no expresa la cadena O parece ser consecuencia del incremento en la expresión de *flhDC* en dicha cepa, ya que un mutante que no expresa la cadena O ni *flhDC* presenta una secreción de Yops comparable a la de la cepa silvestre. Este doble mutante también recupera el fenotipo de citotoxicidad frente a células eucariotas. Todos estos resultados concuerdan con los publicados por Bleves y colaboradores (44), que demostraron que en *Y. enterocolitica* serotipo O:9 la mutación de *flhDC* conlleva un aumento en la secreción de Yops mientras que la sobreexpresión de *flhDC* la disminuye. Cabe señalar, no obstante, que Young y colaboradores (400) no hallaron ningún vínculo entre *flhDC* y el virulón Yop en YeO8, aunque estos autores no analizaron el efecto de la sobreexpresión de *flhDC* sobre la secreción de Yops. Una cuestión que se plantea es el significado biológico de la inhibición del SSTT Ysc cuando se sobreexpresa *flhDC*. Aunque los datos indican que el SSTT del flagelo no se sintetizará en su totalidad a 37°C por la ausencia de FliA (181), la expresión del cuerpo basal y del gancho, dependiente de los genes tipo II (125), no está regulada por la temperatura (218) y, por consiguiente, la sobreexpresión de *flhDC* a 37°C causaría un incremento en el número de cuerpos basales. Es razonable pensar que esto pudiera traducirse en un desequilibrio en la arquitectura de la superficie bacteriana con repercusiones en la expresión/funcionalidad del SSTT Ysc. Por otra parte, pudiera ocurrir que la

producción simultánea del SSTT Ysc y del flagelo cause interferencias entre ambos sistemas de secreción. Así, se ha descrito que FliA impide la expresión simultánea del flagelo y del SSTT Ysc (44, 176). A temperaturas por debajo de 30°C, FlhDC activa la expresión de FliA, el cual actúa de mediador en la cascada de activación de los genes implicados en la síntesis del flagelo y, por otro lado, inhibe la expresión de VirF, el activador transcripcional de los genes que forman parte del virulón Yop (44, 176).

H-NS es una proteína de pequeño tamaño asociada al nucleóide que se une de manera inespecífica al ADN, preferentemente a fragmentos que presentan una curvatura intrínseca y secuencias ricas en AT, y que modula la expresión de una gran diversidad de genes en enterobacterias (268, 375, 411). El hecho de que H-NS sea un activador transcripcional de *flhDC* en *E. coli* (34) nos hizo plantear la hipótesis de que niveles anormalmente elevados de H-NS fueran responsables en *Y. enterocolitica* de la sobreexpresión de *flhDC* observada en un mutante que no expresa la cadena O (25). Nuestros resultados indican que, al igual que ocurre en *E. coli*, H-NS actúa como regulador positivo de la transcripción de *flhDC* en *Y. enterocolitica*. Cabe señalar que estos resultados se obtuvieron comparando la expresión de *flhDC* entre una cepa silvestre de *E. coli* y un mutante isógeno que no expresa H-NS, ya que *hns* es un gen esencial en *Y. enterocolitica* como varios grupos hemos demostrado independientemente (25, 120, 171). No obstante, el fenotipo de hipermotilidad observado en una cepa de *Y. enterocolitica* que sobreexpresa H-NS apoya dichos resultados, puesto que en *Y. enterocolitica* el aumento de la motilidad está directamente relacionado con la sobreexpresión de *flhDC* (25, 405). Otros resultados que corroboran el efecto positivo de H-NS sobre la expresión de *flhDC* son la disminución de la secreción de Yops observada al sobreexpresar H-NS en una cepa silvestre, mientras que la sobreexpresión de H-NS en un mutante *flhDC* no tiene ningún efecto sobre la secreción de Yops. En este momento desconocemos el mecanismo molecular por el cual H-NS modula la expresión de *flhDC* en *Y. enterocolitica*. Sin embargo, en *E. coli* se ha demostrado que H-NS activa la transcripción de *flhDC* inhibiendo la expresión de un regulador transcripcional negativo de dicho operón, *hdfR* (207). El análisis del genoma secuenciado de *Y. enterocolitica*

O:8 reveló que esta bacteria también contiene *hdfR* y, por consiguiente en un mutante que no expresa la cadena O, en el cual los niveles de proteína H-NS están aumentados, la sobreexpresión de *flhDC* podría deberse a un efecto inhibitorio de H-NS sobre el operón *hdfR*.

2. EXPRESIÓN DE *inv* EN UN MUTANTE DE *Y. enterocolitica* QUE NO EXPRESA LA CADENA O

Como se ha descrito anteriormente, uno de los factores de virulencia más importantes en la fase inicial del proceso de infección de *Y. enterocolitica* es Inv, una proteína de la membrana externa que media la adhesión e invasión al epitelio intestinal del huésped (81, 182, 249, 279, 298). Bengoechea y colaboradores (25) demostraron que en un mutante de *Y. enterocolitica* que no expresa la cadena O disminuye la expresión de *inv* lo que podría explicar la baja colonización de las placas de Peyer en la fase inicial del proceso de infección. Puesto que la expresión de *inv* está controlada positivamente por RovA (298) y negativamente por el complejo H-NS-YmoA (120, 264), se analizó la expresión de *rovA* en el mutante de la cadena O de YeO8. Una reducción en la expresión de *rovA* junto con el aumento en los niveles de H-NS podría explicar la menor expresión de *inv* en dicha cepa. Sin embargo, los resultados indican que la expresión de *rovA* no está alterada en la cepa que no expresa la cadena O. No obstante, no se puede descartar que en el mutante que no expresa la cadena O estén alterados los niveles de expresión de RovA a nivel post-transcripcional, a pesar de que datos indirectos sugieren que este no es el caso. Así, hay que señalar que H-NS controla negativamente tanto la transcripción de *rovA* como de *inv* (120, 215) y, a su vez, la expresión de *rovA* depende de los propios niveles de RovA (215). Finalmente, la expresión de *rovA* no está alterada en un mutante que no expresa la cadena O. No parece probable que los niveles de RovA estén alterados en el mutante que no expresa la cadena O. Por otra parte, Badger y Miller (18) demostraron que la motilidad y la expresión de *inv* están regulados de manera coordinada en *Y. enterocolitica*. Tal como se ha indicado anteriormente, la motilidad aumenta en un mutante de la cadena O debido a la sobreexpresión de *flhDC* (25, 405). Por

tanto, otra posibilidad es que la menor expresión de *inv* esté causada por la sobreexpresión de *flhDC* en el mutante que no expresa la cadena O. Los resultados obtenidos, analizando la expresión de *inv* en un mutante doble que no expresa ni la cadena O ni *flhDC*, confirman esta hipótesis. Más aún, los niveles de H-NS en este mutante son similares a los encontrados en el mutante que no expresa la cadena O, lo que descarta que el efecto de la mutación *flhDC* sobre la expresión de *inv* sea debido a cambios en H-NS, un conocido inhibidor de la expresión de *inv* (120, 264). Cabe señalar que en *S. enterica* serovar *Typhimurium* también se observa la regulación coordinada entre la motilidad y la invasión (119), lo cual hace pensar que puedan existir mecanismos de regulación equivalentes que medien la expresión coordinada de estos dos fenotipos en las enterobacterias. Por último, recientemente se ha descrito que RovM y OmpR también influyen sobre la expresión de *inv*. En *Y. pseudotuberculosis* RovM, junto con H-NS, actúa de regulador negativo sobre la transcripción de *rovA* y la expresión de *inv*, mientras que tiene un efecto positivo sobre la motilidad (170). Por su parte, OmpR, el elemento de respuesta del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR, regula negativamente la expresión de *inv* a nivel transcripcional cuando *Y. enterocolitica* crece a temperatura ambiente (61). Es evidente que futuros trabajos deberían abordar la posible implicación de RovM y OmpR en el circuito descrito en este trabajo.

3. PAPEL DE ClpXP EN LA EXPRESIÓN DE *inv* Y *flhDC*

Con el fin de explicar los elevados niveles de H-NS en el mutante que no expresa la cadena O se estudió la posible implicación de las proteasas citosólicas dependientes de ATP (141). Además de ser responsables de la eliminación de proteínas defectuosas de la bacteria, estas proteasas también controlan la disponibilidad de determinadas proteínas reguladoras y están implicadas en la virulencia de bacterias como *S. enterica* serovar *Typhimurium* (48, 167, 367, 397), *Listeria monocytogenes* (137) o *Campylobacter jejuni* (84). En el caso de ClpP, multímeros de esta subunidad proteolítica pueden combinarse con diferentes ATPasas, ClpX o ClpA, cada una de las cuales confiere diferente especificidad de sustrato (144, 201, 394). En *S. enterica*

serovar *Typhimurium* la proteasa dependiente de ATP ClpXP, junto con Lon, está implicada en la modulación de la biosíntesis del flagelo, puesto que regula los niveles celulares de FlhDC (371, 372). De hecho, un mutante deficiente en ClpXP presenta hipermotilidad y expresa altos niveles de FlhDC (371, 372). En primer lugar, se comprobó que la expresión de *clpXP* fue inferior en el mutante que no expresa la cadena O que en la cepa silvestre, lo que indirectamente apoyaba la hipótesis planteada. Los resultados de nuestro trabajo indican que un mutante deficiente en ClpXP no presenta niveles alterados de H-NS aunque presenta hipermotilidad. Es interesante que, al igual que ocurre en *S. enterica* serovar *Typhimurium* (371), la expresión de *flhDC* es similar entre la cepa silvestre y el mutante ClpXP. Por tanto, aunque en este trabajo no hemos demostrado rigurosamente que la proteasa ClpXP degrade FlhDC, el fenotipo de hipermotilidad de los mutantes que no expresan dicha proteasa y el hecho de que en *Salmonella* ClpXP regule los niveles de expresión de FlhDC a nivel post-transcripcional (371, 372), parecen indicar que en *Y. enterocolitica* FlhDC también pudiera ser degradado por ClpXP. En su conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que en *Y. enterocolitica* *flhDC* está regulado positivamente por H-NS y negativamente por ClpXP a nivel post-transcripcional. No obstante, no pueden descartarse la implicación de otros mecanismos moleculares en dicha regulación, como los ya descritos en otras bacterias. Así, en *E. coli* se ha demostrado que la expresión del flagelo está modulada por el osmoregulador OmpR (338) y que las proteínas DnaK, DnaJ y GrpE afectan la expresión de *flhDC* y *fliA* (336, 338).

Por otra parte, hemos demostrado que en un mutante deficiente en ClpXP la expresión de *inv* es inferior a la de la cepa silvestre y, molecularmente, los datos sugieren que esto es debido a los altos niveles de FlhDC, ya que en el mutante doble que no expresa *clpX* ni *flhDC* los niveles de expresión de *inv* fueron similares a los de la cepa silvestre. Igual que en el mutante que no expresa la cadena O, hemos descartado que la deficiencia en ClpXP altere la expresión de *rovA*. Además, los niveles de H-NS en un mutante que no expresa ClpXP fueron similares a los de la cepa silvestre.

Dado que H-NS y ClpXP modulan positiva y negativamente los niveles de FlhDC en *Y. enterocolitica*, se planteó la hipótesis de que H-NS controle la activación del regulón del flagelo inhibiendo la expresión de la proteasa ClpXP. Nuestros resultados parecen indicar que este puede ser el caso, ya que H-NS inhibe la expresión de *clpXP* de *Y. enterocolitica*. Así pues, el bajo nivel de expresión del operón *clpXP* que presenta una cepa de YeO8 que no expresa la cadena O puede deberse, al menos parte, a los elevados niveles de H-NS de esta cepa.

La implicación de proteasas en la regulación de factores de virulencia en *Yersinia* ya había sido descrita en otros trabajos. Así, se ha demostrado en *Y. enterocolitica* que ClpP controla los niveles de Ail a temperaturas por debajo de 37°C (276, 336, 338). Por otra parte, resultados obtenidos por Badger y colaboradores (19, 336, 338) sugieren que ClpB podría regular negativamente tanto la motilidad como la expresión de *inv*. Además, ClpXP y Lon contribuyen a la regulación del SSTT de *Y. pestis*, ya que controlan los niveles de YmoA, que inhibe la expresión de dicho SSTT cuando la temperatura es inferior a 37°C (190, 336, 338). YmoA pertenece a la familia de proteínas asociadas al nucleóide implicadas en la regulación de la expresión de diversos factores de virulencia en diferentes proteobacterias (229). En *Y. enterocolitica*, YmoA junto con H-NS, inhibe la expresión de *inv* a 37°C, y de *virF*, el activador transcripcional de los genes del SSTT Ysc, a temperatura ambiente (91, 93, 120, 121, 264). Sería interesante abordar en futuros estudios si en *Y. enterocolitica* YmoA participa en el circuito analizado en esta Tesis Doctoral. La hipótesis que planteamos es que en un mutante que no expresa cadena O, la baja expresión de la proteasa ClpXP hace que los niveles de YmoA sean anormalmente elevados y, por tanto, den lugar tanto a una inhibición de la expresión de *inv*, como consecuencia de la interacción H-NS—YmoA (120, 264), como a una disminución de la expresión y/o funcionalidad del SSTT Ysc, debido al efecto inhibitorio de YmoA sobre la expresión de VirF. Tampoco podemos descartar que otras proteasas, como Lon o la subunidad proteolítica ClpP unida a subunidades ATPasa distintas de ClpX, puedan participar de alguna manera en el circuito descrito en este trabajo.

4. PAPEL DE SspA/SspB EN LA EXPRESIÓN DE *inv* Y *flhDC*

Como se ha citado anteriormente, Badger y Miller (18) describieron que SspA participa en la regulación coordinada de *inv* y la motilidad ya que regula positivamente la expresión de *inv* e inhibe la motilidad (18). En *E. coli* se ha descrito que SspA es una proteína que se une a la ARN polimerasa, aunque se conoce muy poco tanto sobre su función así como sobre el mecanismo que regula su propia expresión (159, 187, 390). En *Y. enterocolitica*, la proteína SspA está codificada en el operón *sspAB*, y puesto que está implicada en dos de los fenotipos observados en un mutante que no expresa la cadena O, decidimos analizar su posible contribución al circuito que estudiamos. En primer lugar, los datos demuestran que en un mutante que no expresa la cadena O la expresión de *sspAB* es inferior que en la cepa silvestre lo que apoya indirectamente la hipótesis formulada. Es más, nuestros resultados coinciden con los ya publicados por Badger y Miller (18), ya que en un mutante *sspAB* la expresión de *inv* es menor que en la cepa silvestre. Por otra parte, nuestros datos sugieren que el operón *sspAB* regula positivamente la motilidad, a través de un efecto positivo sobre la expresión de *flhDC*. Estos datos no concuerdan con los descritos por Badger y colaboradores (18), puesto que estos autores describen un efecto negativo de SspA sobre la motilidad. No obstante, hay que señalar que en nuestros análisis hemos empleado un mutante *sspAB* y un mutante *sspB*, mientras que Badger y Miller emplearon un mutante *sspA*. Por tanto, las diferencias observadas podrían deberse a que no sólo SspA contribuye a la regulación de la expresión del flagelo, sino que también SspB podría tener una influencia importante.

Puesto que tanto *sspAB* como *clpXP* están implicados en la regulación de *inv* y *flhDC* en *Y. enterocolitica*, y tanto la expresión de *sspAB* como la de *clpXP* fue menor en el mutante que no expresa la cadena O que en la cepa silvestre, quisimos analizar si existe algún tipo de control entre ambos. Los resultados indican que *sspAB* regula positivamente la expresión de *clpXP*, ya que en el mutante *sspAB* la expresión de *clpXP* fue inferior que en la cepa silvestre. Por otro lado, al analizar la expresión de *inv* y la motilidad del doble mutante *YeO8-ΔclpX-ΔsspABKm* se observó que el nivel de expresión de *inv* y

la motilidad se correspondían con los observados en un mutante que no expresa la cadena O, aunque la expresión de *flhDC* fue inferior a la de la cepa silvestre y equivalente a la observada en el mutante *sspAB*. A pesar de que estos resultados pueden parecer contradictorios, nuestra interpretación es que el doble mutante *YeO8-ΔclpX-ΔsspABKm* presenta un fenotipo de hipermotilidad debido a la ausencia de la proteasa ClpXP que, junto con otros mecanismos, deben potenciar la estabilidad de FlhDC y la síntesis de flagelo. Sin embargo, parece claro que *YeO8-ΔclpX-ΔsspABKm* no recapitula todos los fenotipos observados en el mutante que no expresa la cadena O, por lo que deben existir más elementos cuya expresión esté alterada en dicho mutante y que contribuyan al circuito de regulación que hemos definido.

En *E. coli* se ha descrito que SspA inhibe la acumulación de H-NS durante la fase estacionaria, de manera que se permite la expresión de aquellos genes regulados negativamente por H-NS (159). Por consiguiente, teniendo en cuenta que, por un lado, los niveles de H-NS están aumentados en el mutante que no expresa la cadena O y que, por otro lado, en esta misma cepa la expresión de *sspAB* está disminuida, se postuló que los niveles de H-NS estarían incrementados en un mutante *sspAB*. Nuestros resultados mostraron que este es el caso también en *Y. enterocolitica*. Por otra parte, al estudiar los niveles de expresión del operón *sspAB* de *Y. enterocolitica* en una cepa de *E. coli* silvestre y en un mutante isogénico que no expresa H-NS (191), comprobamos que esta proteína modula negativamente la expresión de *sspAB*. Cabe decir que, aunque en *E. coli* se conoce que la expresión de *sspAB* se induce en condiciones de limitación de nutrientes y al entrar la bacteria en la fase estacionaria de crecimiento (390), hasta el momento no se había descrito ningún mecanismo molecular que contribuyera a la regulación de la expresión de *sspAB*.

5. CONSIDERACIONES FINALES

El éxito de cualquier patógeno depende de una regulación estricta de la expresión de los factores de virulencia así como de su expresión coordinada durante el proceso de infección. *Y. enterocolitica* constituye un claro ejemplo de

adaptación a dos ambientes muy diferentes, el medio exterior y el interior del huésped. Así, la adaptación de los sistemas de regulación para integrar señales ambientales y controlar adecuadamente la expresión génica constituye, probablemente, un aspecto fundamental de la virulencia de este patógeno. Tal y como demuestran los resultados obtenidos en este trabajo, la regulación de los genes de virulencia implica la acción coordinada de múltiples proteínas reguladoras que se unen al ADN, unas a otras, y que interaccionan con la maquinaria transcripcional. En esta Tesis, hemos descrito como la regulación de la expresión de los factores de virulencia *inv* y el SSTT Ysc es compleja y posiblemente sea un fiel reflejo de la necesidad de coordinar múltiples funciones asociadas con el ciclo de vida patogénico de *Y. enterocolitica*. Por otra parte, basándonos en nuestros resultados, parece que la síntesis y el ensamblaje de estructuras de la envoltura celular, como las proteínas ubicadas en la membrana externa que median adhesión e invasión (*Inv*), el SSTT Ysc, el flagelo o la propia cadena O, implican una regulación estricta. Esto puede ser debido tanto al elevado coste energético que supone la síntesis de cada uno de estos elementos como a posibles incompatibilidades estructurales y/o funcionales entre ellos. Puesto que la cadena O del LPS está expuesta al ambiente exterior, es probable que cambios en su expresión afecten a la expresión de factores de virulencia. Nuestros resultados sugieren que en *Y. enterocolitica* la estructura del LPS actúa como una señal que la bacteria interpreta y traduce para controlar la expresión de varios componentes de la membrana externa, algunos de los cuales están implicados en la virulencia.

CONCLUSIONES

1. La expresión del SSTT Ysc codificado en el plásmido de virulencia pYV está disminuido en el mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O como consecuencia de la presencia de niveles anormalmente altos de FlhDC y/o otra proteína regulada por FlhDC.
2. En *Y. enterocolitica* O:8, H-NS es un activador de *flhDC*. H-NS está sobreexpresado en el mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O lo que explicaría la sobreexpresión de *flhDC* en este mutante.
3. La disminución de la expresión de *inv* en el mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O es consecuencia de los altos niveles de FlhDC y no de variaciones en la transcripción de su regulador positivo, *rovA*.
4. En un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa la cadena O la expresión de *clpXP* y *sspAB* es menor que en la cepa silvestre.
5. En un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa *clpXP*, la expresión de *inv* es menor que en la cepa silvestre, mientras que dicho mutante presenta mayor motilidad que la cepa silvestre.
6. En un mutante de *Y. enterocolitica* O:8 que no expresa *sspAB*, la expresión de *inv* es menor que en la cepa silvestre, la expresión de *flhDC* está disminuída y presenta menor motilidad que la cepa silvestre. H-NS está sobreexpresado en este mutante.
7. La expresión de *rovA* no está alterada en el mutante que no expresa *sspAB* ni en el mutante que no expresa *clpXP*.
8. La expresión de *clpXP* es menor en el mutante que no expresa *sspAB* que en la cepa silvestre de *Y. enterocolitica* O:8.
9. H-NS modula negativamente la expresión de *clpXP* y de *sspAB* de *Y. enterocolitica* O:8.

REFERENCIAS

1. **Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc.Natl.Acad.Sci., USA. **96**:14043-14048.
2. **Adams, H., W. Teertstra, J. Demmers, R. Boesten, and J. Tommassen.** 2003. Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*. J.Bacteriol. **185**:1174-1180.
3. **Aepfelbacher, M., C. Trasak, G. Wilharm, A. Wiedemann, K. Trulzsch, K. Krauss, P. Gierschik, and J. Heesemann.** 2003. Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. J.Biol.Chem. **278**:33217-33223.
4. **Aepfelbacher, M., R. Zumbihl, K. Ruckdeschel, C. A. Jacobi, C. Barz, and J. Heesemann.** 1999. The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. Biol.Chem. **380**:795-802.
5. **Aizawa, S. I.** 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol.Lett. **202**:157-164.
6. **Al-Hendy, A., P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1991. 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.
7. **Al-Hendy, A., P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1992. 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.
8. **Aldridge, P. and K. T. Hughes.** 2002. Regulation of flagellar assembly. Curr.Opin.Microbiol. **5**:160-165.
9. **Alexeyev, M. F.** 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. Biotechniques. **26**:824-6, 828.
10. **Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter, and G. R. Cornelis.** 1994. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. J.Bacteriol. **176**:4534-4542.
11. **Anderson, D. M. and O. Schneewind.** 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science. **278**:1140-1143.
12. **Anderson, D. M. and O. Schneewind.** 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. Mol.Microbiol. **31**:1139-1148.
13. **Anisimov, A. P., S. V. Dentovskaya, G. M. Titareva, I. V. Bakhteeva, R. Z. Shaikhutdinova, S. V. Balakhonov, B. Lindner, N. A. Kocharova, S. N. Senchenkova, O. Holst, G. B. Pier, and Y. A. Knirel.** 2005. 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.
14. **Anonymous.** 1985. 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. Int.J.Syst.Bacteriol. **35**:540.
15. **Appleyard, R. K.** 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. Genetics. **39**:440-452.

-
16. **Augustin, D. K., Y. Song, M. S. Baek, Y. Sawa, G. Singh, B. Taylor, A. Rubio-Mills, J. L. Flanagan, J. P. Wiener-Kronish, and S. V. Lynch.** 2007. Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* **189**:2203-2209.
 17. **Bach, S., A. de Almeida, and E. Carniel.** 2000. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol.Lett.* **183**:289-294.
 18. **Badger, J. L. and V. L. Miller.** 1998. Expression of invasin and motility are coordinately regulated in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **180**:793-800.
 19. **Badger, J. L., B. M. Young, A. J. Darwin, and V. L. Miller.** 2000. *Yersinia enterocolitica* ClpB affects levels of invasin and motility. *J.Bacteriol.* **182**:5563-5571.
 20. **Balligand, G., Y. Laroche, and G. Cornelis.** 1985. Genetic analysis of a virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect.Immun.* **48**:782-786.
 21. **Baños, R. C., J. I. Pons, C. Madrid, and A. Juarez.** 2008. A global modulatory role for the *Yersinia enterocolitica* H-NS protein. *Microbiology.* **154**:1281-1289.
 22. **Bartra, S. S., K. L. Styer, D. M. O'Bryant, M. L. Nilles, B. J. Hinnebusch, A. Aballay, and G. V. Plano.** 2008. Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein. *Infect.Immun.* **76**:612-622.
 23. **Bearden, S. W., J. D. Fetherston, and R. D. Perry.** 1997. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect.Immun.* **65**:1659-1668.
 24. **Benabdillah, R., L. J. Mota, S. Lutzelschwab, E. Demoinet, and G. R. Cornelis.** 2004. Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb.Pathog.* **36**:247-261.
 25. **Bengoechea, J. A., H. Najdenski, and M. Skurnik.** 2004. 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.
 26. **Bengoechea, J. A., E. Pinta, T. Salminen, C. Oertelt, O. Holst, J. Radziejewska-Lebrecht, Z. Piotrowska-Seget, R. Venho, and M. Skurnik.** 2002. 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.
 27. **Bengoechea, J. A., L. Zhang, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 2002. Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* includes cell envelope-dependent signals. *Mol.Microbiol.* **44**:1045-1062.
 28. **Bercovier, H., D. J. Brenner, J. Ursing, A. G. Steigerwalt, G. R. Fanning, J. M. Alonso, G. P. Carter, and H. H. Mollaret.** 1980. Characterization of *Yersinia enterocolitica* sensu stricto. *Curr.Microbiol.* **4**:201-206.
 29. **Bercovier, H., H. H. Mollaret, J. M. Alonso, J. Brault, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1980. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr.Microbiol.* **4**:225-229.

30. **Bercovier, H., A. G. Steigerwalt, A. Guiyoule, G. Huntley-Carter, Brenner, and J. D.** 1984. *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystems. *Int.J Syst.Bacteriol.* **34**:166-172.
31. **Bercovier, H., J. Ursing, D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt, G. F. Fanning, G. P. Carter, and H. H. Mollaret.** 1980. *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.
32. **Bergler, H., D. Abraham, H. Aschauer, and F. Turnowsky.** 1994. Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the *pspA* gene. *Microbiology.* **140 (Pt 8)**:1937-1944.
33. **Berring, E., S. Brancato, K. Grant, E. Schaper, S. Kadavil, H. Smagin, S. O. Hatic, W. Picking, and A. B. Serfis.** 2004. Destabilization of phospholipid model membranes by YplA, a phospholipase A2 secreted by *Yersinia enterocolitica*. *Chem.Phys.Lipids.* **131**:135-149.
34. **Bertin, P., E. Terao, E. H. Lee, P. Lejeune, C. Colson, A. Danchin, and E. Collatz.** 1994. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **176**:5537-5540.
35. **Beuken, E., C. Vink, and C. A. Bruggeman.** 1998. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques.* **24**:748-50.
36. **Bhat, U. R., R. W. Carlson, M. Busch, and H. Mayer.** 1991. Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxy-octacosanoic acid in lipopolysaccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of *Proteobacteria*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **41**:213-217.
37. **Biedzka-Sarek, M., S. Salmenlinna, M. Gruber, A. N. Lupas, S. Meri, and M. Skurnik.** 2008. Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect.Immun.* **76**:5016-5027.
38. **Biedzka-Sarek, M., R. Venho, and M. Skurnik.** 2005. Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect.Immun.* **73**:2232-2244.
39. **Birtalan, S. C., R. M. Phillips, and P. Ghosh.** 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell.* **9**:971-80.
40. **Bisset, M. L., C. Powers, S. L. Abbot, and J. M. Janda.** 1990. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: Sources, Frequency, and serogroup distribution. *J.Clin.Microbiol.* **28**:910-912.
41. **Black, D. S. and J. B. Bliska.** 2000. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol.Microbiol.* **37**:515-527.
42. **Black, D. S., A. Marie-Cardine, B. Schraven, and J. B. Bliska.** 2000. The *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cell Microbiol.* **2**:401-414.
43. **Bleves, S. and G. R. Cornelis.** 2000. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes Infect.* **2**:1451-60.
44. **Bleves, S., M. N. Marenne, G. Detry, and G. R. Cornelis.** 2002. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* *yop* regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *J.Bacteriol.* **184**:3214-3223.

-
45. **Bliska, J. B., M. C. Copass, and S. Falkow.** 1993. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect.Immun.* **61**:3914-3921.
 46. **Bliska, J. B. and S. Falkow.** 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **89**:3561-3565.
 47. **Blocker, A., D. Holden, and G. Cornelis.** 2000. Type III secretion systems: what is the translocator and what is translocated? *Cell Microbiol.* **2**:387-390.
 48. **Boddicker, J. D. and B. D. Jones.** 2004. Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect.Immun.* **72**:2002-2013.
 49. **Boland, A. and G. R. Cornelis.** 1998. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect.Immun.* **66**:1878-1884.
 50. **Boland, A., M.-P. Sory, M. Iriarte, C. Kerbouch, P. Wattiau, and G. R. Cornelis.** 1996. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO Journal.* **15**:5191-201.
 51. **Bölin, I., L. Norlander, and H. Wolf-Watz.** 1982. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect.Immun.* **37**:506-512.
 52. **Bottone, E. J.** 1977. *Yersinia enterocolitica*: A panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Critical Rev.Microbiol.* **5**:211-241.
 53. **Boyd, A. P., I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 2000. 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.
 54. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
 55. **Brandenburg, K., H. Mayer, M. H. Koch, J. Weckesser, E. T. Rietschel, and U. Seydel.** 1993. Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur.J Biochem.* **218**:555-563.
 56. **Brenner, D. J., H. Bercovier, J. Ursing, J. M. Alonso, A. G. Steigerwalt, G. R. Fanning, G. P. Carter, and H. H. Mollaret.** 1980. *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.
 57. **Brissette, J. L., M. Russel, L. Weiner, and P. Model.** 1990. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **87**:862-866.
 58. **Brozek, K. A., K. Hosaka, A. D. Robertson, and C. R. Raetz.** 1989. Biosynthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid to lipid A. *J.Biol.Chem.* **264**:6956-6966.
 59. **Brozek, K. A. and C. R. Raetz.** 1990. Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acyl carrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate. *J.Biol.Chem.* **265**:15410-15417.

60. **Brubaker, R. R.** 2003. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersiniae*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect.Immun.* **71**:3673-3681.
61. **Brzostek, K., M. Brzostkowska, I. Bukowska, E. Karwicka, and A. Raczkowska.** 2007. OmpR negatively regulates expression of invasin in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology.* **153**:2416-2425.
62. **Buchrieser, C., R. Brosch, S. Bach, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1998. The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal asn tRNA genes. *Mol.Microbiol.* **30**:965-978.
63. **Buchrieser, C., C. Rusniok, L. Frangeul, E. Couve, A. Billault, F. Kunst, E. Carniel, and P. Glaser.** 1999. 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.
64. **Burghout, P., F. Beckers, E. de Wit, R. van Boxtel, G. R. Cornelis, J. Tommassen, and M. Koster.** 2004. Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **186**:5366-5375.
65. **Butler, T.** 1994. *Yersinia* infections: centennial of the discovery of the plague bacillus. *Clin.Infect.Dis.* **19**:655-661.
66. **Butt, H. L., D. L. Gordon, T. Leearcher, A. Moritz, and W. H. Merrell.** 1991. Relationship between clinical and milk isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Pathology.* **23**:153-157.
67. **Carlsson, K. E., J. Liu, P. J. Edqvist, and M. S. Francis.** 2007. Influence of the Cpx extracytoplasmic-stress-responsive pathway on *Yersinia* sp.-eukaryotic cell contact. *Infect.Immun.* **75**:4386-4399.
68. **Carniel, E., I. Guilvout, and M. Prentice.** 1996. Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **178**:6743-6751.
69. **Carniel, E., A. Guiyoule, I. Guilvout, and O. Mercereaupujalon.** 1992. Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol.Microbiol.* **6**:379-388.
70. **Caroff, M., D. R. Bundle, and M. B. Perry.** 1984. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9. *Eur.J.Biochem.* **139**:195-200.
71. **Carter, P. B.** 1975. Animal model of human disease. *Yersinia enterocolitica*. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am.J.Pathol.* **81**:703-706.
72. **Carter, P. B.** 1975. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect.Immun.* **11**:164-170.
73. **Carty, S. M., K. R. Sreekumar, and C. R. Raetz.** 1999. 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.
74. **Cathelyn, J. S., S. D. Crosby, W. W. Lathem, W. E. Goldman, and V. L. Miller.** 2006. RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **103**:13514-13519.
75. **Chadsey, M. S., J. E. Karlinsey, and K. T. Hughes.** 1998. The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma28 RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev.* **12**:3123-3136.

-
76. **Cheng, L. W., O. Kay, and O. Schneewind.** 2001. Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **183**:5293-5301.
 77. **Cherepanov, P. P. and W. Wackernagel.** 1995. 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.
 78. **Chilcott, G. S. and K. T. Hughes.** 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **64**:694-708.
 79. **China, B., B. T. Nguyen, M. Debruyere, and G. R. Cornelis.** 1994. Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect.Immun.* **62**:1275-1281.
 80. **Choi, K. H. and H. P. Schweizer.** 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with secondary, non-glmS-linked attTn7 sites: example *Proteus mirabilis* HI4320. *Nat.Protoc.* **1**:170-178.
 81. **Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** 1998. M-cell surface beta 1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect.Immun.* **66**:1237-1243.
 82. **Clementz, T., J. J. Bednarski, and C. R. Raetz.** 1996. 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.
 83. **Clementz, T., Z. M. Zhou, and C. R. H. Raetz.** 1997. 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.
 84. **Cohn, M. T., H. Ingmer, F. Mulholland, K. Jorgensen, J. M. Wells, and L. Brondsted.** 2007. Contribution of conserved ATP-dependent proteases of *Campylobacter jejuni* to stress tolerance and virulence. *Appl.Environ.Microbiol.* **73**:7803-7813.
 85. **Cornelis, G., C. Sluiter, C. Lambert de Rouvroit, and T. Michiels.** 1989. Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J.Bacteriol.* **171**:254-262.
 86. **Cornelis, G. R.** 1998. The *Yersinia* deadly kiss. *J.Bacteriol.* **180**:5495-504.
 87. **Cornelis, G. R.** 2000. Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* **355**:681-693.
 88. **Cornelis, G. R.** 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**:742-752.
 89. **Cornelis, G. R.** 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int.J.Med.Microbiol.* **291**:455-462.
 90. **Cornelis, G. R.** 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J.Cell.Biol.* **158**:401-408.
 91. **Cornelis, G. R., T. Biot, C. Lambert de Rouvroit, T. Michiels, B. Mulder, C. Sluiter, M.-P. Sory, M. van Bouchaute, and J.-C. Vanooteghem.** 1989. The *Yersinia yop* regulon. *Mol.Microbiol.* **3**:1455-1459.

92. **Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M.-P. Sory, and I. Stainier.** 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:1315-52.
93. **Cornelis, G. R., C. Sluifers, I. Delor, D. Geib, K. Kaniga, C. Lambert de Rouvroit, M.-P. Sory, J.-C. Vanooteghem, and T. Michiels.** 1991. *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol.Microbiol.* **5**:1023-1034.
94. **Cornelis, G. R. and H. Wolf-Watz.** 1997. The *Yersinia yop* virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol.Microbiol.* **23**:861-867.
95. **Cover, T. L. and R. C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N.Engl.J.Med.* **321**:16-24.
96. **Dame, R. T., C. Wyman, and N. Goosen.** 2001. Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA. *Biochimie.* **83**:231-234.
97. **Darwin, A. J.** 2005. The phage-shock-protein response. *Mol.Microbiol.* **57**:621-628.
98. **Darwin, A. J. and V. L. Miller.** 1999. Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol.Microbiol.* **32**:51-62.
99. **Darwin, A. J. and V. L. Miller.** 2001. 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.
100. **Datsenko, K. A. and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **97**:6640-6645.
101. **De Almeida, A. M. P., A. Guiyoule, I. Guilvout, I. Itean, G. Baranton, and E. Carniel.** 1993. Chromosomal *irp2* gene in *yersinia* - distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microbial Pathogenesis* **14**:9-21.
102. **De Koning-Ward, T. F. and R. M. Robins-Browne.** 1995. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia antrocolitica*. *Infect.Immun.* **63**:3790-3795.
103. **De Koning-Ward, T. F. and R. M. Robins-Browne.** 1996. Analysis of the urease gene complex of members of the genus *Yersinia*. *Gene.* **182**:225-8.
104. **De Koning-Ward, T. F. and R. M. Robins-Browne.** 1997. A novel mechanism of urease regulation in *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol.Lett.* **147**:221-226.
105. **Delor, I. and G. R. Cornelis.** 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect.Immun.* **60**:4269-4277.
106. **Delor, I., A. Kaeckenbeeck, G. Wauters, and G. R. Cornelis.** 1990. 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.
107. **Denecker, G., W. Declercq, C. A. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, M. van Gurp, M. P. Sory, P. Vandenaabeele, and G. R. Cornelis.** 2001. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J.Biol.Chem.* **276**:19706-19714.
108. **Deng, W., V. Burland, G. Plunkett, III, A. Boutin, G. F. Mayhew, P. Liss, N. T. Perna, D. J. Rose, B. Mau, S. Zhou, D. C. Schwartz, J. D. Fetherston, L. E. Lindler, R. R. Brubaker, G. V. Plano, S. C. Straley, K. A. Mcdonough, M. L. Nilles, J. S. Matson,**

-
- F. R. Blattner, and R. D. Perry.** 2002. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. J.Bacteriol. **184**:4601-4611.
109. **Deng, W. L. and H. C. Huang.** 1999. Cellular locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. J.Bacteriol. **181**:2298-2301.
110. **Dennis, J. J. and G. J. Zylstra.** 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. Appl.Environ.Microbiol. **64**:2710-2715.
111. **Ditta, G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X.-W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney, and D. R. Helinski.** 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid. **13**:149-153.
112. **Dorman, C. J.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. Nat.Rev.Microbiol. **2**:391-400.
113. **Dube, P. H., S. A. Handley, P. A. Revell, and V. L. Miller.** 2003. The *rovA* mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection. Infect.Immun. **71**:3512-3520.
114. **Dworkin, J., G. Jovanovic, and P. Model.** 2000. The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. J.Bacteriol. **182**:311-319.
115. **Egger, L. A. and M. Inouye.** 1997. Purification and characterization of the periplasmic domain of EnvZ osmosensor in *Escherichia coli*. Biochem.Biophys.Res.Commun. **231**:68-72.
116. **El Tahir, Y. and M. Skurnik.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. Int.J.Med.Microbiol. **291**:209-218.
117. **Elderkin, S., P. Bordes, S. Jones, M. Rappas, and M. Buck.** 2005. Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. J.Bacteriol. **187**:3238-3248.
118. **Elderkin, S., S. Jones, J. Schumacher, D. Studholme, and M. Buck.** 2002. Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF. J.Mol.Biol. **320**:23-37.
119. **Ellermeier, C. D. and J. M. Slauch.** 2004. RtsA coordinately regulates DsbA and the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. J.Bacteriol. **186**:68-79.
120. **Ellison, D. W. and V. L. Miller.** 2006. H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. J.Bacteriol. **188**:5101-5112.
121. **Ellison, D. W., B. Young, K. Nelson, and V. L. Miller.** 2003. YmoA negatively regulates expression of invasin from *Yersinia enterocolitica*. J.Bacteriol. **185**:7153-7159.
122. **Emödy, L., J. Heesemann, H. Wolf-Watz, M. Skurnik, G. Kapperud, P. O'Toole, and T. Wadström.** 1989. Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms. J.Bacteriol. **171**:6674-6679.
123. **Erfurth, S. E., S. Grobner, U. Kramer, D. S. Gunst, I. Soldanova, M. Schaller, I. B. Autenrieth, and S. Borgmann.** 2004. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. Infect.Immun. **72**:7045-7054.

124. **Ernst, R. K., E. C. Yi, L. Guo, K. B. Lim, J. L. Burns, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1999. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*. **286**:1561-1565.
125. **Fauconnier, A., A. Allaoui, A. Campos, A. Van Elsen, G. R. Cornelis, and A. Bollen.** 1997. 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.
126. **Felek, S. and E. S. Krukonis.** 2009. The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence. *Infect.Immun.* **77**:825-836.
127. **Ferber, D. M. and R. R. Brubaker.** 1981. Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect.Immun.* **31**:839-841.
128. **Fernandez, C., C. Hilty, S. Bonjour, K. Adeishvili, K. Pervushin, and K. Wuthrich.** 2001. Solution NMR studies of the integral membrane proteins OmpX and OmpA from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **504**:173-178.
129. **Fetherston, J. D., S. W. Bearden, and R. D. Perry.** 1996. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol.Microbiol.* **22**:315-325.
130. **Fetherston, J. D., V. J. Bertolino, and R. D. Perry.** 1999. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. *Mol.Microbiol.* **32**:289-299.
131. **Flügel, A., H. Schulze-Koops, J. Heesemann, K. Kuhn, L. Sorokin, H. Burkhardt, K. von der Mark, and F. Emmrich.** 1994. 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.
132. **Foultier, B., P. Troisfontaines, S. Muller, F. R. Opperdoes, and G. R. Cornelis.** 2002. Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J.Mol.Evol.* **55**:37-51.
133. **Foultier, B., P. Troisfontaines, D. Vertommen, M. N. Marenne, M. Rider, C. Parsot, and G. R. Cornelis.** 2003. Identification of substrates and chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B Ysa type III secretion system. *Infect.Immun.* **71**:242-253.
134. **Fournier, B., A. Gravel, D. C. Hooper, and P. H. Roy.** 1999. Strength and regulation of the different promoters for chromosomal beta-lactamases of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:850-855.
135. **Francis, M. S. and H. Wolf-Watz.** 1998. YopD of *Yersinia pseudotuberculosis* is translocated into the cytosol of HeLa epithelial cells: evidence of a structural domain necessary for translocation. *Mol.Microbiol.* **29**:799-813.
136. **Funahara, Y. and H. Nikaido.** 1980. Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **141**:1463-1465.
137. **Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, and P. Berche.** 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol.Microbiol.* **35**:1286-1294.
138. **Galvan, E. M., H. Chen, and D. M. Schifferli.** 2007. The Psa fimbriae of *Yersinia pestis* interact with phosphatidylcholine on alveolar epithelial cells and pulmonary surfactant. *Infect.Immun.* **75**:1272-1279.

-
139. **Genin, S. and C. A. Boucher.** 1994. 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.
 140. **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **68**:771-795.
 141. **Goldberg, A. L.** 1992. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur.J.Biochem.* **203**:9-23.
 142. **Gong, S., S. W. Bearden, V. A. Geoffroy, J. D. Fetherston, and R. D. Perry.** 2001. Characterization of the *Yersinia pestis* Yfu ABC inorganic iron transport system. *Infect.Immun.* **69**:2829-2837.
 143. **Gort, A. S. and V. L. Miller.** 2000. Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infect.Immun.* **68**:6633-6642.
 144. **Gottesman, S., W. P. Clark, V. Crecy-Lagard, and M. R. Maurizi.** 1993. ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* activities. *J.Biol.Chem.* **268**:22618-22626.
 145. **Green, R. C. and A. J. Darwin.** 2004. PspG, a new member of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein regulon. *J.Bacteriol.* **186**:4910-4920.
 146. **Greenwood, M. H. and W. L. Hooper.** 1990. Excretion of *Yersinia* spp. associated with consumption of pasteurized milk. *Epidemiol.Infect.* **104**:345-350.
 147. **Greenwood, M. H., W. L. Hooper, and J. C. Rodhouse.** 1990. The source of *Yersinia* spp. in pasteurized milk: an investigation at a dairy. *Epidemiol.Infect.* **104**:351-360.
 148. **Gripenberg-Lerche, C., M. Skurnik, and P. Toivanen.** 1995. Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Experimental studies with rats. *Infect.Immun.* **63**:3222-3226.
 149. **Gripenberg-Lerche, C., M. Skurnik, L. J. Zhang, K. O. Söderström, and P. Toivanen.** 1994. Role of YadA in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Experimental studies with rats. *Infect.Immun.* **62**:5568-5575.
 150. **Gripenberg-Lerche, C., L. Zhang, P. Ahtonen, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 2000. 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.
 151. **Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory, and G. R. Cornelis.** 2002. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect.Immun.* **70**:4165-4176.
 152. **Grützkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1990. 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.
 153. **Gunn, J. S. and S. I. Miller.** 1996. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J.Bacteriol.* **178**:6857-6864.
 154. **Guzman, L.-M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high- level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J.Bacteriol.* **177**:4121-4130.

155. **Haller, J. C., S. Carlson, K. J. Pederson, and D. E. Pierson.** 2000. A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol.Microbiol.* **36**:1436-1446.
156. **Hamburger, Z. A., M. S. Brown, R. R. Isberg, and P. J. Bjorkman.** 1999. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science.* **286**:291-295.
157. **Hamid, N., A. Gustavsson, K. Andersson, K. McGee, C. Persson, C. E. Rudd, and M. Fallman.** 1999. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb.Pathog.* **27**:231-242.
158. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580.
159. **Hansen, A. M., Y. Qiu, N. Yeh, F. R. Blattner, T. Durfee, and D. J. Jin.** 2005. SspA is required for acid resistance in stationary phase by downregulation of H-NS in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **56**:719-734.
160. **Hardie, K. R., S. Lory, and A. P. Pugsley.** 1996. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* **15**:978-988.
161. **Hardie, K. R., A. Seydel, I. Guilvout, and A. P. Pugsley.** 1996. The secretin-specific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions. *Mol.Microbiol.* **22**:967-976.
162. **Heesemann, J., B. Algermissen, and R. Laufs.** 1984. Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **46**:105-110.
163. **Heesemann, J., U. Gross, and L. Grüter.** 1987. Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **9**:312-316.
164. **Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt, and R. Laufs.** 1986. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect.Immun.* **54**:561-567.
165. **Heesemann, J. and L. Grüter.** 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol.Lett.* **40**:37-41.
166. **Heesemann, J., K. Hantke, T. Vocke, E. Saken, A. Rakin, I. Stojiljkovic, and R. Berner.** 1993. 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.
167. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science.* **269**:400-3.
168. **Heroven, A. K., K. Bohme, M. Rohde, and P. Dersch.** 2008. 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.
169. **Heroven, A. K., K. Bohme, H. Tran-Winkler, and P. Dersch.** 2007. Regulatory elements implicated in the environmental control of invasin expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv.Exp.Med.Biol.* **603**:156-166.
170. **Heroven, A. K. and P. Dersch.** 2006. 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.

-
171. **Heroven, A. K., G. Nagel, H. J. Tran, S. Parr, and P. Dersch.** 2004. RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.* **53**:871-888.
 172. **Heusipp, G., M. A. Schmidt, and V. L. Miller.** 2003. Identification of *rpoE* and *nadB* as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol.Lett.* **226**:291-298.
 173. **Hoiczky, E. and G. Blobel.** 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **98**:4669-4674.
 174. **Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* **19**:5989-5999.
 175. **Holmstrom, A., J. Olsson, P. Cherepanov, E. Maier, R. Nordfelth, J. Pettersson, R. Benz, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg.** 2001. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol.Microbiol.* **39**:620-632.
 176. **Horne, S. M. and B. M. Pruss.** 2006. 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.
 177. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:379-433.
 178. **Hughes, K. T., K. L. Gillen, M. J. Semon, and J. E. Karlinsey.** 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science.* **262**:1277-1280.
 179. **Inoue, T., K. Okamoto, T. Moriyama, T. Takahashi, K. Shimizu, and A. Miyama.** 1983. Effect of *Yersinia enterocolitica* ST on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. *Microbiol.Immunol.* **27**:159-166.
 180. **Iriarte, M. and G. R. Cornelis.** 1999. Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia yop* virulon. *J.Bacteriol.* **181**:675-680.
 181. **Iriarte, M., I. Stainier, A. V. Mikulskis, and G. R. Cornelis.** 1995. The *fliA* gene encoding sigma(28) in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **177**:2299-2304.
 182. **Isberg, R. and S. Falkow.** 1985. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature.* **317**:262-264.
 183. **Isberg, R. R.** 1989. 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.
 184. **Isberg, R. R.** 1990. Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol.Biol.Med.* **7**:73-82.
 185. **Isberg, R. R. and J. M. Leong.** 1990. Multiple b1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* **60**:861-871.
 186. **Isberg, R. R., D. L. Voorhis, and S. Falkow.** 1987. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**:769-778.

187. **Ishihama, A. and T. Saitoh.** 1979. Subunits of RNA polymerase in function and structure. IX. Regulation of RNA polymerase activity by stringent starvation protein (SSP). *J.Mol.Biol.* **129**:517-530.
188. **Iwobi, A., J. Heesemann, E. Garcia, E. Igwe, C. Noelting, and A. Rakin.** 2003. Novel virulence-associated type II secretion system unique to high-pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **71**:1872-1879.
189. **Izquierdo, L., S. Merino, M. Regue, F. Rodriguez, and J. M. Tomas.** 2003. Synthesis of a *Klebsiella pneumoniae* O-antigen heteropolysaccharide (O12) requires an ABC 2 transporter. *J.Bacteriol.* **185**:1634-1641.
190. **Jackson, M. W., E. Silva-Herzog, and G. V. Plano.** 2004. The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol.Microbiol.* **54**:1364-1378.
191. **Johansson, J., B. Dagberg, E. Richet, and B. E. Uhlin.** 1998. H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **180**:6117-6125.
192. **Journet, L., C. Agrain, P. Broz, and G. R. Cornelis.** 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science.* **302**:1757-1760.
193. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. 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.
194. **Kapatral, V., J. W. Campbell, S. A. Minnich, N. R. Thomson, P. Matsumura, and B. M. Pruss.** 2004. Gene array analysis of *Yersinia enterocolitica* FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate. *Microbiology.* **150**:2289-2300.
195. **Kapatral, V. and S. A. Minnich.** 1995. Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. *Mol.Microbiol.***17**:49-56.
196. **Kapatral, V., J. W. Olson, J. C. Pepe, V. L. Miller, and S. A. Minnich.** 1996. Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* class III flagellar genes. *Mol.Microbiol.* **19**:1061-1071.
197. **Kapperud, G., E. Namork, and H.-J. Skarpeid.** 1985. Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect.Immun.* **47**:561-566.
198. **Kapperud, G., E. Namork, M. Skurnik, and T. Nesbakken.** 1987. 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.
199. **Karbarz, M. J., S. R. Kalb, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 2003. Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhizobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. *J Biol.Chem.* **278**:39269-39279.
200. **Karch, H., S. Schubert, D. Zhang, W. Zhang, H. Schmidt, T. Olschlager, and J. Hacker.** 1999. A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect.Immun.* **67**:5994-6001.

-
201. **Katayama, Y., A. Kasahara, H. Kuraishi, and F. Amano.** 1990. Regulation of activity of an ATP-dependent protease, Clp, by the amount of a subunit, ClpA, in the growth of *Escherichia coli* cells. *J.Biochem.* **108**:37-41.
202. **Kim, D. W., G. Lenzen, A. L. Page, P. Legrain, P. J. Sansonetti, and C. Parsot.** 2005. The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **102**:14046-14051.
203. **Kinder, S. A., J. L. Badger, G. O. Bryant, J. C. Pepe, and V. L. Miller.** 1993. Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from *Yersinia enterocolitica* serotype O8 and construction of a transformable R(-)M(+) mutant. *Gene.* **136**:271-275.
204. **Kirjavainen, V., H. Jarva, M. Biedzka-Sarek, A. M. Blom, M. Skurnik, and S. Meri.** 2008. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and Ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS.Pathog.* **4**:e1000140.
205. **Kita, H. and H. Nikaido.** 1973. Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **113**:672-679.
206. **Kleerebezem, M., W. Crielaard, and J. Tommassen.** 1996. 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.
207. **Ko, M. and C. Park.** 2000. H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein. *J.Bacteriol.* **182**:4670-4672.
208. **Kolodziejek, A. M., D. J. Sinclair, K. S. Seo, D. R. Schnider, C. F. Deobald, H. N. Rohde, A. K. Viall, S. S. Minnich, C. J. Hovde, S. A. Minnich, and G. A. Bohach.** 2007. Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM. *Microbiology.* **153**:2941-2951.
209. **Koretke, K. K., P. Szczesny, M. Gruber, and A. N. Lupas.** 2006. Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J.Struct.Biol.* **155**:154-161.
210. **Koster, M., W. Bitter, H. De Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis, and J. Tommassen.** 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol.Microbiol.* **26**:789-797.
211. **Krall, R., Y. Zhang, and J. T. Barbieri.** 2004. Intracellular membrane localization of *Pseudomonas* ExoS and *Yersinia* YopE in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **279**:2747-2753.
212. **Lahtinen, P., A. Brzezinska, and M. Skurnik.** 2003. Temperature and growth phase regulate the transcription of the O-antigen gene cluster of *Yersinia enterocolitica* O:3, p. 289-292. *In* M. Skurnik, K. Granfors, and J. A. Bengoechea (eds.), *The Genus Yersinia: entering the functional genomic era.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
213. **Laird, W. J. and D. C. Cavanaugh.** 1980. Correlation of autoagglutination and virulence in *yersiniae*. *J.Clin.Microbiol.* **11**:430-432.
214. **Lambert de Rouvroit, C., C. Sluifers, and G. R. Cornelis.** 1992. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.* **6**:395-409.
215. **Lawrenz, M. B. and V. L. Miller.** 2007. Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic *yersiniae*. *J.Bacteriol.* **189**:5963-5975.

216. **Lebbar, S., D. Karibian, C. Deprun, and M. Caroff.** 1994. 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.
217. **Lee, W. H., R. E. Smith, J. M. Damare, M. E. Harris, and R. W. Johnston.** 1981. Evaluation of virulence test procedures for *Yersinia enterocolitica* recovered from foods. *J.Appl.Bacteriol.* **50**:529-539.
218. **Liu, X. and P. Matsumura.** 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J.Bacteriol.* **176**:7345-7351.
219. **Liu, X. and P. Matsumura.** 1995. An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene.* **164**:81-84.
220. **Liu, X. and P. Matsumura.** 1996. Differential regulation of multiple overlapping promoters in flagellar class II operons in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **21**:613-620.
221. **Lloyd, L. J., S. E. Jones, G. Jovanovic, P. Gyaneshwar, M. D. Rolfe, A. Thompson, J. C. Hinton, and M. Buck.** 2004. Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG). *J.Biol.Chem.* **279**:55707-55714.
222. **Lloyd, S. A., A. Forsberg, H. Wolf-Watz, and M. S. Francis.** 2001. Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.* **9**:367-371.
223. **Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz.** 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol.Microbiol.* **39**:520-531.
224. **Lubeck, P. S., J. Hoorfar, P. Ahrens, and M. Skurnik.** 2003. Cloning and characterization of the *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 lipopolysaccharide O-antigen gene cluster. *Adv.Exp.Med.Biol.* **529**:207-209.
225. **Lugtenberg, B. and A. L. Van.** 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim.Biophys.Acta.* **737**:51-115.
226. **Mack, D., J. Heesemann, and R. Laufs.** 1994. Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Med.Microbiol.Immunol.* **183**:217-227.
227. **Macnab, R. M.** 1996. Flagella and motility, p. 123-142. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
228. **Macnab, R. M.** 1999. The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J.Bacteriol.* **181**:7149-7153.
229. **Madrid, C., C. Balsalobre, J. Garcia, and A. Juarez.** 2007. The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Mol.Microbiol.* **63**:7-14.
230. **Manoil, C. and J. Beckwith.** 1985. TnphoA: A transposon for protein export signals. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **82**:8129-8133.

-
231. **Mantle, M., L. Basaraba, S. C. Peacock, and D. G. Gall.** 1989. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect.Immun.* **57**:3292-3299.
232. **Marenne, M. N., L. Journet, L. J. Mota, and G. R. Cornelis.** 2003. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb.Pathog.* **35**:243-258.
233. **Martinez, R. J.** 1989. Thermoregulation-dependent expression of *Yersinia enterocolitica* protein P1 imparts serum resistance to *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* **171**:3732-3739.
234. **Matsumoto, H. and G. M. Young.** 2006. Proteomic and functional analysis of the suite of Ysp proteins exported by the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *Mol.Microbiol.* **59**:689-706.
235. **Matsumoto, H. and G. M. Young.** 2009. Translocated effectors of *Yersinia*. *Curr.Opin.Microbiol.* **12**:94-100.
236. **Maxson, M. E. and A. J. Darwin.** 2004. 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.Bacteriol.* **186**:4199-4208.
237. **Maxson, M. E. and A. J. Darwin.** 2006. PspB and PspC of *Yersinia enterocolitica* are dual function proteins: regulators and effectors of the phage-shock-protein response. *Mol.Microbiol.* **59**:1610-1623.
238. **McDermott, P. F., F. Ciacci-Woolwine, J. A. Snipes, and S. B. Mizel.** 2000. High-affinity interaction between Gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect.Immun.* **68**:5525-5529.
239. **McIntyre, M. and E. Nnochiri.** 1986. A case of hospital-acquired *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis. *J.Hosp.Infect.* **7**:299-301.
240. **Mecsas, J., I. Bilis, and S. Falkow.** 2001. 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.
241. **Merhej, V., T. Adekambi, I. Pagnier, D. Raoult, and M. Drancourt.** 2008. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **58**:779-784.
242. **Mertz, A. K., S. Ugrinovic, R. Lauster, P. Wu, M. Grolms, U. Bottcher, H. Appel, Z. Yin, E. Schiltz, S. Batsford, C. Schauer-Petrowski, J. Braun, A. Distler, and J. Sieper.** 1998. Characterization of the synovial T cell response to various recombinant *Yersinia* antigens in *Yersinia enterocolitica*-triggered reactive arthritis. Heat-shock protein 60 drives a major immune response. *Arthritis Rheum.* **41**:315-326.
243. **Mertz, A. K. H., S. R. Batsford, E. Curschellas, M. J. Kist, and K. B. Gondolf.** 1991. Cationic *Yersinia* antigen-induced chronic allergic arthritis in rats - A model for reactive arthritis in humans. *J.Clin.Invest.* **88**:632-642.
244. **Michiels, T. and G. R. Cornelis.** 1991. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J.Bacteriol.* **173**:1677-1685.
245. **Michiels, T., P. Wattiau, R. Bresseur, J.-M. Ruyschaert, and G. Cornelis.** 1990. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect.Immun.* **58**:2840-2849.

246. **Mikulskis, A. V., I. Delor, V. H. Thi, and G. R. Cornelis.** 1994. Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol.Microbiol.* **14**:905-915.
247. **Miller, V. L., K. B. Beer, G. Heusipp, B. M. Young, and M. R. Wachtel.** 2001. Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol.Microbiol.* **41**:1053-62.
248. **Miller, V. L., J. B. Bliska, and S. Falkow.** 1990. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* ail gene and characterization of the Ail protein product. *J.Bacteriol.* **172**:1062-1069.
249. **Miller, V. L. and S. Falkow.** 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect.Immun.* **56**:1242-1248.
250. **Miller, V. L. and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J.Bacteriol.* **170**:2575-2583.
251. **Miller, W. G., J. H. Leveau, and S. E. Lindow.** 2000. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol.Plant Microbe Interact.* **13**:1243-1250.
252. **Minnich, S. A. and H. N. Rohde.** 2007. A rationale for repression and/or loss of motility by pathogenic *Yersinia* in the mammalian host. *Adv.Exp.Med.Biol.* **603**:298-310.
253. **Model, P., G. Jovanovic, and J. Dworkin.** 1997. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Mol.Microbiol.* **24**:255-261.
254. **Moran, A. P., B. Lindner, and E. J. Walsh.** 1997. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J.Bacteriol.* **179**:6453-6463.
255. **Mota, L. J., L. Journet, I. Sorg, C. Agrain, and G. R. Cornelis.** 2005. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science.* **307**:1278.
256. **Muller-Loennies, S., S. Rund, E. Ervela, M. Skurnik, and O. Holst.** 1999. 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.
257. **Nagel, G., A. Lahrz, and P. Dersch.** 2001. 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.
258. **Najdenski, H., E. Golkocheva, V. Kussovski, E. Ivanova, V. Manov, M. Iliev, A. Vesselinova, J. A. Bengoechea, and M. Skurnik.** 2006. Experimental pig yersiniosis to assess attenuation of *Yersinia enterocolitica* O:8 mutant strains. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **47**:425-435.
259. **Najdenski, H., E. Golkocheva, A. Vesselinova, J. A. Bengoechea, and M. Skurnik.** 2003. 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 Immunol.Med.Microbiol.* In press.
260. **Navarre, W. W., M. McClelland, S. J. Libby, and F. C. Fang.** 2007. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev.* **21**:1456-1471.

-
261. **Navarro, L., A. Koller, R. Nordfelth, H. Wolf-Watz, S. Taylor, and J. E. Dixon.** 2007. Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol.Cell.* **26**:465-477.
262. **Neyt, C. and G. R. Cornelis.** 1999. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol.Microbiol.* **31**:143-156.
263. **Ngampasutadol, J., S. Ram, A. M. Blom, H. Jarva, A. E. Jerse, E. Lien, J. Goguen, S. Gulati, and P. A. Rice.** 2005. Human C4b-binding protein selectively interacts with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific infection. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **102**:17142-17147.
264. **Nieto, J. M., C. Madrid, E. Miquelay, J. L. Parra, S. Rodriguez, and A. Juarez.** 2002. Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J.Bacteriol.* **184**:629-635.
265. **Nieto, J. M., C. Madrid, A. Prenafeta, E. Miquelay, C. Balsalobre, M. Carrascal, and A. Juarez.** 2000. Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol.Gen.Genet.* **263**:349-358.
266. **Niléhn, B.** 1969. Electron microscopic studies on flagellation in different strains of *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* **77**:527-541.
267. **Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, and T. Iino.** 1990. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol.Gen.Genet.* **221**:139-147.
268. **Owen-Hughes, T. A., G. D. Pavitt, D. S. Santos, J. M. Sidebotham, C. S. J. Hulton, J. C. D. Hinton, and C. F. Higgins.** 1992. The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell.* **71**:255-265.
269. **Paerregaard, A., F. Espersen, and M. Skurnik.** 1991. Adhesion of *Yersiniae* to rabbit intestinal constituents: Role of outer membrane protein YadA and modulation by intestinal mucus. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **12**:171-175.
270. **Pai, C. H. and L. DeStephano.** 1982. Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **35**:605-611.
271. **Pai, C. H. and V. Mors.** 1978. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **19**:908-911.
272. **Pai, C. H., V. Mors, and S. Toma.** 1978. Prevalence of enterotoxigenicity in human and nonhuman isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **22**:334-338.
273. **Parkhill, J., B. W. Wren, N. R. Thomson, R. W. Titball, M. T. Holden, M. B. Prentice, M. Sebaihia, K. D. James, C. Churcher, K. L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S. D. Bentley, K. Brooks, A. M. Cerdeno-Tarraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R. M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P. C. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature.* **413**:523-527.
274. **Parsot, C., C. Hamiaux, and A. L. Page.** 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr.Opin.Microbiol.* **6**:7-14.
275. **Payne, P. L. and S. C. Straley.** 1998. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J.Bacteriol.* **180**:3882-3890.

276. **Pederson, K. J., S. Carlson, and D. E. Pierson.** 1997. The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulates *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.* **26**:99-107.
277. **Pelludat, C., A. Rakin, C. A. Jacobi, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1998. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J.Bacteriol.* **180**:538-46.
278. **Pepe, J. C., J. L. Badger, and V. L. Miller.** 1994. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica inv* gene. *Mol.Microbiol.* **11**:123-135.
279. **Pepe, J. C. and V. L. Miller.** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasins: A primary role in the initiation of infection. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **90**:6473-6477.
280. **Pepe, J. C., M. R. Wachtel, E. Wagar, and V. L. Miller.** 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect.Immun.* **63**:4837-4848.
281. **Persson, C., R. Nordfelth, A. Holmstrom, S. Hakansson, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz.** 1995. Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol.Microbiol.* **18**:135-150.
282. **Pettersson, J., A. Holmstrom, J. Hill, S. Leary, E. Frithz-Lindsten, A. von Euler-Matell, E. Carlsson, R. Titball, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1999. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol.Microbiol.* **32**:961-976.
283. **Pierson, D. E.** 1994. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance Ail-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. *J.Bacteriol.* **176**:4043-4051.
284. **Pierson, D. E. and S. Falkow.** 1993. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect.Immun.* **61**:1846-1852.
285. **Pilz, D., T. Vocke, J. Heesemann, and V. Brade.** 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect.Immun.* **60**:189-195.
286. **Plano, G. V., J. B. Day, and F. Ferracci.** 2001. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol.Microbiol.* **40**:284-293.
287. **Prehna, G., M. I. Ivanov, J. B. Bliska, and C. E. Stebbins.** 2006. *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell.* **126**:869-880.
288. **Prentice, M. B., K. D. James, J. Parkhill, S. G. Baker, K. Stevens, M. N. Simmonds, K. L. Mungall, C. Churcher, P. C. Oyston, R. W. Titball, B. W. Wren, J. Wain, D. Pickard, T. T. Hien, J. J. Farrar, and G. Dougan.** 2001. *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid. *J.Bacteriol.* **183**:2586-2594.
289. **Pujol, C. and J. B. Bliska.** 2005. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular *yersiniae*. *Clin.Immunol.* **114**:216-226.
290. **Raetz, C. R. and C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu.Rev.Biochem.* **71**:635-700.
291. **Rakin, A., C. Noelting, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1999. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **67**:5265-5274.

-
292. **Rakin, A., P. Urbitsch, and J. Heesemann.** 1995. Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *J.Bacteriol.* **177**:2292-2298.
293. **Ramamurthi, K. S. and O. Schneewind.** 2002. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: Mutational analysis of the yopQ secretion signal. *J.Bacteriol.* **184**:3321-8.
294. **Rao, M. C., S. Guandalini, W. J. Laird, and M. Field.** 1979. Effects of heat-stable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum. *Infect.Immun.* **26**:875-878.
295. **Rao, M. C., S. Guandalini, P. L. Smith, and M. Field.** 1980. Mode of action of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. Tissue and subcellular specificities and role of cyclic GMP. *Biochim.Biophys.Acta* **632**:35-46.
296. **Ratnam, S., E. Mercer, B. Picco, S. Parsons, and R. Butler.** 1982. A nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype 1. *J.Infect.Dis.* **145**:242-247.
297. **Reeves, P. R., E. Pacinelli, and L. Wang.** 2003. O antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis*, p. in press. In M. Skurnik, K. Granfors, and J. A. Bengoechea (eds.), *The Genus Yersinia: entering the functional genomic era.* Kluwer Academic/Plenum Publishers.
298. **Revell, P. A. and V. L. Miller.** 2000. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol.Microbiol.* **35**:677-685.
299. **Riley, G. and S. Toma.** 1989. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using Congo red-magnesium Oxalate agar medium. *J Clin.Microbiol.* **27**:213-214.
300. **Riot, B., P. Berche, and M. Simonet.** 1997. Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect.Immun.* **65**:1985-1990.
301. **Roggenkamp, A., H.-R. Neuberger, A. Flügel, T. Schmoll, and J. Heesemann.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol.Microbiol.* **16**:1207-1219.
302. **Roggenkamp, A., K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt, and J. Heesemann.** 1996. 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.
303. **Roggenkamp, A., S. Schubert, C. A. Jacobi, and J. Heesemann.** 1995. Dissection of the *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid pYVO8 into an operating unit and virulence gene modules. *FEMS Microbiol.Lett.* **134**:69-73.
304. **Rohde, J. R., J. M. Fox, and S. A. Minnich.** 1994. Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling. *Mol.Microbiol.* **12**:187-199.
305. **Rohde, J. R., X. S. Luan, H. Rohde, J. M. Fox, and S. A. Minnich.** 1999. The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J.Bacteriol.* **181**:4198-4204.
306. **Rosqvist, R.** Obstruction of the primary host defence by cytotoxic Yop proteins of *Yersinia*. 1-112. 1990. Conference Proceeding

307. **Rosqvist, R., I. Bölin, and H. Wolf-Watz.** 1988. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-ancoded ability involving the Yop2b protein. *Infect Immun* **56**:2139-2143.
308. **Rosqvist, R., Å. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1990. Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in host cells induces actin microfilament disruption. Manuscript in PhD thesis .
309. **Rosqvist, R., Å. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect.Immun.* **59**:4562-4569.
310. **Rosqvist, R., Å. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1991. Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochem.Soc.Trans.* **19**:1131-1132.
311. **Rosqvist, R., M. Skurnik, and H. Wolf-Watz.** 1988. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature.* **334**:522-525.
312. **Rosqvist, R. and H. Wolf-Watz.** 1986. Virulence plasmid-associated HeLa cell induced cytotoxicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb.Pathog.* **1**:229-240.
313. **Ruckdeschel, K., S. Harb, A. Roggenkamp, M. Hornef, R. Zumbihl, S. Köhler, J. Heesemann, and B. Rouot.** 1998. *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.
314. **Russo, F. D. and T. J. Silhavy.** 1991. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J.Mol.Biol.* **222**:567-580.
315. **Saha, S., P. Chowdhury, A. Mazumdar, A. Pal, P. Das, and M. K. Chakrabarti.** 2009. 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.
316. **Saha, S., D. D. Gupta, and M. K. Chakrabarti.** 2005. 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.
317. **Saigi, F., N. Climent, N. Pique, C. Sanchez, S. Merino, X. Rubires, A. Aguilar, J. M. Tomas, and M. Regue.** 1999. Genetic analysis of the *Serratia marcescens* N28b O4 antigen gene cluster. *J.Bacteriol.* **181**:1883-1891.
318. **Saken, E., A. Rakin, and J. Heesemann.** 2000. Molecular characterization of a novel siderophore-independent iron transport system in *Yersinia*. *Int.J.Med.Microbiol.* **290**:51-60.
319. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
320. **Samuel, G. and P. Reeves.** 2003. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr.Res.* **338**:2503-2519.
321. **Samuelsson, K., B. Lindberg, and R. R. Brubaker.** 1974. Structure of O-specific side chains of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis*. *J.Bacteriol.* **117**:1010-1016.

-
322. **Sandkvist, M.** 2001. Type II secretion and pathogenesis. *Infect.Immun.* **69**:3523-3535.
323. **Sandkvist, M., L. O. Michel, L. P. Hough, V. M. Morales, M. Bagdasarian, M. Koomey, V. J. DiRita, and M. Bagdasarian.** 1997. General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J.Bacteriol.* **179**:6994-7003.
324. **Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stainier, and G. R. Cornelis.** 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J.Bacteriol.* **180**:1207-14.
325. **Sauvonnet, N., I. Lambermont, B. P. van der, and G. R. Cornelis.** 2002. 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.
326. **Sauvonnet, N., B. Pradet-Balade, J. A. Garcia-Sanz, and G. R. Cornelis.** 2002. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J.Biol.Chem.* **277**:25133-25142.
327. **Schmiel, D. H., E. Wagar, L. Karamanou, D. Weeks, and V. L. Miller.** 1998. Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect.Immun.* **66**:3941-51.
328. **Schmiel, D. H., G. M. Young, and V. L. Miller.** 2000. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *ypIA* is part of the flagellar regulon. *J.Bacteriol.* **182**:2314-2320.
329. **Schotte, P., G. Denecker, B. A. Van Den, P. Vandenaabeele, G. R. Cornelis, and R. Beyaert.** 2004. Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J.Biol.Chem.* **279**:25134-25142.
330. **Schubert, S., A. Rakin, H. Karch, E. Carniel, and J. Heesemann.** 1998. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect.Immun.* **66**:480-485.
331. **Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, and F. Emmrich.** 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic *Yersiniae* mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect.Immun.* **61**:2513-2519.
332. **Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark, and F. Emmrich.** 1992. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen. *Infect.Immun.* **60**:2153-2159.
333. **Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark, and F. Emmrich.** 1995. Characterization of the binding region for the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA on types I and II collagen. *Arthritis and Rheumatism.* **38**:1283-1289.
334. **Sebbane, F., A. Devalckenaere, J. Foulon, E. Carniel, and M. Simonet.** 2001. 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.
335. **Shao, J., T. Prince, S. D. Hartson, and R. L. Matts.** 2003. Phosphorylation of serine 13 is required for the proper function of the Hsp90 co-chaperone, Cdc37. *J.Biol.Chem.* **278**:38117-38120.
336. **Shi, W., Y. Zhou, J. Wild, J. Adler, and C. A. Gross.** 1992. DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **174**:6256-6263.

337. **Shigekawa, K. and W. J. Dower.** 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques*. **6**:742-751.
338. **Shin, S. and C. Park.** 1995. Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J.Bacteriol.* **177**:4696-4702.
339. **Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology*. **1**:784-791.
340. **Simonet, M., S. Richard, and P. Berche.** 1990. Electron microscopic evidence for *in vivo* extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect.Immun.* **58**:841-845.
341. **Simonet, M., B. Riot, N. Fortineau, and P. Berche.** 1996. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect.Immun.* **64**:375-379.
342. **Singh, I. and J. S. Viridi.** 2004. Production of Yersinia stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *J.Med.Microbiol.* **53**:1065-1068.
343. **Skurnik, M.** 1985. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect.Immun.* **47**:183-190.
344. **Skurnik, M.** 1995. Role of YadA in *Yersinia enterocolitica*-induced reactive arthritis: a hypothesis. *Trends Microbiol.* **3**:318-319.
345. **Skurnik, M.** 1999. Molecular genetics of *Yersinia* lipopolysaccharide, p. 23-51. *In* J. Goldberg (ed.), *Genetics of Bacterial Polysaccharides*. CRC Press, Boca Raton, FL.
346. **Skurnik, M., S. Batsford, A. Mertz, E. Schiltz, and P. Toivanen.** 1993. The putative arthritogenic cationic 19-kilodalton antigen of *Yersinia enterocolitica* is a urease β -subunit. *Infect.Immun.* **61**:2498-2504.
347. **Skurnik, M. and J. A. Bengoechea.** 2003. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae*. *Carbohydr.Res.* **338**:2521-2529.
348. **Skurnik, M., I. Bölin, H. Heikkinen, S. Piha, and H. Wolf-Watz.** 1984. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J.Bacteriol.* **158**:1033-1036.
349. **Skurnik, M., Y. El Tahir, M. Saarinen, S. Jalkanen, and P. Toivanen.** 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect.Immun.* **62**:1252-1261.
350. **Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervelä.** 2000. 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.
351. **Skurnik, M. and P. Toivanen.** 1992. LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J.Bacteriol.* **174**:2047-2051.
352. **Skurnik, M. and P. Toivanen.** 1993. *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide: genetics and virulence. *Trends Microbiol.* **1**:148-152.

-
353. **Skurnik, M., R. Venho, J.-A. Bengoechea, and I. Moriyón.** 1999. 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.
354. **Skurnik, M., R. Venho, P. Toivanen, and A. Al-Hendy.** 1995. A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. *Mol.Microbiol.* **17**:575-594.
355. **Skurnik, M. and H. Wolf-Watz.** 1989. Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol.Microbiol.* **3**:517-529.
356. **Sodeinde, O. A., Y. V. Subrahmanyam, K. Stark, T. Quan, Y. Bao, and J. D. Goguen.** 1992. A surface protease and the invasive character of plague. *Science.* **258**:1004-1007.
357. **Sorg, J. A., B. Blaylock, and O. Schneewind.** 2006. Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA.* **103**:16490-16495.
358. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. 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., USA.* **92**:11998-12002.
359. **Sprague, L. D. and H. Neubauer.** 2005. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**:831-835.
360. **Sprague, L. D., H. C. Scholz, S. Amann, H. J. Busse, and H. Neubauer.** 2008. *Yersinia similis* sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **58**:952-958.
361. **Staggs, T. M., J. D. Fetherston, and R. D. Perry.** 1994. Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis* fur mutation. *J.Bacteriol.* **176**:7614-7624.
362. **Stebbins, C. E. and J. E. Galan.** 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature.* **414**:77-81.
363. **Stoebel, D. M., A. Free, and C. J. Dorman.** 2008. Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology.* **154**:2533-2545.
364. **Straley, S. C. and R. D. Perry.** 1995. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol.* **3**:310-317.
365. **Straley, S. C., E. Skrzypek, G. V. Plano, and J. B. Bliska.** 1993. Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect.Immun.* **61**:3105-3110.
366. **Tahir, Y. E., P. Kuusela, and M. Skurnik.** 2000. Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSV. *Mol.Microbiol.* **37**:192-206.
367. **Takaya, A., M. Suzuki, H. Matsui, T. Tomoyasu, H. Sashinami, A. Nakane, and T. Yamamoto.** 2003. Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection of mice. *Infect.Immun.* **71**:690-696.
368. **Tamm, A., A. M. Tarkkanen, T. K. Korhonen, P. Kuusela, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1993. 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.

369. **Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* **6**:805-816.
370. **Thomson, N. R., S. Howard, B. W. Wren, M. T. Holden, L. Crossman, G. L. Challis, C. Churcher, K. Mungall, K. Brooks, T. Chillingworth, T. Feltwell, Z. Abdellah, H. Hauser, K. Jagels, M. Maddison, S. Moule, M. Sanders, S. Whitehead, M. A. Quail, G. Dougan, J. Parkhill, and M. B. Prentice.** 2006. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS.Genet.* **2**:e206.
371. **Tomoyasu, T., T. Ohkishi, Y. Ukyo, A. Tokumitsu, A. Takaya, M. Suzuki, K. Sekiya, H. Matsui, K. Kutsukake, and T. Yamamoto.** 2002. The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J.Bacteriol.* **184**:645-653.
372. **Tomoyasu, T., A. Takaya, E. Isogai, and T. Yamamoto.** 2003. Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol.Microbiol.* **48**:443-452.
373. **Tran, A. X., M. J. Karbarz, X. Wang, C. R. Raetz, S. C. McGrath, R. J. Cotter, and M. S. Trent.** 2004. Periplasmic cleavage and modification of the 1-phosphate group of *Helicobacter pylori* lipid A. *J.Biol.Chem.* **279**:55780-55791.
374. **Tran, H. J., A. K. Heroven, L. Winkler, T. Spreter, B. Beatrix, and P. Dersch.** 2005. Analysis of RovA, a transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation. *J.Biol.Chem.* **280**:42423-42432.
375. **Tupper, A. E., T. A. Owenhughes, D. W. Ussery, D. S. Santos, D. J. P. Ferguson, J. M. Sidebotham, J. C. D. Hinton, and C. F. Higgins.** 1994. The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. *EMBO J.* **13**:258-268.
376. **Venecia, K. and G. M. Young.** 2005. Environmental regulation and virulence attributes of the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *Infect.Immun.* **73**:5961-5977.
377. **Vogt, J. and G. E. Schulz.** 1999. The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure.* **7**:1301-1309.
378. **Von Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, G. Schmidt, K. Aktories, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist.** 2000. 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.
379. **Wachtel, M. R. and V. L. Miller.** 1995. *In vitro* and *in vivo* characterization of an *ail* mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **63**:2541-2548.
380. **Walker, K. A. and V. L. Miller.** 2004. Regulation of the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* by YsaE/SycB and YsrS/YsrR. *J.Bacteriol.* **186**:4056-4066.
381. **Walker, P. J. and D. J. Grimes.** 1985. A note on *Yersinia enterocolitica* in a swine farm watershed. *J.Appl.Microbiol.* **58**:139-143.
382. **Wang, X., M. J. Karbarz, S. C. McGrath, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 2004. 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.

-
383. **Wattiau, P., B. Bernier, P. Deslee, T. Michiels, and G. R. Cornelis.** 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. Proc.Natl.Acad.Sci.,USA. **91**:10493-10497.
384. **Wauters, G., M. Janssens, A. D. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1988. *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. Int.J.Syst.Bacteriol. **38**:424-429.
385. **Weiner, L., J. L. Brissette, and P. Model.** 1991. 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 Dev. **5**:1912-1923.
386. **Weiner, L., J. L. Brissette, N. Ramani, and P. Model.** 1995. Analysis of the proteins and cis-acting elements regulating the stress-induced phage shock protein operon. Nucleic Acids Res. **23**:2030-2036.
387. **West, N. P., P. Sansonetti, J. Mounier, R. M. Exley, C. Parsot, S. Guadagnini, M. C. Prevost, A. Prochnicka-Chalufour, M. Delepierre, M. Tanguy, and C. M. Tang.** 2005. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. Science. **307**:1313-1317.
388. **Whitfield, C. and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol.Microbiol. **31**:1307-1319.
389. **Wilkinson, S. G.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides - themes and variations. Prog.Lipid.Res. **35**:283-343.
390. **Williams, M. D., T. X. Ouyang, and M. C. Flickinger.** 1994. Glutathione S-transferase-sspA fusion binds to *Escherichia coli* RNA polymerase and complements delta sspA mutation allowing phage P1 replication. Biochem.Biophys.Res.Comm. **201**:123-127.
391. **Williamson, H. S. and A. Free.** 2005. A truncated H-NS-like protein from enteropathogenic *Escherichia coli* acts as an H-NS antagonist. Mol.Microbiol. **55**:808-827.
392. **Witowski, S. E., K. A. Walker, and V. L. Miller.** 2008. YspM, a newly identified Ysa type III secreted protein of *Yersinia enterocolitica*. J.Bacteriol. **190**:7315-7325.
393. **Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau, and G. R. Cornelis.** 1994. Yscn, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. J.Bacteriol. **176**:1561-1569.
394. **Wojtkowiak, D., C. Georgopoulos, and M. Zylicz.** 1993. Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. **268**:22609-22617.
395. **Wu, T., A. C. McCandlish, L. S. Gronenberg, S. S. Chng, T. J. Silhavy, and D. Kahne.** 2006. Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci., USA. **103**:11754-11759.
396. **Wulff-Strobel, C. R., A. W. Williams, and S. C. Straley.** 2002. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. Mol.Microbiol. **43**:411-423.
397. **Yamamoto, T., H. Sashinami, A. Takaya, T. Tomoyasu, H. Matsui, Y. Kikuchi, T. Hanawa, S. Kamiya, and A. Nakane.** 2001. Disruption of the genes for ClpXP protease in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in persistent infection in mice, and development of persistence requires endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. Infect.Immun. **69**:3164-3174.

398. **Yang, Y., J. J. Merriam, J. P. Mueller, and R. R. Isberg.** 1996. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect.Immun.* **64**:2483-2489.
399. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**:103-119.
400. **Young, B. M. and G. M. Young.** 2002. YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol* **184**:1324-1334.
401. **Young, G. M., D. Amid, and V. L. Miller.** 1996. A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J.Bacteriol.* **178**:6487-6495.
402. **Young, G. M., J. L. Badger, and V. L. Miller.** 2000. Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **68**:4323-4326.
403. **Young, G. M. and V. L. Miller.** 1997. Identification of novel chromosomal *loci* affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol.Microbiol.* **25**:319-328.
404. **Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller.** 1999. 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., USA.* **96**:6456-6461.
405. **Young, G. M., M. J. Smith, S. A. Minnich, and V. L. Miller.** 1999. The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J.Bacteriol.* **181**:2823-2833.
406. **Zhang, L.** 1996. University of Turku. Molecular genetics of the O-antigen of *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. PhD thesis.
407. **Zhang, L., A. Al-Hendy, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1993. 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.
408. **Zhang, L., J. Radziejewska-Lebrecht, D. Krajewska-Pietrasik, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1997. 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.
409. **Zhang, L., P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1996. The gene cluster directing O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Identification of the genes for mannose and galactose biosynthesis and the gene for the O-antigen polymerase. *Microbiology* **142**:277-288.
410. **Zhang, Y., J. Murtha, M. A. Roberts, R. M. Siegel, and J. B. Bliska.** 2008. Type III secretion decreases bacterial and host survival following phagocytosis of *Yersinia pseudotuberculosis* by macrophages. *Infect.Immun.* **76**:4299-4310.
411. **Zuber, F., D. Kotlarz, S. Rimsky, and H. Buc.** 1994. Modulated expression of promoters containing upstream curved DNA sequences by the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *Mol.Microbiol.* **12**:231-240.

ANEXO I

Tabla 2. Cebadores utilizados en este estudio.

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
YeO8ProvAf	ACAAATGTATATATACCGTCGATGC	Amplificar la región promotora del gen <i>rovA</i> de YeO8 para construir cepa 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>cccaagcttg</u> AACATAAATCGAATGCCCGTAG	Amplificar el gen <i>yadA</i> de YeO8 para comprobar la presencia de pYV en cepas de <i>Y. enterocolitica</i>
YadAgenr	<u>gctctagag</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>cccaagcttg</u> CCTCGTCATTATTGGCAAATGC	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>
YopEPf	<u>cggatccg</u> GGTAAACATTAATATTTGCCCGAC	Amplificar la región promotora del gen <i>yopE</i> de YeO8 para construir cepa indicadora
YopEPr	<u>cccaagcttg</u> GCTGTGAGACTGAGCGCCAG	Amplificar la región promotora del gen <i>yopE</i> de YeO8 para construir cepa indicadora

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
virFPf	<u>cggatccg</u> CCCTCTCTTTTCCAGAGCGAG	Amplificar la región promotora del gen <i>virF</i> de YeO8 para construir cepa indicadora
virFPr	ccc <u>aagctt</u> gGCAAAAGAATATATAGGCCATCTTG	Amplificar la región promotora del gen <i>virF</i> de YeO8 para construir cepa indicadora
YeO8H-NSR	<u>gggtacc</u> cCTTATCAATTGGGAGGGGAGG	Amplificar el gen <i>hns</i> de YeO8 para construir plásmido de sobreexpresión
YeO8H-NSF	<u>ggaattc</u> cTGCGTTTATTAGTAGGAAGCAGC	Amplificar el gen <i>hns</i> de YeO8 para construir plásmido de sobreexpresión
ProHNSF	<u>ggaattc</u> cTTGAGCCATGGGCCCCGTAAC	Amplificar la región promotora del gen <i>hns</i> de YeO8 para construir cepas indicadoras
ProHNSR	<u>cggatcc</u> gTTCAATTTCTGCTTGTGCCTGG	Amplificar la región promotora del gen <i>hns</i> de YeO8 para construir cepas indicadoras
cassette-F1	CGCGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Amplificar el casete de Km del plásmido pKD4
cassette-R1	CGCGGATCCCATGGGAATTAGCCATGGTCC	Amplificar el casete de Km del plásmido pKD4
DELTamancUpF	CCTGCATTGTTACGTCGGTTTC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8
DEltamancUpR	<u>cggatcc</u> gTGATGTGGCAAGTAGCGCAGC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8
DEltamanardownF	<u>cggatcc</u> gGCATGTAACAATCAAACCGGGAC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8
DeltamanardownR	CGCATCAATTACATGCCCTGC	Construcción del mutante <i>manC</i> en YeO8
CheckingupmanC	GCCAATAACAATTATCCCGCAG	Comprobar la construcción correcta del mutante <i>manC</i> en YeO8
CheckingdownmanC	TTCAATAAAATCCCCGTTATGG	Comprobar la construcción correcta del mutante <i>manC</i> en YeO8

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
UpClpXF	ATTCAACGATTACAATGCGAGG	Construcción de los mutantes <i>clpX</i> y <i>clpXP</i> en YeO8
UpClpXR	<u>cggatccg</u> TGGAACCTTGAGTTCCGCGATG	Construcción de los mutantes <i>clpX</i> y <i>clpXP</i> en YeO8
DownClpXF	<u>cggatccg</u> TCACCCACGTAACCAGCTTCG	Construcción del mutante <i>clpX</i> en YeO8
DownClpXR	TTTCTGCGGCAAAAGCCAGC	Construcción del mutante <i>clpX</i> en YeO8
DownClpPF	<u>cggatccg</u> TTGAACATGCCTGGCCCATAC	Construcción del mutante <i>clpXP</i> en YeO8
DownClpPR	AACATGGCTCTGGTGCCAATG	Construcción del mutante <i>clpXP</i> en YeO8
ClpXPcomF	<u>gctctagagc</u> TAAACCACCACATCGCGCAG	Amplificar el operón <i>clpXP</i> de YeO8 para complementar la mutación en dichos genes
ClpXPcomR	<u>gggtacc</u> ccAATAGGGCGCCGCGATTACG	Amplificar el operón <i>clpXP</i> de YeO8 para complementar la mutación en dichos genes
ProClpPF	CCAGAAACAGCATTGCGCTG	Amplificar la región promotora del operón <i>clpXP</i> para construir cepas indicadoras
ProClpPR	<u>ggaattc</u> AAAAGCCCGTAGCCCTATGG	Amplificar la región promotora del operón <i>clpXP</i> para construir cepas indicadoras
YeO8SspAmutf	CCAGCGTGATAGCTGCCTGG	Construcción del mutante <i>sspAB</i> en YeO8.
YeO8SspAmutr	AGGTCAGGCTGGCGCTATCC	Construcción del mutante <i>sspAB</i> en YeO8.
PsspAF	GGGTACCCACCGAACGTTTGTGGCAGC	Amplificar la región promotora del gen <i>sspA</i> para construir cepas indicadoras
PsspAR	<u>ggaattc</u> CCGTCACGGTATCACCCGTGC	Amplificar la región promotora del gen <i>sspA</i> para construir cepas indicadoras

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')	Uso
CheckProsspA	GGAATTC AATCGGGATTATGGCAATGG	Comprobar la inserción correcta del P _{sspA} de YeO8 en la cepa indicadora
UpsspBF	TGCTCGAGAAATGAAGGCGAC	Construcción del mutante <i>sspB</i> en YeO8
UpsspBR	<u>cggatccg</u> GATGGCAATCTATGCGCGTG	Construcción del mutante <i>sspB</i> en YeO8
DownSSpBF	<u>cggatccg</u> CAGCTTCAGTCAGAGAAGCCAGG	Construcción del mutante <i>sspB</i> en YeO8
DownSSpBR	CTCCGTTGCTGTGGCGTTTG	Construcción del mutante <i>sspB</i> en YeO8
SSpBcomF	<u>gctctagagc</u> TATCAGAGATTTGTACTGCACCAGC	Amplificar el gen <i>sspB</i> de YeO8 para complementar la mutación en dicho gen
SspBcomR	GGCATTGAATTCACCGGTGC	Amplificar el gen <i>sspB</i> de YeO8 para complementar la mutación en dicho gen
K1 Wanner	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Comprobación orientación casete de Km clonado en el proceso de construcción de mutantes
K2 Wanner	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Comprobación orientación casete de Km clonado en el proceso de construcción de mutantes
Kt Wanner	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Comprobación orientación casete de Km clonado en el proceso de construcción de mutantes

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 3. Cepas de *Y. enterocolitica* y *E. coli* utilizadas en este estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i>		
8081 (YeO8)	Derivado R ^{M+} de la cepa silvestre 8081, serotipo O:8. Patógena, cepa silvestre.	(408)
8081-R2 (YeO8-R)	Cepa rugosa derivada de 8081-R ^{M+} . Mutante espontáneo que no expresa la cadena O.	(408)
YeO8::pRV <i>ddhB</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>ddhB</i> por recombinación en un punto del plásmido pRV <i>ddhB</i> . Mutante definido que no expresa la cadena O. Cm ^r .	(25)
YeO8- Δ <i>manCKm</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>manC</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- 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-WbcEGB	Mutante de YeO8 en el gen <i>wzy</i> . Sólo expresa una unidad de la cadena O. Km ^r .	(26)
YeO8::pKNOCK-FlhDC	Mutante de YeO8 en el gen <i>flhDC</i> por recombinación en un punto del plásmido pKNOCK-FlhDC. Sin motilidad. Cm ^r .	Este trabajo
YeO8-R::pKNOCK-FlhDC	Mutante de YeO8-R en el gen <i>flhDC</i> por recombinación en un punto del plásmido pKNOCK-FlhDC. Sin motilidad. Cm ^r .	Este trabajo
YeO8- Δ <i>flhDC</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>flhDC</i> por doble recombinación del plásmido pGY22.	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i>		
YeO8- Δ sspABGB	Mutante de YeO8 en el operón <i>sspAB</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- Δ sspABGB. Km ^r .	Este trabajo
YeO8- Δ clpXKm	Mutante de YeO8 en el gen <i>clpX</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- Δ clpXKm. Km ^r .	Este trabajo
YeO8- Δ clpX	Mutante de YeO8 en el gen <i>clpX</i> . Derivado de YeO8- Δ clpXKm, al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa Flp codificada en pCP20.	Este trabajo
YeO8- Δ clpXPKm	Mutante de YeO8 en el operón <i>clpXP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- Δ clpXPKm. Km ^r .	Este trabajo
YeO8- Δ sspBKm	Mutante de YeO8 en el gen <i>sspB</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- Δ sspBKm. Km ^r .	Este trabajo
YeO8- Δ flhDC- Δ manCKm	Mutante de YeO8- Δ flhDC en el gen <i>manC</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- Δ manCKm. Km ^r .	Este trabajo
YeO8- Δ flhDC- Δ manC	Mutante de YeO8- Δ flhDC en el gen <i>manC</i> . Derivado de YeO8- Δ flhDC- Δ manCKm, al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa Flp codificada en pCP20.	Este trabajo
YeO8- Δ sspABGB- Δ flhDC	Mutante de YeO8- Δ sspABGB en el gen <i>flhDC</i> por doble recombinación del plásmido pGY22. Km ^r .	Este trabajo
YeO8- Δ flhDC- Δ clpXKm	Mutante de YeO8- Δ flhDC en el gen <i>clpX</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- Δ clpXKm. Km ^r .	Este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Y. enterocolitica</i>		
YeO8- $\Delta flhDC$ - $\Delta clpX$	Mutante de YeO8- $\Delta flhDC$ en el gen <i>clpX</i> . Derivado de YeO8- $\Delta flhDC$ - $\Delta clpX$ Km, al cual se eliminó el casete de Km empleando la recombinasa Flp codificada en pCP20.	Este trabajo
YeO8- $\Delta clpX$ - $\Delta sspABGB$	Mutante de YeO8- $\Delta clpX$ en el operón <i>sspAB</i> por doble recombinación del plásmido pKNG- $\Delta sspABGB$. Km ^r .	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
BSN26	<i>rpoS1</i> $\Delta(argF-lac)$ <i>trp</i> ::Tn10	(191)
BSN27	<i>rpoS1</i> $\Delta(argF-lac)$ <i>trp</i> ::Tn10 Δhns	(191)
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> ^r Z Δ M15 Tn10 (Tc ^r)]	Invitrogen
C600	<i>thi thr leuB tonA lacY supE</i>	(15)
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> $\Delta(lacZYA-argF)U169 deoR$ (F80d <i>lac</i> $\Delta(lacZ)M15$)	(158)
CC118 λ pir	$\Delta(ara-leu)$, <i>araD</i> , $\Delta lacX74$, <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	(230)
S17-1 λ pir	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> -M ⁺ RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir. Tp ^r Sm ^r .	(339)
SM10 λ pir	<i>thi-1 thr leuB tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu-Km (λ pir). Km ^r .	(339)
SY327 λ pir	(<i>lac pro</i>) <i>argE</i> (Am) <i>rif nalA recA56</i> (λ pir)	(250)
HB101	<i>pro leu thi lacY endoI recA</i> ⁻ . Sm ^r .	(111)

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Comentarios	Referencia
pKNG101	Plásmido suicida. Sm ^r	(193)
pGEM-T easy	Plásmido para clonar fragmentos obtenidos por PCR con <i>Taq</i> polimerasa. Ap ^r	Promega
pGEMT- Δ <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
pGEMT- Δ <i>manCKm</i>	Plásmido pGEMT- Δ <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
pKNG- Δ <i>manCKm</i>	Fragmento <i>manCKm</i> amplificado por PCR (3 kb) a partir del plásmido pGEMT- Δ <i>manCKm</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
pGEMT- Δ <i>clpX</i>	pGEM-T con los fragmentos superior (319 pb) e inferior (420 pb) del gen <i>clpX</i> de YeO8. Ap ^r	Este trabajo
pGEMT- Δ <i>clpXKm</i>	Plásmido pGEMT- Δ <i>clpX</i> con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado entre los fragmentos superior e inferior del gen <i>clpX</i> de YeO8. Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNG- Δ <i>clpXKm</i>	Fragmento <i>clpXKm</i> amplificado por PCR (2.2 kb) a partir del plásmido pGEMT- Δ <i>clpXKm</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
pGEMT- Δ <i>clpXP</i>	pGEM-T con el fragmento superior del gen <i>clpX</i> (319 pb) y el fragmento inferior del gen <i>clpP</i> (298 pb) del operón <i>clpXP</i> de YeO8. Ap ^r	Este trabajo
pGEMT- Δ <i>clpXPKm</i>	Plásmido pGEMT- Δ <i>clpXP</i> con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado entre los fragmentos superior e inferior del operón <i>clpXP</i> de YeO8. Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNG- Δ <i>clpXPKm</i>	Fragmento <i>clpXPKm</i> amplificado por PCR (2.1 kb) a partir del plásmido pGEMT- Δ <i>clpXPKm</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
pGEMT- Δ <i>sspB</i>	pGEM-T con los fragmentos superior (267 pb) e inferior (126 pb) del gen <i>sspB</i> de YeO8. Ap ^r	Este trabajo

Plásmido	Comentarios	Referencia
pGEMT- Δ sspBKm	Plásmido pGEMT- Δ sspB con el casete de Km del plásmido pKD4 clonado entre los fragmentos superior e inferior del gen <i>sspB</i> de YeO8. Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNG- Δ sspBKm	Fragmento <i>sspBKm</i> amplificado por PCR (1.9 kb) a partir del plásmido pGEMT- Δ sspBKm y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
pEL	Plásmido derivado de pUC18 sin el sitio <i>EcoRI</i> . Ap ^r	(26)
pELsspAB	Operón <i>sspAB</i> de YeO8 amplificado por PCR (1.8 kb) y clonado en el sitio <i>SmaI</i> de pEL. Ap ^r	Este trabajo
pELsspABGB	Casete GB de pUC-4k digerido con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI</i> del plásmido pELsspAB. Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pKNG- Δ sspABGB	Fragmento <i>sspABGB</i> (3 kb) del plásmido pELsspABGB digerido con <i>PvuII</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pKNG101. Sm ^r	Este trabajo
pRV1	Plásmido suicida, derivado de pJM703.1, Cm ^r	(354)
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	Este trabajo
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	(153)
pGPLYeProhns	Región promotora del gen <i>hns</i> de YeO8 amplificado por PCR (917 pb) y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01. Ap ^r	Este trabajo
p34S-Tp	Plásmido con un casete de resistencia a Tp flanqueado por múltiples dianas de restricción. Tp ^r	(110)
pGPLTp	Derivado del plásmido pGPL01 con un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>PstI</i> . Ap ^s , Tp ^r	Este trabajo

Plásmido	Comentarios	Referencia
pGPLTpPsspA	Región promotora del operón <i>sspAB</i> de YeO8 amplificada por PCR (579 pb) y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPLTp. Tp ^r	Este trabajo
pGPLTpPclpP	Región promotora del operón <i>clpXP</i> de YeO8 amplificado por PCR (603 pb) y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPLTp. Tp ^r	Este trabajo
pKK232.8	Plásmido de medio número de copia que contiene el gen <i>cat</i> sin su propio promotor. Usado para la construcción de cepas indicadoras mediante la fusión transcripcional entre el promotor del gen de interés y el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetiltransferasa). Ap ^r , Cm ^r	Amersham Pharmacia Biotech
pKKPvirF	Región promotora del gen <i>virF</i> de YeO8 amplificada por PCR (342 pb) y clonada en el sitio <i>BamHI/HindIII</i> del plásmido pKK232.8. Ap ^r , Cm ^r	Este trabajo
pKKPyopE	Región promotora del gen <i>yopE</i> de YeO8 amplificada por PCR (442 pb) y clonada en el sitio <i>BamHI/HindIII</i> del plásmido pKK232.8. Ap ^r , Cm ^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	(251)
pPROBEProsspA	Región promotora del operón <i>sspAB</i> de YeO8 amplificado por PCR (579 pb), digerido con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI/SmaI</i> del plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Km ^r	Este trabajo
pPROBEProc/pP	Región promotora del operón <i>clpXP</i> de YeO8 amplificado por PCR (603 pb), digerido con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI/SmaI</i> del plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Km ^r	Este trabajo
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	(154)

Plásmido	Comentarios	Referencia
pBAD <i>hns</i>	Fragmento del gen <i>hns</i> de YeO8 amplificado por PCR (687 pb) y clonado en los sitios <i>EcoRI/KpnI</i> de pBAD30. Ap ^r	Este trabajo
pBAD <i>clpXP</i>	Fragmento del operón <i>clpXP</i> de YeO8 amplificado por PCR (2631 pb) y clonado en los sitios <i>KpnI/XbaI</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 , Tc ^r	(244)
pTM <i>sspAB</i>	Fragmento del operón <i>sspAB</i> de YeO8 amplificado por PCR (1800 pb) y clonado en el sitio <i>Scal</i> de pTM100. Tc ^r	Este trabajo
pTM <i>sspB</i>	Fragmento del gen <i>sspB</i> de YeO8 amplificado por PCR (889 pb) y clonado en el sitio <i>Scal</i> de pTM100. Tc ^r	Este trabajo
pUC18	Plásmido de clonación de alto número de copia. Ap ^r	(399)
pUC <i>Prova</i>	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. Tc ^r , Ap ^r	Este trabajo
pUC <i>ProvAlucFF</i>	Gen <i>lucFF</i> amplificado por PCR (1.7kb) a partir del plásmido pRV34 y clonado en el sitio <i>KpnI</i> del plásmido pUC <i>Prova</i> . Tc ^r , Ap ^r	Este trabajo
pUCYe <i>Prohns</i>	Fragmento <i>PstI/HindIII</i> del plásmido pGLYe <i>Prohns</i> clonado en el sitio <i>PstI-HindIII</i> del plásmido pUC18. Ap ^r	Este trabajo
pCP20	<i>λcl857</i> (ts), <i>ts-rep</i> . Plásmido con la recombinasa Flp de levadura (FLP, <i>aka</i> <i>exo</i>). Replicación termosensible. Cm ^r , Ap ^r	(77)
pGY22	Fragmento del operón <i>flhDC</i> (500 pb) clonado en el plásmido suicida pEP185.2. Usado en la construcción de un mutante por delección. Cm ^r	(405)
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	(278)

Plásmido	Comentarios	Referencia
pKD4	<i>OriRγ</i> ; Km ^r , Ap ^r	(100)
pKNOCK-FlhDC	Fragmento interno <i>Bam</i> HI de <i>flhDC</i> de YeO8 (0.9 kb), obtenido a partir de pFlhDCO8 y clonado en pKNOCK-Cm. Cm ^r	(25)
pLZ116	Cósmido derivado de pLZ6020 que complementa en <i>trans</i> el mutante 8081-R2 (YeO8-R). Alberga los genes de la agrupación génica <i>wb</i> (de <i>hemH</i> a <i>gne</i>)	(408)
pRK2013	<i>mob</i> ⁺ , <i>tra</i> ⁺ , plásmido autotransmisible. usado para la movilización de plásmidos que no son autotransmisibles (plásmido facilitador en conjugaciones triparentales). Spc ^r Km ^r	(111)
pRV34	Gen <i>lucFF</i> clonado en el sitio <i>Eco</i> RV del plásmido pTM100. Cm ^r	R. Venho and M. Skurnik (no publicado)
pSRFlhDCO8	Plásmido con la fusión transcripcional P _{<i>flhDC</i>} :: <i>lucFF</i> . Usado para construir cepas indicadoras para el P _{<i>flhDC</i>} de YeO8. Cm ^r	(25)
pUC-4K	Contiene el casete de Km <i>Gene Block</i> (GB). Ap ^r , Km ^r	Pharmacia

ANEXO II

Anexo II

A continuación se adjunta el artículo donde se publican parte de los resultados obtenidos:

Pérez-Gutiérrez C., C.M. Llompart, M. Skurnik, J.A. Bengoechea. 2007. Expression of the *Yersinia enterocolitica* pYV-encoded type III secretion system is modulated by lipopolysaccharide O-antigen status. *Infect.Immun.* 75:1512-1516.

INFECTION AND IMMUNITY, Mar. 2007, p. 1512–1516. Vol. 75, No. 3
0019-9567/07/\$08.00+0 doi:10.1128/IAI.00942-06
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.