



**Govern de les Illes Balears**  
Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats  
Direcció General d'Universitats,  
Recerca i Transferència del Coneixement

**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**  
Facultat de Ciències  
Departament de Biologia

# **Estudio del papel del lipopolisacárido como punto de control de la expresión de factores de virulencia.**



**Nuria Torrecabota Sureda**  
**2013**





**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**  
Facultat de Ciències  
Departament de Biologia

TESIS DOCTORAL

# **Estudio del papel del lipopolisacárido como punto de control de la expresión de factores de virulencia.**

Tesis doctoral presentada por  
Nuria Torrecabota Sureda para optar al título de  
Doctora en Microbiología Ambiental y Biotecnología.

Palma de Mallorca, 2013



El Dr. José Antonio Bengoechea Alonso, como director y el Dr. Rafael Bosch Zaragoza como ponente, de la Tesis titulada “Estudio del papel del lipopolisacárido como punto de control de la expresión de factores de virulencia”, realizada en la Fundación Caubet-CIMERA de les Illes Balears por Nuria Torrecabota Sureda, autorizan la presentación de la mencionada Tesis Doctoral puesto que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Palma de Mallorca, 2013

Dr. José Antonio Bengoechea Alonso

Dr. Rafael Bosch Zaragoza

Nuria Torrecabota Sureda



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* (2009/2013).





## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer en primer lugar a mis padres por mi educación desde mi infancia y por animarme y apoyarme en mis estudios universitarios, en estos años de Tesis y en la vida. A mi tía Margalida por tener fe ciega en mi desde que le conté que me planteaba hacer una Tesis. Agradecer al Dr. Congregado por encender mi curiosidad por la microbiología en la Facultad de Farmacia. Al Dr. Rafa Bosch por ser el contacto con la UIB y quien me ofreció todas las opciones posibles en investigación, gracias a ti empezó toda esta historia. Al Dr. José Antonio Bengoechea por aceptarme en su grupo y depositar en mi su confianza para realizar esta Tesis. A la Conselleria por concederme la beca y financiarme estos años.

A mis compañeros de laboratorio que todos ellos han aportado algo a mi día a día, a mi trabajo y a mi persona. Especialmente a Cata, Anna, Vicky y Whisky que me han ayudado en todo lo que han podido en el trabajo y que además somos buenas amigas. No dejareis de formar parte de mi vida.

A ti Miguel por estar a mi lado y apoyarme. Dentro de unos meses empezará una nueva aventura que nos cambiará la vida.



A mis padres, Joan y Tola

A Miguel



## ÍNDICE



# ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>1. El género <i>Yersinia</i> .....</b>	<b>4</b>
1.1. Clasificación .....	4
1.2. Características generales .....	5
1.2.2. Hábitat.....	6
1.3. Patogenicidad.....	6
1.3.1. La Peste.....	6
1.3.2. Yersiniosis.....	7
1.4. Factores de virulencia .....	9
<b>2. Factores de virulencia de <i>Y. Enterocolitica</i> .....</b>	<b>10</b>
2.1. Factores de virulencia codificados en el plásmido de virulencia pYV.....	10
2.1.1. El sistema tipo III de secreción Ysc.....	10
2.1.1.1. Estructura y composición del aparato de secreción Ysc.....	12
2.1.1.1.1. Cuerpo basal.....	13
2.1.1.1.2. Aguja extracelular.....	14
2.1.1.1.3. El aparato de translocación .....	15
Control de la longitud de la aguja.....	17
2.1.1.2. Tipos y funciones de las proteínas Yop efectoras.....	19
2.1.2. Adhesinas codificadas en el plásmido pYV.....	21
2.1.2.1. YadA.....	22
2.1.2.2. Activador del plasminógeno (Pla).....	24
2.2. Factores de virulencia codificados en el cromosoma.....	25
2.2.1. El sistema de secreción tipo III del flagelo.....	25
Estructura y regulación de la biosíntesis del flagelo.....	25
FliA y FlhDC como reguladores de la expresión génica.....	28
2.2.2. Fosfolipasa A (YplA).....	29
2.2.3. El sistema de secreción tipo III Ysa.....	31
2.2.4. El sistema de secreción tipo II.....	32
2.2.5. Adhesinas codificadas en el cromosoma.....	33
2.2.5.1. Ail.....	33
2.2.5.2. Invasin.....	34
2.2.6. Ureasa.....	38

2.2.7. La isla de alta patogenicidad.....	39
2.2.8. La enterotoxina Y-STa.....	40
<b>3. El lipopolisacárido de <i>Yersinia</i>.....</b>	<b>41</b>
3.1. El antígeno o cadena O.....	42
3.1.1. Estructura.....	42
3.1.2. Síntesis de la cadena O.....	44
3.1.3. Virulencia.....	45
3.2. El núcleo.....	48
3.3. El lípido A.....	48
3.3.1. Estructura.....	48
3.3.2. Síntesis.....	50
3.3.3. Modificaciones del lípido A.....	52
3.4. LPS y péptidos antimicrobianos PAs.....	54
<b>4. Sistemas de estrés de membrana.....</b>	<b>56</b>
4.1. Sistema Psp.....	56
4.2. El sistema de dos componentes Cpx.....	57
4.3. Sigma E.....	63
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>66</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>70</b>
<b>1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....</b>	<b>72</b>
1.1. Medios y condiciones de cultivo.....	72
<b>2. Técnicas de biología molecular.....</b>	<b>73</b>
2.1 Caracterización rápida del ADN plasmídico a partir de colonia.....	74
2.2 Métodos de transferencia genética.....	75
2.2.1 Transformación química con cloruro cálcico.....	75
2.2.2 Conjugación en medio sólido.....	75
2.2.3 Transformación por electroporación.....	76
<b>3. Construcción de plásmidos y cepas.....</b>	<b>77</b>
3.1. Construcción del mutante Wzzpstb mediante mutagénesis dirigida por recombinación en un punto.....	77
3.2. Construcción de los mutantes YeO8 $\Delta$ YscP y YeO8 $\Delta$ wzz $\Delta$ YscP mediante mutagénesis dirigida por doble recombinación homóloga.....	78
3.2.1. Construcción del vector suicida pKNG101 $\Delta$ YscP.....	78



3.2.2. Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga.....	79
3.3. Reemplazo de genes mediante recombinación homóloga entre el gen cromosomal y su copia linear ( <i>virFFLAG</i> ). .....	79
3.4. Construcción del plásmido pLM21O8.....	81
<b>4. Construcción de las fusiones transcripcionales <i>lucFF</i> y <i>gfp</i>. .....</b>	<b>81</b>
4.1. Medida de la actividad luciferasa. ....	82
4.2. Medida de la fluorescencia. ....	82
<b>5. Ensayos de resistencia frente a péptidos antimicrobianos. ....</b>	<b>83</b>
5.1 Ensayos de supervivencia. ....	83
5.2 Ensayos de difusión radial. ....	84
<b>6. Extracción de LPS y análisis mediante SDS-PAGE. ....</b>	<b>84</b>
<b>7. Secreción de proteínas Yops. ....</b>	<b>85</b>
<b>8. Expresión de la proteína YadA.....</b>	<b>86</b>
<b>9. Citotoxicidad en células A549.....</b>	<b>87</b>
<b>10. Adhesión e invasión a células A549.....</b>	<b>88</b>
<b>11. Translocación de la proteína YopE al citosol de las células A549.....</b>	<b>88</b>
11.1. Western Blot. ....	89
<b>12. Adhesión a colágeno humano.....</b>	<b>90</b>
<b>13. Adhesión a macrófagos THP-1. ....</b>	<b>91</b>
<b>14. Secreción de LDH por macrófagos THP-1. ....</b>	<b>92</b>
<b>15. Fagocitosis en macrófagos THP-1. ....</b>	<b>92</b>
<b>16. Ensayo de movilidad.....</b>	<b>93</b>
<b>17. Cuantificación de la cantidad de proteína FlhDC y VirF. ....</b>	<b>93</b>
<b>18. Estadística.....</b>	<b>94</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>96</b>
<b>1. Estudio de la relación entre la longitud de la cadena O del lipopolisacárido y la función de los sistemas tipo III de secreción.....</b>	<b>98</b>
1.1. Generación de cepas con diferente longitud de cadena O. ....	98
1.2. Efecto de la longitud de la cadena O en la citotoxicidad en células A549 .	100
1.3. Efecto de la longitud de la cadena O en la secreción de proteínas Yops al medio.....	102
1.4. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión e invasión a células A549.....	103

1.5. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión a Colágeno .....	105
1.6. Efecto de la longitud de la cadena O en la translocación de YopE .....	107
1.7. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión y fagocitosis en macrófagos humanos THP-1.....	108
1.8. Efecto de la longitud de la cadena O en la citotoxicidad en macrófagos humanos THP-1.....	111
1.9. Efecto de la longitud de la cadena O en la expresión de los genes <i>virF</i> y <i>yopE</i> .....	112
1.10. Efecto de la longitud de la cadena O al sustituir el inyectiosoma por otro de mayor longitud.....	113
1.11. Efecto de la longitud de la cadena O en la secreción de Yops al medio en cepas con inyectisoma largo .....	115
1.12. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión e invasión a células epiteliales A549 en cepas con inyectiosoma largo .....	116
1.13. Efecto de la longitud de la cadena O en la translocación de YopE, en cepas con inyectiosoma largo .....	117
1.14. Efecto de la longitud de la cadena O en la fagocitosis en macrófagos humanos THP-1, en cepas de ahuja larga .....	118
1.15. Efecto de la longitud de la cadena O al sustituir el inyectiosoma por el suyo propio.....	120
<b>2. Papel del sistema de estrés de membrana Cpx en la regulación de los factores de virulencia de <i>Y. enterocolitica</i> O:8.....</b>	<b>122</b>
2.1. Efecto de las modificaciones del LPS sobre el sistema Cpx. ....	122
2.2. Efecto de un mutante <i>cpxR</i> en los principales sistemas reguladores. ....	126
2.3. El sistema Cpx y los péptidos antimicrobianos. ....	131
2.4. Relación entre el sistema Cpx y la expresión de factores de virulencia. ....	132
2.4.1. Ensayo de movilidad.....	132
2.4.2. Invasin.....	134
2.4.3. Factores de virulencia codificados en el plásmido pYV y el sistema Cpx.....	134
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>140</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>148</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>152</b>

ANEXO I.....	192
ANEXO II.....	204

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de las rutas de entrada y localización final de <i>Y.</i> ....	9
<b>Figura 2.</b> Secreción de Yops por el inyectiosoma Ysc y translocación a través de la membrana de la célula diana. ....	11
<b>Figura 3.</b> Modelo de inyectiosoma de <i>Yersinia</i> . ....	13
<b>Figura 4.</b> Progresión de la formación del inyectiosoma y activación. ....	16
<b>Figura 5.</b> El papel de la aguja del inyectiosoma. La unión entre la bacteria y la célula ocurre por el contacto entre la adhesina YadA y el receptor de la célula. ....	19
<b>Figura 6.</b> El flagelo es el orgánulo motor para la propulsión bacteriana. ....	26
<b>Figura 7.</b> Modelo de regulación global en <i>Y. enterocolitica</i> incluyendo los reguladores FlhD/FlhC, FliA y YmoA.....	29
<b>Figura 8.</b> Estructura del LPS de <i>Y. enterocolitica</i> O:3 y de <i>Y. enterocolitica</i> O:8. ....	43
<b>Figura 9.</b> Esquema de la síntesis de la cadena O heteropolimérica. ....	44
<b>Figura 10.</b> Estructura del lípido A de <i>E. coli</i> . ....	49
<b>Figura 11.</b> Análisis mediante MALDI-TOFF de la estructura del lípido A extraído de <i>Y. enterocolitica</i> O:8.....	50
<b>Figura 12.</b> Biosíntesis del lípido A. ....	51
<b>Figura 13.</b> Diferentes estímulos que afectan al sistema Cpx . ....	59
<b>Figura 14.</b> Integración de señales del sistema Cpx dependientes de la proteína accesoria CpxP .....	61
<b>Figura 15.</b> Múltiples vías de inducir los sistemas Cpx y Sigma E.....	64
<b>Figura 12.</b> Características del LPS de las cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 utilizadas en el estudio.....	99
<b>Figura 13.</b> Características del LPS de las cepas de <i>Y. pseudotuberculosis</i> O:1B utilizadas en el estudio.....	100
<b>Figura 14.</b> Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8. ....	101

<b>Figura 15.</b> Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de <i>Y. pseudotuberculosis</i> O:1B. ....	102
<b>Figura 16.</b> Secreción de Yops y análisis mediante gel SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. ....	103
<b>Figura 17.</b> Adhesión e invasión a células epiteliales A549 con diferentes cepas de <i>Yersinia</i> . ....	104
<b>Figura 18.</b> Adherencia de las cepas de <i>Yersinia</i> a colágeno humano tipo I. ....	106
<b>Figura 19.</b> Análisis por Western Blot de la translocación de YopE al citosol de las células epiteliales A549. ....	108
<b>Figura 20.</b> Efecto de la longitud de de la cadena O en la adhesión y fagocitosis en macrófagos THP-1. ....	110
<b>Figura 21.</b> Estudio de la citotoxicidad en macrófagos THP-1. ....	112
<b>Figura 22.</b> Análisis de la expresión de <i>virF</i> y <i>yopE</i> en diferentes cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8. ....	113
<b>Figura 23.</b> Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 con diferentes longitudes de cadena O y con aguja larga. ...	114
<b>Figura 24.</b> Análisis del efecto de la cadena O en cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 con aguja larga sobre la secreción de Yops. ....	115
<b>Figura 25.</b> Estudio de la interacción de cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 con inyectiosoma largo en células epiteliales A549. ....	116
<b>Figura 26.</b> Análisis de la translocación de YopE al citosol de las células epiteliales A549 en las cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 con inyectiosoma largo. ....	118
<b>Figura 27.</b> Efecto de la longitud de de la cadena O y de la aguja en la fagocitosis en macrófagos THP-1. ....	119
<b>Figura 28.</b> Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 con diferentes longitudes de cadena O y con su propia aguja O:8. ....	120
<b>Figura 29.</b> Análisis de la translocación de YopE al citosol de las células epiteliales A549 en las cepas de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 con su propia aguja O:8. ....	121
<b>Figura 30.</b> Aumento de la expresión de <i>cpxP</i> en los mutantes de las aciltransferasas del lípido A. ....	123
<b>Figura 31.</b> Aumento de la expresión de <i>cpxP</i> en los mutantes dobles de los genes responsables de las modificaciones del lípido A y cadena O. ....	124

<b>Figura 32.</b> Análisis de la expresión de <i>cpxP</i> en los mutantes de los sistemas de dos componentes. ....	125
<b>Figura 33.</b> Análisis de la expresión de <i>cpxP</i> en los mutantes de los reguladores <i>rovA</i> y <i>flhDC</i> , así como y de la proteasa <i>clpX</i> . ....	126
<b>Figura 34.</b> Análisis de la expresión de las aciltransferasas <i>htrb</i> y <i>lpxP</i> en el mutante <i>cpxR</i> . ....	127
<b>Figura 35.</b> Análisis de la expresión de los genes implicados en las modificaciones del lípido A en el mutante <i>cpxR</i> . ....	128
<b>Figura 36.</b> Análisis de la expresión de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB en el mutante <i>cpxR</i> . ....	129
<b>Figura 37.</b> Análisis de la expresión de la proteasa ClpXP y de los reguladores FlhDC y RovA en el mutante <i>cpxR</i> . ....	130
<b>Figura 38.</b> Análisis de la expresión de la adhesina invasin y de la proteína Mgta en el mutante <i>cpxR</i> . ....	131
<b>Figura 39.</b> Análisis de la motilidad y los niveles de flagelina en la cepa silvestre de <i>Y. enterocolitica</i> O:8 y el mutante <i>cpxR</i> . ....	133
<b>Figura 40.</b> Invasión a células epiteliales A549 en el mutante <i>cpxR</i> . ....	134
<b>Figura 41.</b> Análisis de la secreción de Yops y de la expresión de <i>virF</i> y <i>yopE</i> en un mutante <i>cpxR</i> . ....	136
<b>Figura 42.</b> Análisis del efecto citotóxico del mutante <i>cpxR</i> . ....	137
<b>Figura 41.</b> Análisis de la expresión de YadA en el mutante <i>cpxR</i> . ....	138

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos y papel en la virulencia de las proteínas efectoras. ....	21
<b>Tabla 2.</b> Función de las adhesinas codificadas en el plásmido de virulencia. ....	22
<b>Tabla 3.</b> Función de las adhesinas codificadas en el cromosoma. ....	33
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias de PxB para YeO8 y GHY102 .....	132
<b>Tabla 5.</b> Cebadores utilizados en el estudio. ....	194
<b>Tabla 6.</b> Cepas de <i>Yersinia</i> utilizadas en el estudio. ....	195
<b>Tabla 7.</b> Cepas de <i>E.coli</i> utilizadas en el estudio. ....	197
<b>Tabla 8.</b> Plásmidos utilizados en el estudio. ....	197

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosin difosfato
<b>Agua d.o.i.</b>	Agua desionizada y purificada por ósmosis inversa
<b><u>Ap</u></b>	Ampicilina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b><u>ATP</u></b>	Adenosin trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>C<sub>14</sub></b>	Ácido mirístico o miristato
<b>C<sub>12</sub></b>	Ácido láurico o laureato
<b>C<sub>16</sub></b>	Ácido palmítico o palmitato
<b>Células A549</b>	Células epiteliales alveolares humanas de un adenocarcinoma
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal 50
<b><u>DO</u></b>	Densidad óptica
<b>DOC</b>	Deoxicolato
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamio-tetracético
<b>ELISA</b>	“Enzime-linked inmunosorbent assay”
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>Glc</b>	Glucos
<b>GlcN2N</b>	Glucosamina
<b>GlcN3N</b>	2,3-dideoxi-2,3-diamino-D-glucosa
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglucosamina
<b>Gm</b>	Gentamicina

<b>GFP</b>	Del inglés “green fluorescent protein”
<b>HeLa</b>	Célula epithelial de carcinoma cervical humano “Henrietta Lacks”
<b>HEPES</b>	Ácido N-1-Hidroxietilpiperazina-N'-2-Etanolsulfónico
<b>Hep</b>	Heptosa
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IRAK-1</b>	“IL-1 receptor associated kinases”
<b>IFN-3</b>	“Interferon regulatory factor 3”
<b>IP-Ysa</b>	Isla de patogenicidad Ysa
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>Kdo</b>	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>L-Ara4N</b>	4-amino-deoxy-L-arabinosa
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>LBP</b>	“Lipopolysaccharide binding protein”
<b>LOS</b>	Lipooligosacárido
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MALDI-TOF</b>	“Matrix-assisted laser desorption/ionización time-of-flight mass spectroscopy”
<b>MAPK</b>	“Mitogen-activated protein kinasa”
<b>MASP</b>	“MBP-associated serine protease”
<b>MBP</b>	“Mannose binding protein”
<b>min</b>	Minutos
<b>MyD88</b>	“Myeloid differentiation protein”
<b>OH-C14</b>	Hidroximiristato
<b>ONPG</b>	O-nitrofenil-β-D-galactopiranósido
<b>PAs</b>	Péptidos antimicrobianos

<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado a patógeno
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfato salino
<b>PCR</b>	Raacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase Chain Reaction”)
<b>pEtN</b>	Fosfoetanolamina
<b>Pi</b>	Fosfato
<b>PRR</b>	Del inglés “pattern recognition receptors”
<b>Psp</b>	Del inglés “phage shock protein”
<b>pYV</b>	Plásmido de virulencia de <i>Yersinia spp.</i>
<b>Rcs</b>	Del inglés “Regulator of capsule synthesis”
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>seg</b>	Segundos
<b>Str</b>	Estreptomicina
<b>STF</b>	Suero de ternera fetal
<b>STM</b>	Del inglés “signature-tagged transposon mutagenesis”
<b>SSTT</b>	Sistema de secreción tipo III
<b>TAE</b>	Tampón Tris Acetato EDTA
<b>TBE</b>	Tampón Tris Borato EDTA
<b>TBS</b>	Del inglés “Tris-buffered saline”
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Tet</b>	Tetraciclina
<b>Tir</b>	Del inglés “toll-interleukin 1-receptor”
<b>TLR</b>	Receptores “toll-like”
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Del inglés “tumor necrosis factor $\alpha$ ”



<b>Tp</b>	Trimetropina
<b>TSB</b>	Caldo de triptona y soja
<b>TSBox</b>	Caldo de triptona y soja con el calcio quelado
<b>UDP</b>	Uridina 5'-difosfato
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UMP</b>	Uridina 5-monofosfato
<b>Und-P</b>	Undecaprenilfosfato
<b>URF</b>	Unidades relativas de fluorescencia
<b>URL</b>	Unidades relativas de luz
<b>YadA</b>	" <i>Yersinia adhesin A</i> "
<b>Yop</b>	" <i>Yersinia</i> outer protein"
<b>YplA</b>	" <i>Yersinia</i> phospholipase A"
<b>Ysa</b>	" <i>Yersinia</i> secretion apparatus"
<b>Y-ST</b>	" <i>Yersinia</i> stable toxin"



## **INTRODUCCIÓN**



## 1. El género *Yersinia*

El género *Yersinia* son bacilos gram negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Se han descrito diecisiete especies distintas dentro del género *Yersinia* (**Bercovier et al., 1980A; Bercovier et al., 1980B; Brenner et al., 1980; Bercovier et al., 1984; Wauters et al., 1988; Sulakvelidze et al., 2000; Sprague et al., 2005; Sprague et al., 2008; Merhej et al., 2008; Hurst et al., 2011; Murros-Kontinen et al., 2011A; Murros-Kontinen et al., 2011B**): *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. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. pekkanenii* y *Y. nirmii*. Sólo tres de ellas son patógenas para los humanos y animales, las otras se comportan como no patogénicas u oportunistas. Las cepas enteropatógenas humanas se encuentran dentro de las especies *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, y *Y. pestis*.

El bacilo de la peste (*Y. pestis*) fué 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* (**Anonymous et al., 1985**). 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*.

### 1.1. Clasificación

Las especies de *Yersinia* se clasifican por su virulencia en ratón. Dos elementos claves para su virulencia son la isla de alta patogenicidad, cuya función es la captación de hierro, y el plásmido de virulencia. Estos están altamente conservados en las tres especies patógenas *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* (**Cornelis et al., 1998**). Los datos indican que este sistema de captación del hierro es

necesario para la diseminación sistémica de la bacteria en el organismo (**Carniel et al., 1996**).

Todas las cepas de *Y. pestis* y de *Y. pseudotuberculosis* son patógenas. Las cepas de *Y. enterocolitica* son heterogéneas, pueden clasificarse en 6 biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4 y 5) de acuerdo a sus propiedades bioquímicas (**Wauters et al., 1987**). Las cepas del biotipo 1A, sin isla de alta patogenicidad ni plásmido de virulencia, son consideradas no virulentas en ratón, mientras los biotipos 2 a 5, sin isla de alta patogenicidad, presentan baja virulencia siendo incapaces de matar ratones (**Heesemann et al., 1983**). El biotipo 1B, que posee isla de alta patogenicidad y plásmido de virulencia, es muy virulento en ratón (**Schubert et al., 2004**). Dentro de este grupo se han descrito más de 70 serotipos distintos, sólo los serotipos O:3, O:5,27, O:8, O:9, O:20 y O:13 son patógenos para los humanos (**Bottone et al., 1997**). *Y. enterocolitica* 1B/O:8, conocida como 8081, es un aislado americano de un caso de un paciente con septicemia letal que ha sido utilizada ampliamente en modelos de infección murinos (**Portnoy et al., 1981**).

## 1.2. Características generales

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  $\mu\text{m}$  y su longitud de 1-3  $\mu\text{m}$ . 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. 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.

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 (**Bercovier et al., 1980C**). Achtman y colaboradores (1999) han propuesto que *Y. pestis* es un clon derivado, hace 1500-2000 años, de *Y. pseudotuberculosis*. Skurnik y colaboradores (2000) 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 (**Prentice et al., 2001**). 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*.

### 1.2.1 Epidemiología

Es un género de bacterias de distribución mundial, principalmente en áreas climáticas moderadas o subtropicales de América, Europa, Asia, África y Australia. El bioserotipo 4/O:3 es el más común encontrado mundialmente (**El Qouqa et al., 2011; Rosner et al., 2010**).

### 1.2.2. Hábitat

Los roedores son el principal reservorio natural de *Yersinia pestis* y de *Yersinia enterocolitica*. Puede encontrarse en animales de sangre caliente domésticos y silvestres y ocasionalmente en reptiles y peces. Los cerdos son el mayor reservorio de los serotipos patógenos para el hombre (**Bottone et al., 1997**).

## 1.3. Patogenicidad

### 1.3.1. La Peste

*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 infectadas, en las cuales la bacteria se multiplica en el esófago y la faringe. La multiplicación de la bacteria es tal

que se produce un bloqueo del canal intestinal anterior en la pulga. En la siguiente ingesta de sangre, en el esfuerzo por vencer la obstrucción, la pulga regurgita parte de la masa bacteriana en la mordedura, de forma que la bacteria se transmite al torrente sanguíneo, bien de otro roedor, o bien del hombre. Tras la picadura, la bacteria circula por la sangre hasta los ganglios linfáticos más próximos, donde es ingerida por los macrófagos, dentro de los cuales se multiplica, lo que se traduce en la aparición de bubas o adenopatías inflamatorias (de ahí el nombre de peste bubónica) (**Figura 1**). 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 de peste 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 1**). 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 (**Butler et al., 1994**).

### 1.3.2. Yersiniosis

La yersiniosis es la enfermedad infecciosa causada por el género *Yersinia*, comúnmente por *Y. enterocolitica*, la causada por *Y. pseudotuberculosis* es poco común en el hombre. Se contrae por la ingestión de agua (**Keet et al., 1974**) o alimentos contaminados (**Black et al., 1978**), aunque en algunos casos puede



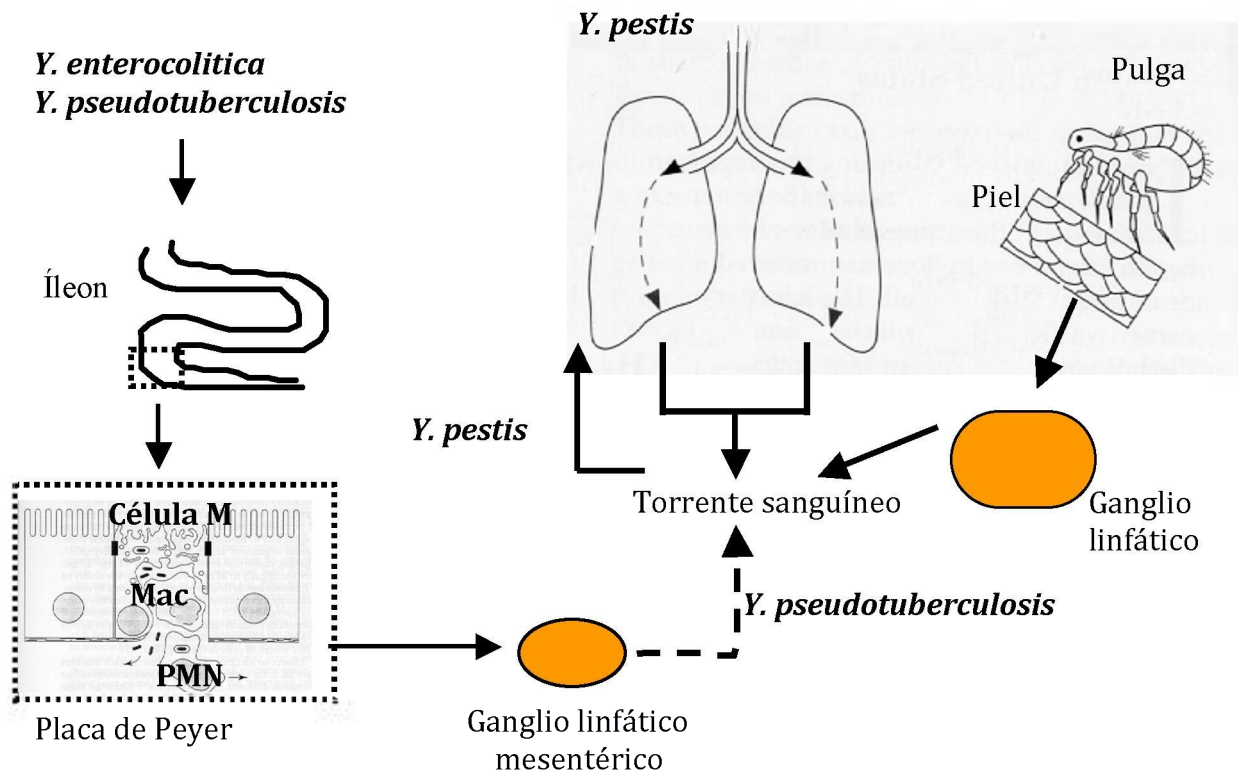
contraerse por transfusiones sanguíneas **(Stenhouse et al., 1982)**. La infección rara vez causa síntomas en adultos, en niños puede causar fiebre, dolor abdominal y diarrea, a veces hemorrágica. Los síntomas, por lo general, aparecen de 4 a 7 días después del contacto con la bacteria y pueden durar entre 1 y 3 semanas o más. En adolescentes y adultos pueden aparecer síntomas dolorosos que se asemejan a una apendicitis. En un grupo minoritario, pueden aparecer complicaciones como sarpullidos, dolor en las articulaciones y, si llega a la sangre, puede ocasionar septicemia **(Abramovitch et al., 1973)**.

Al ser ingerida, la bacteria migra a través del tracto intestinal hasta el íleon donde se adhiere y atraviesa la pared intestinal a través de las células M llegando al tejido linfoide (placas de Peyer) donde induce una respuesta inflamatoria **(Grützkau et al., 1990)**. En las placas de Peyer las bacterias se multiplican antes de alcanzar e infectar los nódulos linfáticos mesentéricos y, eventualmente, diseminarse a otros tejidos como el hígado o el riñón, donde se replican extracelularmente formando microabscesos monoclonales **(Grützkau et al., 1990; Simonet et al., 1990)** (Figura 1).

Para sobrevivir, las bacterias resisten la fagocitosis de los macrófagos mediante la inyección de efectores Yop dentro de los macrófagos gracias al Sistema tipo III de Secreción, paralizando la actina del citoesqueleto. También impide la respuesta inmune innata, evitando la producción de factores humorales y celulares.

*Yersinia* también podría causar apoptosis en macrófagos. Como resultado, la bacteria resiste la respuesta inmune del hospedador permitiendo que las bacterias invadan el epitelio e infecten los nódulos linfáticos mesentéricos **(Sansonetti et al., 2004)**.

Cabe señalar que, aunque la replicación de *Yersinia* en el interior del huésped es principalmente extracelular, diversos trabajos demuestran que las tres especies de *Yersinia* patógenas son capaces de sobrevivir y multiplicarse en el interior de macrófagos, hecho que parece ser de especial importancia en las primeras fases de la infección **(Bartra et al., 2012; Lukaszewski et al., 2005; Pujol et al., 2005; Zhang et al., 1997)**.



**Figura 1.** 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).

#### 1.4. 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 (Straley et al., 1995). 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 (Gort et al., 2000; Straley et al., 1995).

Los factores de virulencia de *Yersinia* están codificados tanto en el cromosoma como en diferentes plásmidos. Las tres especies patógenas contienen un plásmido de 70-75 kb (pYV), esencial para su virulencia. Este plásmido codifica un conjunto de proteínas, YadA (del inglés “*Yersinia adhesin A*”) y Yops (del inglés “*Yersinia outer proteins*”), que protegen a la bacteria frente a la lisis mediada por el complemento, la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos y previenen la activación de respuestas

inflamatorias. Las Yops son secretadas a través de la envoltura de la bacteria mediante un sistema de secreción tipo III (SSTT) Ysc, codificado en el mismo plásmido, que transloca directamente las proteínas al citoplasma de la célula huésped (**Cornelis et al., 2002B; Cornelis et al., 1997; Plano et al., 2001**). Una vez allí, estas proteínas bloquean numerosas vías de señalización de la célula diana lo que asegura la supervivencia de la bacteria en los tejidos del huésped (**Trosky et al., 2008; Viboud et al., 2005**). 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) (**Ferber et al., 1981; Sodeinde et al., 1992**).

## **2. Factores de virulencia de *Y. Enterocolitica*.**

### **2.1. Factores de virulencia codificados en el plásmido de virulencia pYV.**

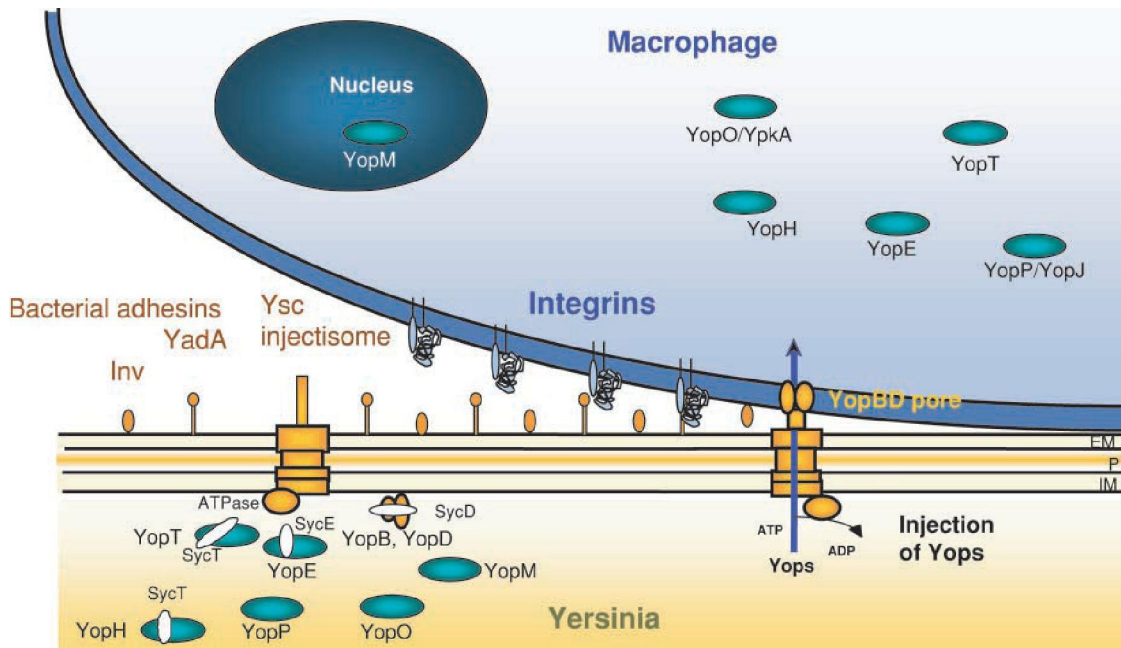
El plásmido pYV de *Y. enterocolitica* 8081 tiene unas 70 kb. La transcripción de los genes está regulada tanto por la temperatura como por el contacto con la célula eucariota (**Cornelis et al., 1997**).

#### **2.1.1. El sistema tipo III de secreción Ysc.**

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

El contacto íntimo entre la bacteria y una célula eucariota, además de un contexto con bajo  $\text{Ca}^{2+}$ , es condición imprescindible para la secreción y translocación de las proteínas Yops (**Cornelis et al., 2002B**) (**Figura 2**). El contacto íntimo con la célula eucariota está mediado por la interacción de las adhesinas y las integrinas de la membrana externa de la bacteria con la superficie de la célula huésped. *In vitro*, se puede inducir la secreción de Yops cultivando/incubando las bacterias a 37°C en un

medio rico pero deficiente en iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Heesemann et al., 1986; Michielis et al., 1990).



**Figura 2. Secreción de Yops por el inyectosoma Ysc y translocación a través de la membrana de la célula diana.** Cuando *Yersinia* se encuentra a 37°C en un entorno rico, el inyectosoma Ysc se instala y se sintetizan las proteínas Yop. Durante su fase intrabacterial, algunas Yops son capturadas por su chaperona específica Syc. Tras el contacto con la célula eucariota diana, las adhesinas YadA y virF interactúan con las integrinas y la bacteria se une a la superficie de la célula. Cuando el canal de secreción se abre, las Yops son exportadas. YopB y YopD forman un poro en la membrana de la célula, y las Yops son translocadas a través de la membrana hasta el citosol de la célula eucariota. YopM migra hacia el núcleo. Membrana externa (EM); P, peptidoglicano (P); membrana interna (IM) (Cornelis et al., 2002B).

La transcripción de los genes *ysc* y *yop* está regulada por la temperatura siendo VirF el activador transcripcional que controla este proceso (Cornelis et al., 1989; Cornelis et al., 1998B; Lambert de Rouvroit et al., 1992; Skurnik et al., 1992). A su vez, VirF está regulado negativamente por YmoA y por FliA (Bleves et al., 2002; Cornelis et al., 1989; Cornelis et al., 1991; Horne et al., 2006; Madrid et al., 2007). Y, además, se ha demostrado que el grado de enrollamiento de la cromatina también modula la expresión de los genes *ysc* y *yop* (Rohde et al., 1999).

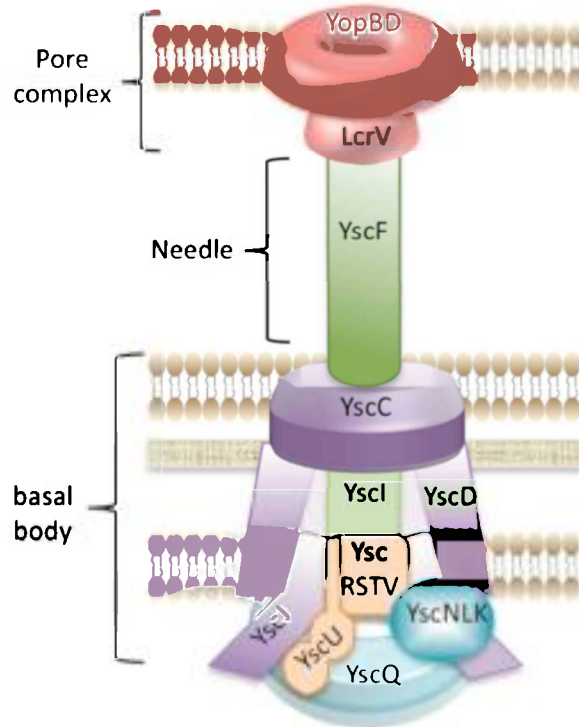
Recientemente, se ha descrito que el regulador transcripcional YtxR, que induce la expresión de los genes *ytxAB* que codifican para una toxina ADP-ribosilada (**Axler-Diperte et al., 2006**), inhibe la expresión de los genes *ysc* y *yop*. Los estudios realizados sugieren que YtxR interfiere en la activación transcripcional mediada por VirF, compitiendo por los sitios de unión en la zona promotora de los genes *ysc* y *yop* (**Axler-Diperte et al., 2009**).

#### **2.1.1.1. Estructura y composición del aparato de secreción Ysc.**

Diferentes bacterias utilizan el sistema tipo III de secreción para inyectar proteínas dentro de la célula diana, el aparato utilizado es conocido como inyectiosoma y está conservado entre distintas especies (**Cornelis et al., 2006**).

El inyectiosoma está evolutivamente relacionado con el flagelo (**Fields et al., 1994; Woestyn et al., 1994; Van Gijsegem et al., 1995; Kubori et al., 1998**). La similitud reside en que ambos sistemas atraviesan las dos membranas bacterianas y son capaces de secretar proteínas a través de su interior. El inyectiosoma permite la translocación de proteínas desde el citosol bacteriano al citosol de la célula huésped en un solo paso (**Cornelis et al., 2002**).

El inyectiosoma está compuesto por 29 proteínas y consta de tres estructuras diferenciadas (**Figura 3**): **(a) el cuerpo basal, (b) el inyectiosoma, y (c) el aparato de translocación (Diepold et al., 2010; Tampakaki et al., 2004)**. El cuerpo basal del inyectiosoma está anclado en la membrana de la bacteria. Está formado por más de 10 proteínas diferentes y tiene un peso molecular de más de un mega-Dalton (**Spreter et al., 2009**). Mientras que la parte más distal del inyectiosoma termina con una aguja que sobresale de la superficie bacteriana. Tres de las proteínas Yops secretadas por el inyectiosoma YopB, YopD y LcrV forman el aparato translocador. Este aparato translocador, se adhiere a la membrana de la célula diana formando un poro y median la translocación de las otras proteínas efectoras Yops al citosol celular (**Cornelis et al., 2002**).



**Figura 3. Modelo de inyectiosoma de *Yersinia*.** Lila, proteínas estructurales: YscC, YscD, YscJ; Naranja, aparato de exportación: YscR, YscS, YscT, YscU, YscV; Azul, componentes citoplasmáticos: YscQ y YscN, YscL, YscK (complejo ATPasa); Verde, YscI (varilla) y YscF (aguja); Rojo, aparato de translocación: LcrV y YopB/YopD (Dewoody et al., 2013).

### 2.1.1.1.1. Cuerpo basal

Es una base cilíndrica formada por dos pares de anillos, que abarcan las membranas interna y externa, unidos por un tercer anillo y un complejo ATPasa (Figura 3). Los dos anillos se forman independientemente y luego se juntan gracias al tercer anillo (Diepold et al., 2011). La formación del cuerpo basal del inyectiosoma empieza por el anillo de la membrana externa, a diferencia del flagelo que empieza su formación en la membrana interna (Erhardt et al., 2010).

El anillo de la membrana externa, que sobresale al periplasma, está formado por la oligomerización de la secretina YscC (Diepold et al., 2010). YscW es una lipoproteína auxiliar necesaria para la inserción adecuada de YscC en la membrana externa (Ross y Plano 2011).

El anillo de la membrana interna está formado por las proteínas YscR, YscS, YscT,

YscU e YscV (**Diepold et al., 2011**) que forman el llamado aparato de exportación. Éste se forma en la membrana interna con independencia del anillo de la membrana externa (**Diepold et al., 2011**). YscRST son necesarias para la oligomerización de YscV.

Después de la formación de los anillos de la membrana externa e interna se forma un tercer anillo de YscD que une ambas membranas (**Spreter et al., 2009; Diepold et al., 2010; Ross y Plano, 2011**). YscD recluta la proteína YscJ, que oligomeriza hasta completar la unión de las dos membranas (**Diepold et al., 2010; Schraidt et al., 2010**). Con la unión final de las estructuras, se crea un canal que atraviesa la envoltura bacteriana que servirá como punto de ensamblaje de los otros componentes del inyectosoma.

Paralelamente, se forma un complejo ATPasa en la cara citosólica del cuerpo basal. YscN es una ATPasa necesaria para la secreción de sustratos por el SSTT. Es una estructura en forma de anillo hexamérico formado por YscQ homóloga a la proteína que forma el anillo citosólico del flagelo, y la proteína citoplasmática YscN que tiene función ATPasa (**Diepold et al 2012**). (**Figura 3**). Y dos proteínas auxiliares YscK y YscL. YscL interacciona con la ATPasa ejerciendo de regulador negativo de la actividad; mientras que la función de YscK es aún desconocida **Blaylock et al., 2006**.

Con la unión del anillo de la membrana externa, el complejo ATPasa y el aparato de exportación, el cuerpo basal ya está completado y listo para exportar sustratos tempranos (**Diepold et al., 2010**).

#### **2.1.1.1.2. Aguja extracelular**

Es una estructura extracelular alargada, rígida y hueca, que está unida al cuerpo basal y a través de la cual se translocan/secretan las proteínas efectoras (**Figura 3**). La formación de la aguja es el siguiente paso después del cuerpo basal. Las subunidades que forman la aguja son transportadas por el mismo inyectosoma en formación. El transporte de los sustratos es secuencial. Los sustratos tempranos incluyen la subunidad de la aguja YscF (**Hoiczky et al., 2001; Mueller et al., 2005**) y el regulador molecular YscP que regula específicamente la longitud de la aguja (**Minamino et al., 1999; Agrain et al., 2005**).

En *Yersinia*, cuatro proteínas son esenciales para el último paso del ensamblaje de la aguja al cuerpo basal: YscI, YscO, YscX e YscY. YscI e YscO son necesarias para el ensamblaje de la aguja (**Payne and Straley 1998; Kimbrough and Miller 2000**). YscI se asemeja a MxiI (*Shigella*) y PrgJ (*Salmonella*) a las que se les atribuye la formación de una estructura rígida que se extiende desde la aguja hasta el cuerpo basal (**Sukhan et al., 2003; Marlovits et al., 2004; Sal-Man et al., 2012**). YscO reconoce selectivamente un conjunto de chaperonas que facilitan el transporte de los sustratos tardíos a la célula diana, por lo tanto, son necesarias para la translocación de los efectores (**Evans and Hughes 2009**). YscY es la chaperona de YscX (**Day and Plano, 2000**). YscY y YscX son componentes estructurales del inyectiosoma en la parte más interna del aparato de exportación. Están asociadas a YscV formando una plataforma multimérica. El reclutamiento de éstas es independiente a la ATPasa YscN (**Diepold et al., 2012**).

Una vez que se han exportado todas las subunidades para la formación de la aguja y la aguja esta formada, el inyectiosoma ya está listo para exportar las proteínas efectoras y los translocadores hidrofóbicos (sustratos tardíos). Sin embargo, el transporte está provocado por el cambio de secreción-restrictiva a secreción-permisiva: *in vivo*, por el contacto con la célula eucariota o, *in vitro*, por la incubación en ausencia de calcio (**Pettersson et al., 1996; Cornelis y Wolf-Watz et al., 1997**).

La aguja de *Y. enterocolitica* consiste en  $139 \pm 19$  subunidades de YscF y la punta del complejo está formada por 3-5 monómeros de la proteína LcrV (sustratos intermedios) (**Broz et al., 2007**).

#### **2.1.1.1.3. El aparato de translocación**

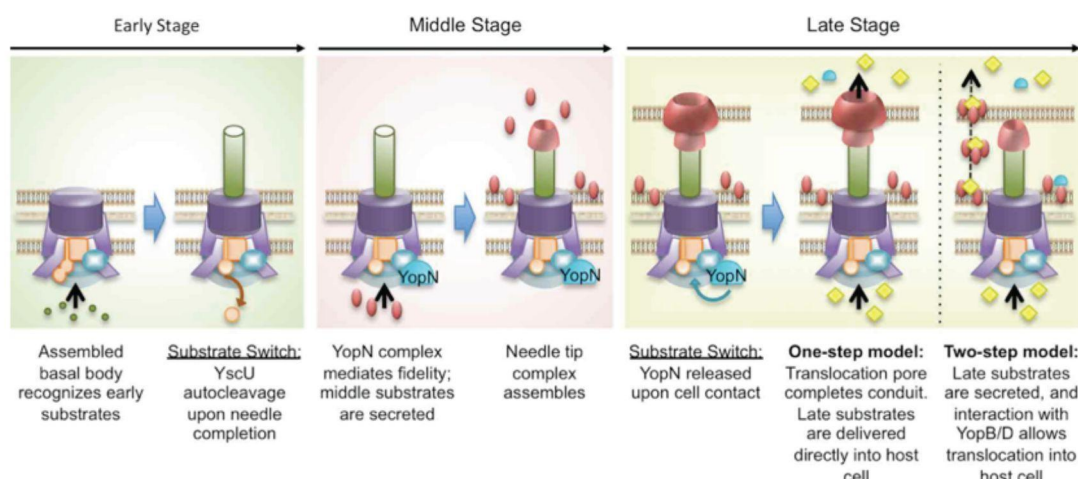
La formación del poro en la membrana de la célula huésped es dependiente de tres sustratos intermedios: YopB, YopD y LcrV (**Cornelis et al., 2002; Holmstrom et al., 2001**). YopB y YopD son proteínas hidrofóbicas que forman un complejo multimérico de 500-700 KDa insertándose en la membrana celular (**Hakansson et al., 1996; Neyt et al., 1999; Montagner et al., 2011**); mientras que, LcrV forma una estructura pentamérica hidrofílica en la punta de la aguja del inyectiosoma que sirve



de plataforma de unión para los otros dos translocadores (Mueller et al., 2008; Sarker et al., 1998) (Figura 3).

Cuando se produce el contacto con la célula diana, YopN se separa del cuerpo basal y es secretada por el inyectiosoma, pasando a la fase tardía donde se produce la translocación de los sustratos tardíos/efectores en la célula diana. En este punto, el proceso de translocación puede seguir dos modelos distintos. En el primer modelo, llamado modelo en un paso, se da cuando se forma el aparato de translocación YopB, YopD y LcrV creando un canal continuo a través del cual los sustratos tardíos/efectores son inyectados al citosol de manera directa. En el segundo modelo, llamado modelo en dos pasos, sucede cuando los sustratos tardíos/efectores son secretados al espacio extracelular y allí interactúan con las proteínas YopB y YopD formadoras del poro. Los sustratos forman un aparato de translocación libre que interactúa con la membrana de la célula y los sustratos tardíos son inyectados al citosol (Dewoody et al., 2013) (Figura 4).

Por otra parte, YopN es una de las proteínas secretadas por el inyectiosoma que parece actuar como tapón citoplasmático del aparato de translocación (Cheng et al., 2001; Ferracci et al., 2005; Marenne et al., 2003) impidiendo la secreción de proteínas efectoras tanto en presencia de calcio como en ausencia de contacto entre la bacteria y la célula eucariota (Cheng et al., 2001).



**Figura 4. Progresión de la formación del inyectiosoma y activación.** En fase temprana, el cuerpo basal reconoce los sustratos tempranos (verde) y los secreta. Estos sustratos son necesarios para la formación de la aguja. Cuando se ha formado la aguja, YscU (naranja) hace el cambio específico de

sustratos y pasa la fase media. Los sustratos intermedios son necesarios para la formación del complejo de la punta de la aguja y el poro de translocación. Con el contacto celular, YopN se separa del cuerpo basal y es secretada, pasando a la fase tardía. Dos modelos describen esta fase: en el modelo de un paso, se forma el aparato de translocación creando un canal continuo a través del cual los sustratos (amarillo) son inyectados al citosol. El modelo en dos pasos, los sustratos tardíos son secretados al espacio extracelular y allí interactúan con las proteínas de las formadoras del poro. Los sustratos forman un aparato de translocación libre que interactúa con la membrana de la célula y los sustratos tardíos son inyectados al citosol (**Dewoody et al., 2013**).

### **Control de la longitud de la aguja**

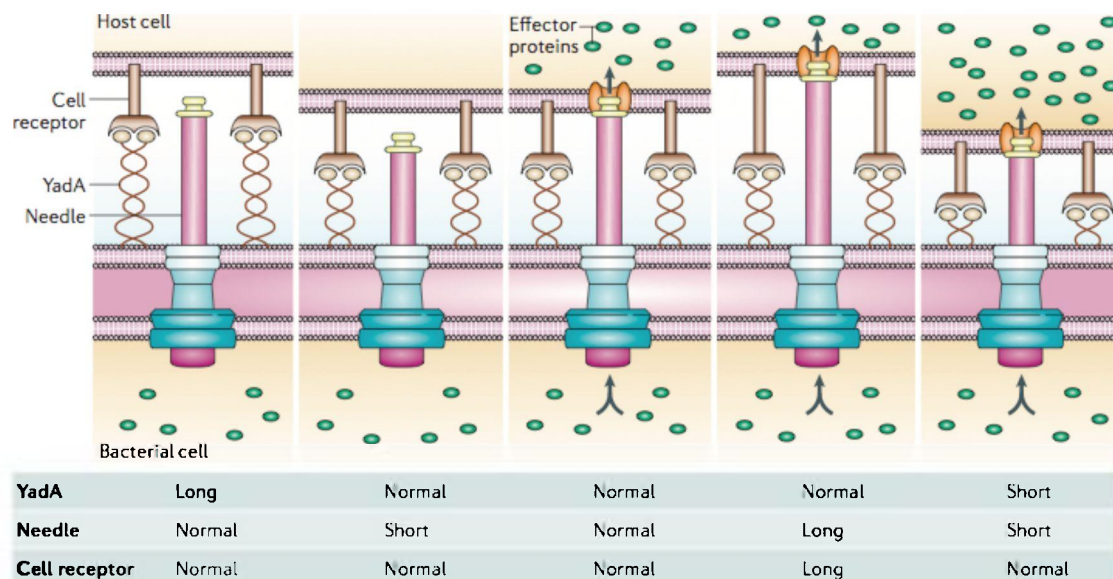
La región central de YscP es rica en prolina, contiene repeticiones que varían entre las diferentes cepas del género *Yersinia* (**Journet et al., 2003, Wagner et al., 2009**). Journet y colaboradores demostraron, mediante deleciones entre los residuos 36-96 y 222-306 e inserciones entre los residuos 49-50 de YscP, que hay una relación lineal entre el tamaño de la proteína YscP y la longitud de la aguja de *Yersinia*, sugiriendo que YscP actúa como regulador molecular (**Journet et al., 2003**). Estos autores propusieron que YscP controla el tamaño de la aguja durante el ensamblaje progresivo de las unidades del inyectosoma, interrumpiendo la exportación de YscF una vez alcanzada la longitud de la estructura madura y provocando el cambio de exportar los sustratos tempranos a los sustratos intermedios (LcrV). Este cambio es posible gracias a la interacción de YscP con YscU. La proteína YscP tiene que ser secretada para ejercer su control sobre la longitud pero no para provocar los cambios de sustratos específicos (**Agrain et al., 2005; Agrain et al., 2005B**).

En ausencia de la proteína YscP, los inyectosomas proyectan agujas extra-largas y no secretan LcrV, translocadores ni efectores. Para controlar la longitud, la proteína tiene que ser transportada por el propio inyectosoma en formación (**Agrain et al., 2005B**). Sólo una molécula reguladora YscP determina la longitud de cada aguja (**Journet et al., 2003; Wagner et al., 2010**).

La longitud de la aguja varía entre diferentes especies bacterianas, incluso entre distintas cepas de la misma especie. En *Y. enterocolitica* E40, la longitud de la aguja es de 58 nm  $\pm$ 10 nm y de 45 nm en *Y. pestis* (**Journet et al., 2003**). En *S. typhimurium*, la longitud de la aguja es de 80 nm para SP-1 (**Kubori et al., 1998**) y

150 nm para SP-2 (**Chakravortty et al., 2005**). En el caso de *S. Flexneri* es de 45 nm (**Tamano et al., 2000**).

La longitud de la aguja es un proceso regulado, hecho indica que es un factor físico crucial que afecta a su función. La razón del control de la longitud de la aguja ha sido estudiado por diferentes grupos. Una idea propuesta por el grupo de Cornelis es que una longitud de aguja específica es necesaria para interactuar directamente con la membrana de la célula diana, permitiendo que las proteínas puedan ser translocadas al citosol de la célula (**Journet et al., 2003**). Los cambios en la longitud de la aguja o en las estructuras de la superficie bacteriana pueden afectar a la funcionalidad de la aguja, con la consecuente reducción en la translocación de proteínas efectoras a la célula diana y la pérdida de virulencia. El lipopolisacárido (LPS) y la adhesión pueden jugar un papel crucial en este fenómeno (**Minamino et al., 2005**). Parece que la longitud de la aguja se ha ido ajustando evolutivamente de manera relativa a las otras estructuras de la membrana de las células hospedadoras y de la superficie de la membrana bacteriana (**Mota et al., 2005; West et al., 2005**). Una longitud mínima de la aguja es necesaria para la eficiente funcionalidad del inyectosoma de *Y. enterocolitica*. Esta longitud mínima se correlaciona con la longitud de la mayor adhesina de la superficie bacteriana YadA (**Figura 5**) (**Mota et al., 2005**). Cuando la aguja es demasiado corta para alcanzar la célula, las proteínas no son secretadas, lo que indica que la aguja actúa de sensor. En cambio, la secreción de las proteínas *in vitro* no está afectada por la longitud de la aguja (**Mota et al., 2005**).



**Figura 5. El papel de la aguja del inyectosoma. La unión entre la bacteria y la célula ocurre por el contacto entre la adhesina YadA y el receptor de la célula.** La bacteria y la célula están separadas por un espacio, la aguja tiene que llegar hasta la célula para poder inyectar las proteínas efectoras. Si la aguja es corta, la inyección no se produce (Mota et al., 2005).

*S. flexneri* optimiza su virulencia glicosilando su LPS. Esta glicosilación de la cadena O hace que su LPS reduzca su longitud a la mitad haciendo que la funcionalidad del SSTT aumente sin comprometer las propiedades defensivas del LPS frente al sistema inmune (West et al. 2005). Estos datos podrían explicar la reducción en la virulencia observada en mutantes de *Shigella* con longitudes de aguja alteradas (Tamano et al., 2002).

### 2.1.1.2. Tipos y funciones de las proteínas Yop efectoras.

Se han caracterizado cinco proteínas efectoras comunes en las tres especies patógenas de *Yersinia*: YopE, YopH, YopM, YopP y YopO (Cornelis et al., 1998). Otra proteína efectora, YopT, se encuentra exclusivamente en *Y. enterocolitica* (Trosky et al., 2008).

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 (Persson et al., 1999; Rosqvist et al., 1991) y leucocitos polimorfonucleares (Andersson et al., 1999; Grosdent et al., 2002; Visser et al., 1995). Su diana son las

proteínas de la familia Rho GTPasas (RhoA, Rac-1 y Cdc42), las cuales controlan varias funciones celulares, incluyendo la regulación del citoesqueleto de actina (**Grosdent et al., 2002; Hackam et al., 1997; Mejia et al., 2008**). 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. Las proteínas YopP y YopH también promueven la supervivencia intracelular bloqueando la activación de respuestas inflamatorias.

PROTEÍNA	PAPEL EN LA VIRULENCIA	REFERENCIA
<b>YopE</b>	Desestabiliza los filamentos de actina, redondea las células, provoca que las células en cultivo se despeguen de la matriz extracelular. Citotóxica y antifagocítica.	<b>Black et al., 2000; Rosqvist et al., 1991; Sory et al., 1995; Von Pawel-Rammingen et al., 2000</b>
<b>YopH</b>	Desfosforila p30 <sup>Cas</sup> lo que provoca la pérdida de adhesiones focales. Acción antifagocítica.	<b>Sory et al., 1995; Visser et al., 1995; Trosky et al., 2008</b>
<b>YopM</b>	Desconocida. Esencial para la virulencia de <i>Y. pestis</i> y <i>Y. enterocolitica</i>	<b>Leung et al., 1990; Mulder et al., 1989</b>
<b>YpkA/YopO</b>	Actividad serina/treonina quinasa, impide la señalización intracelular. Acción antifagocítica.	<b>Dukuzumuremyi et al., 2000; Juris et al., 2000; Grosdent et al., 2002</b>
<b>YopP/YopJ</b>	Apoptosis en macrófagos; inhibición de la producción de TNF- $\alpha$ e IL-8.	<b>Boland and Cornelis, 1998; Palmer et al., 1998</b>
<b>YopT</b>	Disrupción de los filamentos de actina. Citotóxica. Esencial para la	<b>Iriarte and Cornelis, 1998; Trulzsch et al.,</b>

	virulencia de <i>Y. enterocolitica</i> O:8	<b>2004</b>
<b>LcrV</b>	Induce IL-10 reduciendo la producción TNF- $\alpha$ y INF $\gamma$ .	<b>Sing et al., 2002</b>

**Tabla 1.** Tipos y papel en la virulencia de las proteínas efectoras.

Todas las clases de proteínas efectoras explicadas anteriormente se pueden dividir en dos grupos: las que requieren chaperonas para que su secreción sea eficiente (YopH, YopE, YopT, YopO) y las que no (YopP, YopM) (**Wattiau et al., 1994**). Estas chaperonas se denominan Sycs (del inglés “*Specific Yop Chaperone*”) y son pequeñas proteínas acídicas presentes en el citosol. No se conoce su función exacta pero se ha propuesto que podrían prevenir el plegamiento de la proteína (**Stebbins et al., 2001**) o bien, conferir una señal de secreción tridimensional a la proteína a la que asisten (**Birtalan et al., 2002**). Además, pueden estar implicadas en la organización de la secreción de Yops de manera que éstas se secreten en un orden determinado (**Boyd et al., 2000; Wulff-Strobel et al., 2002**). Normalmente están codificadas por un gen localizado cerca del que codifica la proteína a la que asisten (**Cornelis et al., 2002B**).

### 2.1.2. Adhesinas codificadas en el plásmido pYV.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	ORG.	REFERENCIAS
<b>YadA</b>	-Esencial para la virulencia.	<i>Ye</i>	<b>Roggenkamp et al., 1995</b>
	-Invasión de células epiteliales.	<i>Yp</i>	<b>Eitel and Dersch, 2002</b>
	-Unión al colágeno, fibronectina y laminina.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Schulze-Koops et al., 1992; Flügel et al., 1994; Heise and Derssch, 2006</b>
	-Adhesión a células epiteliales, neutrófilos y macrófagos.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Heesemann et al., 1987; Roggenkamp et al., 1996</b>
	-Resistencia al suero.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Lambris et al., 2008</b>
	-Autoaglutinación.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Hoiczky et al., 2000</b>
	-Secreción de Yops.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Visser et al., 1995</b>

<b>Pla</b>	-Activación plasminógeno.	<i>Ype</i>	<b>Beesley et al., 1967</b>
	-Adhesión e invasión en células epiteliales.	<i>Ype</i>	<b>Sodeinde et al., 1992</b>
	-Degradación de laminina y fibronectina.	<i>Ype</i>	<b>Haiko et al., 2009</b>
	-Resistencia al suero.	<i>Ype</i>	<b>Sodeinde et al., 1992</b>
	-Secreción de Yops.	<i>Ype</i>	<b>Felek et al., 2010</b>

**Tabla 2. Función de las adhesinas codificadas en el plásmido de virulencia.** Abreviaturas: Org., organismo; Ye, *Y. enterocolitica*; Yp, *Y. pseudotuberculosis*; Ype, *Y. pestis*.

### 2.1.2.1. 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* (**Cornelis et al., 1998**). En *Y. pestis* está en forma de pseudogen. YadA es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* (**Roggenkamp et al., 1995., Schütz et al., 2010**). Así, un mutante *yadA* de *Y. enterocolitica* presenta una menor capacidad para colonizar el íleon de ratones infectados tanto por vía oral como intraperitoneal (**Kapperud et al., 1987; Pepe et al., 1995**).

La expresión de *yadA* está regulada por la temperatura y por el activador transcripcional VirF (**Lambert de Rouvoit et al., 1992; Skurnik et al., 1992; Skurnik y Wolf-Watz, 1989**). La expresión de VirF a su vez está también regulada por la temperatura siendo máxima a 37°C y no se induce por debajo de 30°C (**Bölin et al., 1982; Kapperud et al., 1985**). Al contrario de lo que ocurre con otros genes regulados por VirF, la expresión de *yadA* no es dependiente de Ca<sup>2+</sup> (**Bölin et al., 1982; Skurnik et al., 1985; Skurnik et al., 1984**).

YadA forma parte de las adhesinas triméricas autotransportadoras. La estructura de YadA es homotrimérica. Consta de un dominio N-terminal extracelular y un extremo N-terminal en forma de óvalo anclado a la membrana externa. Estas estructuras recubren la superficie de la bacteria y le confieren características hidrofóbicas (**Hoiczky et al., 2000**). El extremo N-terminal 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 **(Hoiczky et al., 2000)**.

El papel de YadA como factor de virulencia en *Y. enterocolitica* está asociado a sus múltiples funciones biológicas. Por un lado, YadA promueve la adhesión e invasión de células del huésped, principalmente en la lámina propia y en la submucosa intestinal **(Heesemann et al., 1984; Isberg et al., 1989; Mantle et al., 1989; Skurnik et al., 1994; Yang y Isberg, 1993)**. Sin embargo, yadA no contribuye de manera importante en el inicio del proceso de infección **(El Tahir y Skurnik, 2001; Pepe et al., 1995; Skurnik et al., 1994)**. YadA es el principal factor de adhesión una vez la bacteria ha atravesado el epitelio intestinal, mediando la adherencia a células epiteliales, células fagocíticas profesionales **(Roggenkamp et al., 1996)** y proteínas de la matriz extracelular **(Emödy et al., 1989; Schulze-Koops et al., 1992)**. De hecho, una de las propiedades más importantes de YadA es su capacidad para unirse a moléculas de la matriz extracelular como el colágeno- $\beta$ 1 **(Emödy et al., 1989; Flügel et al., 1994; Nummelin et al., 2004; Schulze-Koops et al., 1992; Schulze-Koops et al., 1995; Tamm et al., 1993)** la laminina o la fibronectina **(Flügel et al., 1994; Schulze-Koops et al., 1993; Tertti et al., 1992)**. La unión al colágeno mediada por YadA es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8 **(Tamm et al., 1993)**.

Destacar que YadA es el principal factor de resistencia de *Yersinia* a la actividad bactericida del suero humano **(Lambris et al., 2008; Balligand et al., 1985; Biedzka-Sarek et al., 2005; Bliska et al., 1992; Pai et al., 1982; Pilz et al., 1992; Roggenkamp et al., 2003)**. YadA juega su papel bloqueando las tres vías del complemento: clásica, alternativa y lectinas **(Lambris et al., 2008)**. Es crucial para la resistencia de *Y. enterocolitica* pero no para *Y. pseudotuberculosis* **(El Tahir y Skurnik, 2001)**. Molecularmente, YadA se une al factor H, lo que impide la activación de la vía alternativa del complemento **(China et al., 1994)**, y al regulador C4bp, que previene la activación de la vía clásica y de las lectinas del complemento **(Kirjavainen et al., 2008)**. Por consiguiente, YadA evita la formación del complejo de ataque en la membrana externa de *Y. enterocolitica*, la opsonofagocitosis y la lisis bacteriana **(Kirjavainen et al., 2008)**. No obstante, aunque YadA medie la resistencia frente al complemento y evite la fagocitosis, al mismo tiempo hace que la bacteria sea más sensible frente a la acción de unas fibras extracelulares formadas por proteínas granulares y cromatina (NETs) que se unen a la bacteria y la eliminan **(Casutt-Meyer**



**et al., 2010**). Esta especie de fibras son secretadas por los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) (**Casutt-Meyer et al., 2010**).

Finalmente, YadA actúa como conexión para el SSTT para que pueda inyectar Yops antifagocíticas en el citoplasma de fagocitos profesionales (**Visser et al., 1995**). La longitud del dominio extracelular de YadA tiene que ser ajustada con la longitud del inyectiosoma (o viceversa) para permitir que el inyectiosoma entre en contacto con la membrana de la célula diana (**Mota et al., 2005**). El inyectiosoma y YadA deben coevolucionar.

### **2.1.2.2 Activador del plasminógeno (Pla)**

El activador del plasminógeno (Pla) es un factor de virulencia, adhesina y proteasa (**Felek et al., 2010**) codificado en el plásmido pPCP1 y muy expresado durante la invasión de *Y. pestis*. Su función es la activación del plasminógeno a plasmina (**Beesley et al., 1967**). Es crucial para el establecimiento de la peste bubónica en animales manteniendo la metástasis desde el tejido intradérmico hasta los nódulos linfáticos. Además, en la peste pneumónica humana, permite que *Y. pestis* crezca en las vías aéreas.

Otra actividad de la plasmina es la degradación de la laminina (la glicoproteína de la membrana basal) así como los agregados de fibrina, que se crean justo después de dañar la pared de los vasos sanguíneos. Esta actividad también ayuda a la bacteria a migrar rápidamente, tomando el control del sistema homeostático de coagulación/fibrinólisis y promoviendo respuestas inflamatorias (**Haiko et al., 2009**). Además, Pla posibilita la diseminación de *Y. pestis* desde el lugar de infección hasta otros órganos, mediante la interacción con macrófagos. Media la adhesión e invasión en células epiteliales humanas y permite el establecimiento de la infección en el hígado y bazo (**Sodeinde et al., 1992**). Pla podría tener un papel importante en la resistencia al suero (**Sodeinde et al., 1992**).

Finalmente, se ha visto que Pla contribuye a la citotoxicidad de *Y. pestis*. Es importante para la translocación de Yops a la células epiteliales especialmente a 37°C. Permite que el SSTT interacte con la célula y las Yops puedan ser translocadas. Es un importante factor de virulencia de *Y. pestis* en ratones (**Felek et al., 2010**). En esta función, reemplaza a YadA e invasina en *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*.

## **2.2. Factores de virulencia codificados en el cromosoma.**

### **2.2.1. El sistema de secreción tipo III del flagelo.**

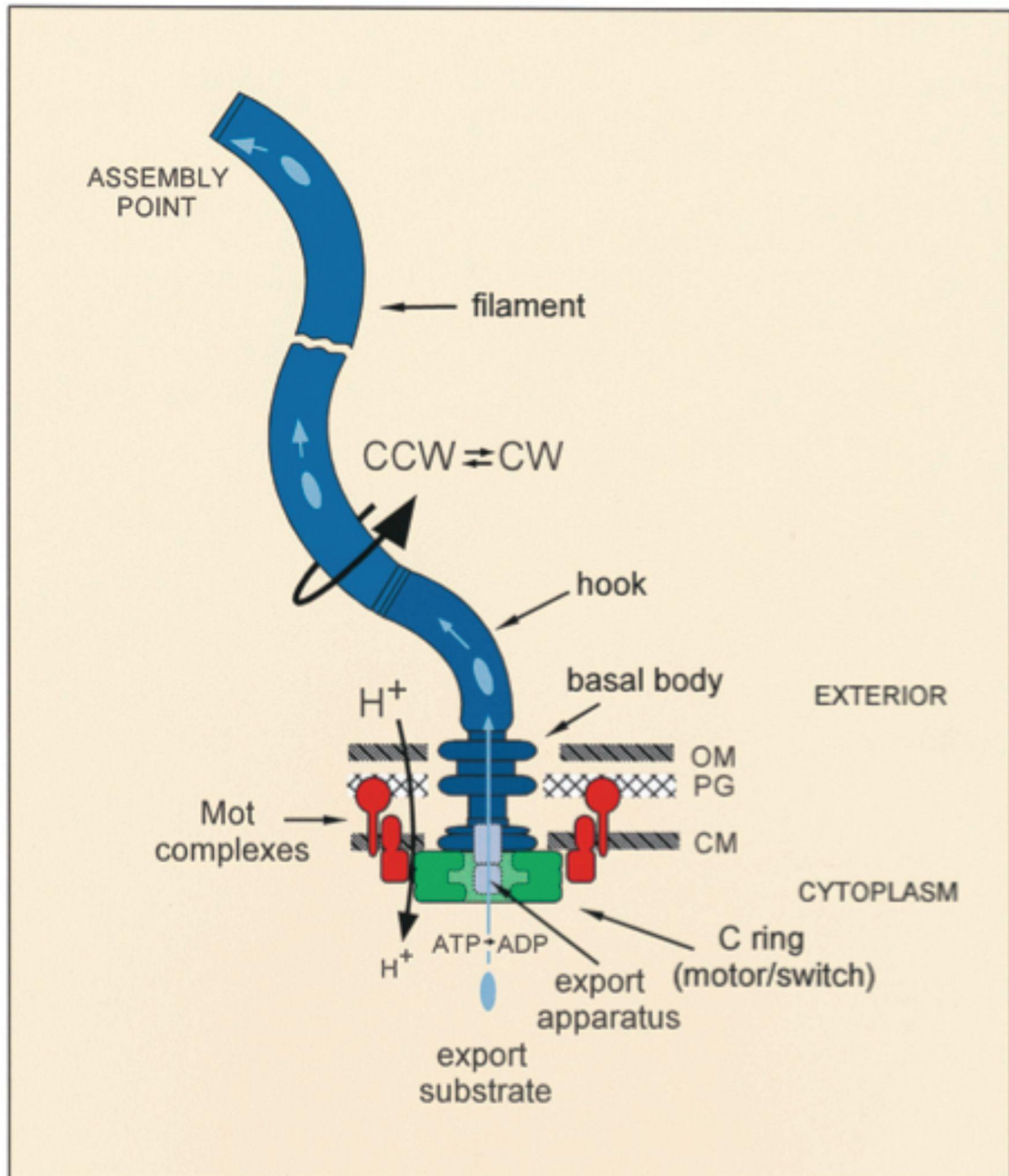
Además del SSTT Ysc codificado en el plásmido pYV, el sistema del flagelo de *Y. enterocolitica* codificado en el cromosoma también actúa como SSTT (**Macnab et al., 1999; Young et al., 1999**). De hecho, el flagelo bacteriano parece ser el ancestro común de todos los SSTT, de modo que varios de sus componentes estructurales están conservados en todos los SSTT conocidos (**Hueck et al., 1998; Macnab et al., 1999**).

El SSTT del flagelo se requiere para exportar las proteínas que forman el flagelo a la superficie de la bacteria (**Macnab et al., 1999**), aunque también secreta proteínas que intervienen en las interacciones bacteria-huésped (**Young et al., 1999**). Un ejemplo lo constituye la fosfolipasa A (YplA), una proteína involucrada en la virulencia y no en la motilidad (**Young y Young, 2002**). Además, el SSTT del flagelo también secreta otras proteínas denominadas Fops (del inglés “flagellar outer proteins”), cuya identidad y función aún se desconoce (**Young et al., 1999**).

Por otra parte, la síntesis del flagelo confiere a la bacteria motilidad tipo “*swimming*” y tipo “*swarming*” (**Young et al., 1999; Young et al., 1999B**). El posible papel de la motilidad en la patogenicidad de *Yersinia* dista mucho de estar claro. Estudios recientes han demostrado que el flagelo es esencial para la colonización de superficies abióticas y establecer un biopelícula (**Kim et al., 2008**).

### **Estructura y regulación de la biosíntesis del flagelo.**

La estructura del flagelo consta de tres componentes: (i) el cuerpo basal, estructuralmente parecido al aparato de secreción tipo III, (ii) el gancho y (iii) el filamento (**Jones y Aizawa, 1991; Terashima et al., 2008; Young et al., 1999**). (**Figura 6**).



**Figura 6.** El flagelo es el orgánulo motor para la propulsión bacteriana. Gracias a un gradiente de protones puede rotar en ambos sentidos; El filamento es helicoidal y por ello convierte el torque en fuerza de movimiento. El motor consiste en los Motores estacionarios (rojos) y el rotor o anillo C (verde), el cual sirve de conmutador entre ambos movimientos. A parte de la función de motilidad, el flagelo es un sistema de secreción tipo III. Transloca subunidades de sus sustratos a través de la membrana citoplasmática y los distribuye a través del canal central del cuerpo basal-gancho-filamento donde probablemente alcancen su punto de unión al final de la estructura tubular (Macnab et al., 1999).

Como en otras bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, la regulación de los genes implicados en la síntesis del flagelo y la quimiotaxis se realiza en coordinación con el ensamblaje del mismo y en respuesta a señales ambientales (Macnab et al., 1996). Como se ha explicado anteriormente, *Y. enterocolitica* presenta motilidad únicamente en un rango de temperatura de 21 a 29°C (Kapatral y Minnich, 1995; Niléhn et al., 1969). 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 (Aldridge et al., 2002; Chilcott y Hughes, 2000; Kutsukake et al., 1990).

Los genes tipo I son los que forman el operón *flhDC* y codifican el principal complejo de regulación del flagelo, FlhDC, el cual es necesario para la expresión del resto de genes del flagelo. En *Y. enterocolitica*, la transcripción de *flhDC* no está regulada por la temperatura (Bengoechea et al., 1996; Kapatral et al., 2004). Además, FlhDC tampoco interviene en la regulación mediada por la temperatura de los genes del flagelo (Kapatral et al., 2004; Young et al., 1999B). Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heteromultimérico que se une a las secuencias promotoras de los genes tipo II, activando la transcripción del operón *flhBAE* (Liu y Matsumura, 1994).

Los genes tipo II codifican las proteínas estructurales y accesorias del cuerpo basal, los componentes del gancho, FlgN requerido para el anclaje del filamento y las proteínas reguladoras FliA ( $\sigma^{28}$ ) y FlgM (Fauconnier et al., 1997; Iriarte et al., 1995; Kapatral et al., 1996). FliA es necesaria para la transcripción de todos los genes tipo III (Horne y Prüss, 2006; Kapatral et al., 2004; Liu y Matsumura, 1995; Ohnishi et al., 1990), de algunos operones tipo II y del gen que codifica el factor anti-sigma FlgM (Chadsey et al., 1998). La expresión de *fliA* sí está regulada por la temperatura, de modo que este gen sólo se transcribe a temperaturas inferiores a 30°C (Horne y Prüss, 2006; Kapatral et al., 2004; Kapatral y Minnich, 1995). 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 (Hughes et al., 1993).

Entre los genes tipo III se encuentran los del operón *fleABC*, que codifica la flagelina (Kapatral y Minnich, 1995), el gen *ylpA*, que codifica una fosfolipasa (Schmiel et

**al., 2000)** y los que codifican componentes del motor del flagelo y proteínas quimiotácticas.

Recientemente, se ha descrito que el regulador OmpR controla la motilidad regulando positivamente la expresión de *flhDC* a nivel transcripcional en *Y. enterocolitica* O:9 (**Rackowska et al., 2011**). En enterobacterias, OmpR junto con la quinasa EnvZ forman el sistema de dos componentes OmpR/EnvZ que regula la transcripción de varios genes implicados en la respuesta adaptativa ante señales ambientales (**Egger y Inouye et al., 1997**). EnvZ es el sensor de cambios en la osmolaridad del medio (**Russo y Silhavy, 1991**) el cual se autofosforila y seguidamente transfiere el grupo fosfato al efector OmpR. OmpR se une específicamente a la región promotora de *flhDC* y se especula que hay más de un sitio de unión OmpR (**Rackowska et al., 2011**). Un mutante *ompR* no presenta flagelo, confirmando que OmpR es necesario para la biosíntesis del flagelo.

En el caso de *Y. enterocolitica*, la termorregulación de la síntesis del flagelo puede ser un factor importante en la patogenicidad bacteriana, puesto que la flagelina es un potente inductor de citoquinas (**McDermott et al., 2000; Minnich y Rohde, 2007; Ramos et al., 2004**). Por consiguiente, la represión de la expresión de flagelina a 37°C puede contribuir a la pobre respuesta inflamatoria característica de las infecciones de *Yersinia* (**Bleves y Cornelis, 2000; Minnich y Rohde, 2007**).

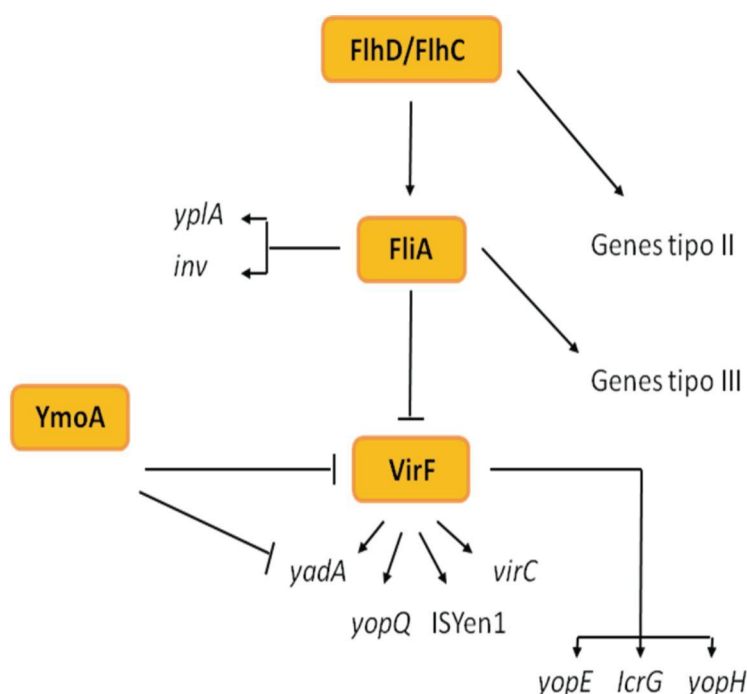
### **FliA y FlhDC como reguladores de la expresión génica.**

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

FliA, además de regular positivamente los niveles de expresión de varios genes tipo III del flagelo, regula negativamente varios factores de virulencia codificados en el plásmido pYV: YadA, YscG y YscM (que forman parte del operón *virC*), el elemento de inserción altamente móvil *ISYe1* (de función desconocida) y YopQ (**Horne y Prüss, 2006**) (**Figura 7**). Mientras que la regulación sobre los genes tipo III del flagelo es directa, la regulación negativa sobre estos factores de virulencia parece ser indirecta y es debida a la acción de FliA sobre VirF (**Horne y Prüss, 2006**). Además,

también se ha descrito que FliA induce la expresión de *inv* y *yplA* (Schmiel et al., 2000; Skurnik et al., 1984) (Figura 7).

Por su parte, FlhD/FlhC afecta a los niveles de expresión de varios genes implicados en el metabolismo, en concreto los implicados en el metabolismo del nitrógeno y en el ciclo de la urea (Kapatral et al., 2004). Además FlhDC inhibe la expresión de los genes *ysc* y *yop* a temperaturas inferiores a 37°C, posiblemente actuando también sobre su activador transcripcional VirF (Bleves et al., 2002) y regula la síntesis de la fosfolipasa A (YplA) (Schmiel et al., 2000) (Figura 7).



**Figura 7.** Modelo de regulación global en *Y. enterocolitica* incluyendo los reguladores FlhD/FlhC, FliA y YmoA (Horne y Prüss, 2006).

### 2.2.2. Fosfolipasa A (YplA)

La fosfolipasa A (YplA) es una proteína extracelular de 35,5 kDa codificada por un gen tipo III del SSTT del flagelo (Schmiel et al., 1998; Schmiel et al., 2000; Young et al., 1999A). Todas las cepas de *Y. enterocolitica* codifican en su cromosoma el gen *yplA*, pero sólo las del biotipo 1 tienen actividad fosfolipasa (Schmiel et al., 1998).

Por su parte, ni *Y. pestis* ni *Y. pseudotuberculosis* expresan YplA (**Schmiel et al., 1998**).

El gen *yplA* forma parte del regulón del flagelo y se expresa de manera coordinada junto con otros genes del flagelo a 26°C (**Schmiel et al., 2000**). Tanto en un mutante *flhDC* como en un mutante *fliA*, la expresión de *yplA* está reducida. La expresión de *yplA* se induce cuando la bacteria alcanza la fase de crecimiento exponencial y es máxima cuando el pH oscila entre 6.5-7.5 (**Schmiel et al., 2000**). En la región promotora de *yplA* se han identificado potenciales sitios de unión de los reguladores de la expresión génica Fnr (regulador de crecimiento en anaerobiosis), Crp (proteína receptora de AMPc) y FliA (del regulón del flagelo). De hecho, la expresión de FliA es necesaria para que se dé la secreción de YlpA (**Young et al., 1999A**). 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 (**Schmiel et al., 2000**).

Para ejercer su función, la fosfolipasa A debe ser secretada al medio extracelular por cualquiera de los SSTT de la bacteria. El SSTT utilizado para la secreción de YplA depende de los factores ambientales en los que se encuentra la bacteria (**Young y Young, 2002; Young et al., 1999A**).

En el modelo de infección oral de ratón, un mutante *yplA* no coloniza las placas de Peyer ni los nódulos linfáticos mesentéricos tan eficazmente como la cepa silvestre. Por lo tanto, YplA podría mediar la colonización de tejidos por diferentes vías. Por una parte, la actividad fosfolipasa podría provocar la rotura de membranas de células del tejido intestinal lo cual facilitaría la penetración y supervivencia de la bacteria en el tejido intestinal. La perturbación de la membrana de los macrófagos dificulta una respuesta inmune eficaz, con lo que otra función de YplA sería la de modular la respuesta inflamatoria. Por otro lado, la fosfolipasa podría promover el crecimiento bacteriano mediante el aporte de nutrientes en forma de ácidos grasos para la biosíntesis o el metabolismo celular (**Berring et al., 2004; Schmiel et al., 1998**).

### 2.2.3 El sistema de secreción tipo III Ysa.

El SSTT denominado Ysa está codificado en la isla de patogenicidad Ysa (IP-Ysa) que se encuentra únicamente en el cromosoma de las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B (Foultier et al., 2002; Haller et al., 2000; Thomson et al., 2006). La expresión del SSTT Ysa se induce *in vitro* a 26°C, pH neutro/básico y elevada concentración de NaCl (Haller et al., 2000; Venecia y Young, 2005). Ysa desempeña un papel importante en la virulencia. En el modelo de infección oral de ratón, la DL<sub>50</sub> de un mutante *ysa* es 10 veces mayor que aquella de la cepa silvestre y parece que este sistema es necesario durante las fases iniciales de la infección (Haller et al., 2000; Venecia y Young, 2005).

El locus *ysa-ysp* de la IP-Ysa contiene varios genes que codifican proteínas homólogas a otras presentes en todos los SSTT llamadas proteínas Ysa. El SSTT Ysa está regulado por el sistema de dos componentes YsrS/YsrR (localizado en la parte más distal del locus *ysa*) a través de YsaE/SycB y por RcsB (Venecia y Young, 2005; Walker y Miller, 2004). El sensor YsrS es necesario para la expresión del promotor de *ysaE* y esta activación es dependiente de NaCl. A su vez, YsaE y la chaperona SycB son necesarias para controlar la transcripción de genes *ysa* y *ysp* del SSTT Ysa (Walker et al., 2010).

El SSTT Ysa secreta los ocho efectores denominados Ysp (YspA, YspE, YspF, YspI, YspK, YspL, YspM, YspP). Algunos de los genes que codifican para las proteínas Ysp se localizan en la IP-Ysa, mientras que otros están dispersos en el cromosoma (Matsumoto y Young, 2006). 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 (Foultier et al., 2003; Matsumoto y Young, 2006; Witowski et al., 2008). 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 (Matsumoto y Young, 2006; Matsumoto y Young, 2009B). La chaperona SycP, necesaria para la secreción y translocación de YspP (PTPasa) está codificada en la IP-Ysa y también es secretada por el SSTT Ysa (Matsumoto y Young, 2009A). Este sistema también puede secretar algunas de las Yops efectoras del SSTT Ysc; en



concreto, YopE, YopN y YopP (Foultier et al., 2003; Young y Young, 2002). El sistema Ysa también puede secretar YplA (Young y Young, 2002).

#### **2.2.4. El sistema de secreción tipo II.**

Las cepas de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B poseen un sistema de secreción tipo II (SST2), llamado Yst1, codificado en una región del cromosoma llamada “región de plasticidad”. Varios factores de virulencia se encuentran en esta región incluyendo una región similar a la isla de patogenicidad YAPI de *Y. pseudotuberculosis* y el SSTT Ysa, descrito anteriormente (Iwobi et al., 2003; Thomson et al., 2006). Los genes Yst1 se transcriben preferentemente a 37°C. Se desconoce las proteínas que son transportadas a través de este sistema de secreción, así como su función (Iwobi et al., 2003).

Yst1 es necesario para la virulencia de *Y. enterocolitica* del biotipo 1B en el modelo de infección oral de ratón (Iwobi et al., 2003). Un mutante deficiente en este sistema es 100 veces menos virulento que la cepa silvestre y presenta dificultades para la colonización del hígado y el bazo, pero no para la colonización de las placas de Peyer. Así, el sistema Yst1 parece ser más importante para la diseminación de la bacteria que para la colonización inicial del tejido linfoide. Yst1 no contribuye a la virulencia si la ruta de infección es intravenosa (Iwobi et al., 2003).

*Y. enterocolitica* posee un segundo SST2, denominado Yst2, que difiere significativamente de Yst1 (Iwobi et al., 2003). Es probable que Yst2 no esté implicado en la virulencia de *Y. enterocolitica*, puesto que también está presente en las cepas consideradas avirulentas (Iwobi et al., 2003).

### 2.2.5. Adhesinas codificadas en el cromosoma.

En el cromosoma de *Yersinia* se sintetizan dos adhesinas, llamadas Ail y invasin.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	ORG.	REFERENCIAS
<b>Ail</b>	-Adhesión a células epiteliales.	<i>Ye, Ype</i>	<b>Miller et al., 2001</b>
	-Unión a laminina y fibronectina.	<i>Ye, Ype</i>	<b>Yamashita et al., 2011</b>
	-Resistencia al suero.	<i>Ye, Yp, Ype</i>	<b>Biedzka-Sarek et al., 2008</b>
	-Secreción de Yops.	<i>Ye, Yp, Ype</i>	<b>Felek et al., 2010</b>
<b>Invasin</b>	-Invasión de células epiteliales.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Isberg et al., 1987</b>
	-Unión integrinas 1-β.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Clark et al., 1998</b>
	-Inducción producción citoquinas.	<i>Ye, Yp</i>	<b>Grassl et al., 2003</b>

**Tabla 3. Función de las adhesinas codificadas en el cromosoma.** Abreviaturas: Org., organismo; Ye, *Y. enterocolitica*; Yp, *Y. pseudotuberculosis*; Ype, *Y. pestis*.

#### 2.2.5.1. Ail

Ail es una proteína codificada en el genoma, de 17 kDa, que se localiza en la membrana externa. Está presente en todas las especies patógenas de *Yersinia* y se ha asociado a la virulencia (**Miller et al., 1990**). La expresión de *ail* en la fase estacionaria de crecimiento ocurre exclusivamente a 37°C bajo presión parcial de oxígeno reducida y es afectada por el pH; mientras que, en la fase exponencial de crecimiento es detectable a bajas temperaturas (**Pierson y Falkow, 1993**).

Ail pertenece a la familia OmpX, cuya estructura se caracteriza por presentar ocho dominios transmembrana y cuatro bucles extracelulares (**Fernández et al., 2001; Miller et al., 1990; Plesniak et al., 2011**). Generalmente, las proteínas de esta familia se caracterizan por promover la invasión de las células, la resistencia al sistema del complemento, la supervivencia en macrófagos y la internalización en células

epiteliales. Ail forma parte de la resistencia al suero en las tres especies patógenas de *Yersinia*. Se une al factor H (FH) de la vía alternativa y a la proteína C4bp reguladora de la vía clásica. Reduce la activación del complemento de la misma manera que YadA (**Biedzka-Sarek et al., 2008**). Debido al pequeño tamaño de Ail, a veces su efecto es enmascarado por la cadena O del LPS en *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*. Ail juega un papel importante cuando la bacteria tiene un LPS rugoso, desprovisto de cadena O (**Biedzka-Sarek et al., 2005**).

Otra función importante de Ail es la adhesión a células epiteliales y proteínas de membrana extracelular en *Y. enterocolitica* y *Y. pestis*. Ail se une a la laminina, fibronectina y al proteoglicano heparán sulfato (**Yamashita et al., 2011**). La unión a la laminina y fibronectina juega un papel importante en la secreción de Yops. Al bloquear una de estas dos proteínas, la secreción de Yops se ve reducida (**Yamashita et al., 2011**). Ail es una de las principales adhesinas de *Y. pestis*, siendo responsable de la secreción de Yops mediante el SSTT y, posiblemente, asegurando el correcto emplazamiento del inyectosoma en la célula diana. Ail es funcional a 28°C y a 37°C (**Felek et al., 2010**).

No obstante, Ail no es necesaria para establecer la infección ni para provocar una infección sistémica (**Miller et al., 1989; Wachtel y Miller, 1995**). Diferentes autores han descrito que la cadena O del LPS puede enmascarar Ail (**Biedzka-Sarek et al., 2005; Bliska y Falkow, 1992**). 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 (**Bartra et al., 2008; Bengoechea et al., 2004; Pierson et al., 1994**).

#### **2.2.5.2. Invasin**

Invasin es una adhesina expresada por las especies enteropatógenas de *Yersinia*, *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* (**Isberg et al., 1987**). En *Y. pestis* el gen *inv* está inactivado por una mutación (**Simonet et al., 1996**). Invasin actúa en las primeras fases de la infección, es responsable de la colonización inicial y de la internalización en la célula diana.

Invasin está codificada en el cromosoma por el gen *inv*, cuya expresión es máxima a 25°C y pH 8 o bien a 37°C y pH 5,5; en cambio, la expresión es mínima a 37°C y pH

8. Esto indica que invasín se expresa antes de ser ingerida y al ser ingerida actúa rápidamente invadiendo el epitelio intestinal (**Grassl et al., 2003; Uliczka et al., 2011**). La eficiencia en la expresión de invasín depende del serotipo de *Y. enterocolitica* y de distintos factores reguladores presentes en dichos serotipos. La expresión de invasín está reprimida a 37°C en los serotipos O:8 y O:9 (**Wyborn et al., 2004; Uliczka et al., 2011**). En *Y. enterocolitica*, el activador transcripcional RovA y el complejo inhibidor H-NS-YmoA controlan la expresión de *inv* en respuesta a señales ambientales (**Ellison y Miller, 2006; Nieto et al., 2002; Revell y Miller, 2000**).

Inv es una proteína de membrana externa de 92-103 kDa, formada por cinco dominios globulares que se proyectan hacia el exterior de la membrana externa (**Hamburger et al., 1999**). 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- $\beta$ 1 que se expresan en la superficie apical de las células M (**Clark et al., 1998; Hamburger et al., 1999; Iwobi et al., 2003; Leong et al., 1990**). Por lo tanto, Inv tiene como función principal mediar la adhesión e invasión del epitelio intestinal, a través de las células M, para que la bacteria alcance las placas de Peyer (**Clark et al., 1998; Pepe y Miller, 1993**).

La expresión de Invasín está regulada por múltiples reguladores transcripcionales, incluyendo RovA, H-NS y YmoA. RovA pertenece a la familia de reguladores transcripcionales MarR/SlyA, los cuales engloban toda una serie de proteínas con varias funciones reguladoras. Están implicados en diversos procesos fisiológicos y juegan un papel importante en la adaptación de la bacteria al ambiente, en la virulencia y en la supervivencia en el huésped (**Nagel et al., 2001**). Para activar la expresión de *inv*, RovA se une a dos secuencias ricas en AT de la región promotora de *inv* (**Heroven et al., 2004; Nagel et al., 2001**). RovA también activa su propia transcripción uniéndose a secuencias específicas de su región promotora (**Nagel et al., 2001**). La coordinación de la expresión de *rovA* e *inv* no es debida al efecto directo de señales ambientales sobre la expresión del promotor de *rovA*, sino que existen mecanismos post-transcripcionales que controlan la síntesis de RovA en función de la temperatura, concentración de nutrientes y fase de crecimiento (**Nagel et al., 2001**). En *Y. pseudotuberculosis* se demostró que RovA sufre un cambio conformacional

cuando la temperatura pasa de 25°C a 37°C, lo que supone una reducción de su capacidad para unirse al ADN y un aumento de su susceptibilidad para ser degradada por las proteasas Lon y ClpP (**Herbst et al., 2009**). Por lo tanto, los niveles de RovA en la bacteria dependen de una proteólisis regulada por la temperatura.

H-NS, inhibe la transcripción de los genes *rovA* e *inv*. Esta proteína asociada al nucleóide actúa, generalmente, como represor global de la transcripción en bacterias Gram negativas, y está implicada en la regulación de la expresión génica en respuesta a señales ambientales. Aunque H-NS se une de manera inespecífica al ADN, reconoce y se une preferentemente a dos secuencias diana ricas en AT y que presentan una curvatura intrínseca (**Dorman et al., 2004; Navarre et al., 2007; Stoebel et al., 2008; Dame et al., 2002**). Regiones de este tipo están presentes en los promotores de *inv* y *rovA* por lo que los sitios de unión de RovA y H-NS están superpuestos en las regiones promotoras de *inv* y *rovA* (**Heroven et al., 2004**). La acción represora de H-NS está reforzada por la formación de heterómeros con proteínas de la familia Hha-YmoA formando un complejo represor (**Cornelis et al., 1991; Ellison and Miller, 2006; Ellison et al., 2003; Madrid et al., 2007; Nieto et al., 2002; Nieto et al., 2000**). En *Y. enterocolitica* O:8, *hns* es un gen esencial por lo que su mutación es letal para la bacteria (**Ellison y Miller, 2006; Pérez-Gutiérrez et al., 2007**).

Para activar la transcripción de estos genes *inv* y *rovA* a temperatura ambiente, RovA debe expresarse en un nivel suficiente para poder desplazar a H-NS y unirse a la región promotora de *inv* y *rovA* con el fin de interactuar con la ARN polimerasa (**Ellison y Miller, 2006; Heroven et al., 2004; Tran et al., 2005**). Sin embargo, a 37°C el complejo H-NS-YmoA inhibe la expresión de ambos genes.

Durante la primera fase de la infección, inmediatamente después de la ingestión de *Yersinia*, invasin inicia la internalización de la bacteria en las células epiteliales del intestino delgado, en particular en las células M, y mantiene la invasión en las placas de Peyer (**Jepson y Clark, 1998**). Este proceso ocurre debido a la unión de invasin con las integrinas- $\beta$ 1 de la célula diana (**Clark et al., 1998**). Sin embargo, el factor crítico para la adhesión y la internalización de *Yersinia* es la densidad de partículas de invasin en la membrana externa de *Yersinia* y la densidad de los receptores 1- $\beta$  de la célula diana. Ambos tienen que ser elevados para que se dé la internalización, en otro

caso sólo se da la adhesión (**Dersch y Isberg, 1999; Isberg et al., 2000**). La unión de invasín a la integrina resulta en la formación de un cúmulo de integrinas que activa la remodelación del citoesqueleto y lleva a la internalización de la bacteria en las células epiteliales. Este mecanismo es conocido como mecanismo de invasión en cremallera (**Grassl et al., 2003**). La internalización permite la secreción de Yops, que es necesaria para la virulencia de *Yersinia* (**Viboud et al., 2005**).

Un mutante *inv* tarda más tiempo que la cepa silvestre en colonizar eficientemente las placas de Peyer (**Pepe y Miller, 1993**). La eventual colonización por el mutante *inv* es debida a la expresión de YadA (**Pepe et al., 1995**). En cualquier caso, las dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de un mutante *inv* y la cepa silvestre no son significativamente diferentes, tanto en infección oral como intraperitoneal (**Pepe y Miller, 1993**).

En el modelo de infección oral de ratón, un mutante *rovA* de *Y. enterocolitica* es menos virulento que la cepa silvestre o que un mutante *inv*. Además, un mutante *rovA* no coloniza los tejidos más profundos comparado con la cepa silvestre o el mutante *inv*, lo que sugiere que RovA regula, directa o indirectamente, la expresión de otros factores de virulencia, además de Inv (**Dube et al., 2003; Revell y Miller, 2000**). Estos otros factores de virulencia podrían estar implicados en eventos post-invasión así como en la iniciación de la inflamación en las placas de Peyer (**Dube et al., 2003**). RovA está implicado, sobre todo, en la invasión, colonización y supervivencia de la bacteria en el tejido linfóide ya que, si la ruta de infección en ratón es intraperitoneal, el mutante *rovA* no es tan atenuado como si la ruta de infección es oral (**Dube et al., 2003**).

En *Y. pseudotuberculosis*, RovA activa la transcripción de *inv* de la misma manera que en *Y. enterocolitica* (**Ellison y Miller, 2006; Herooven et al., 2004; Nagel et al., 2001**). 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 (**Revell y Miller, 2000**). Por otra parte, se describió en *Y. pseudotuberculosis* que RovM también regula la transcripción de *rovA* (**Herooven et al., 2006**). RovM interacciona con una zona reguladora entre el promotor 1 y el promotor 2 de *rovA* y junto con H-NS, inhibe su expresión (**Herooven et al., 2008; Herooven et al., 2007; Herooven et al., 2006**). La mutación del gen *rovM*

provoca un aumento en la expresión de RovA e invasinas, así como un aumento de la internalización de *Y. pseudotuberculosis* en las células huésped.

En *Y. pestis*, que no expresa Inv, RovA es fundamental para el establecimiento de la peste bubónica y neumónica ya que controla la expresión del *locus psa*, que codifica una estructura tipo fimbria en la superficie de la bacteria con propiedades de adhesión, propiedades antifagocíticas (Huang y Lindler, 2004) y que está implicada en la virulencia de la bacteria (Cathelyn et al., 2006; Galván et al., 2007). Su homólogo en *Y. enterocolitica* es el *locus myf* (Iriarte y Cornelis et al., 1995) que también parece estar regulado por RovA (Bengoechea, comunicación personal).

#### 2.2.6. 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 (Mobley et al., 1995).

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* (De Koning-Ward y Robins-Browne, 1995; Riot et al., 1997; Sebbane et al., 2001; De Koning-Ward et al., 1995). 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. El papel de la ureasa como factor de virulencia en *Y. enterocolitica* es el de proteger a la bacteria y potenciar su supervivencia durante el paso por el estómago donde se encuentra con un ambiente ácido. También facilita la supervivencia en los ambientes ácidos que encuentra la bacteria a lo largo del proceso de infección, como el interior del fagosoma de macrófagos, de leucocitos polimorfonucleares u otras células del huésped (De Koning-Ward y Robins-Browne, 1995; Young et al., 1996). El efecto neto de estas reacciones es un tamponamiento del pH del citoplasma bacteriano, 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. No obstante, a pHs ácidos la ureasa requiere de la integridad de la membrana para funcionar correctamente (Young et al., 1996). Este control de la actividad enzimática por el pH permite su adaptación a cambios bruscos de pH, como ocurre cuando la bacteria atraviesa el estómago. Su actividad óptima se da a un pH de 3,5-4,5, lo cual se ajusta a su función fisiológica de protección de la bacteria frente a ambientes ácidos (De Koning-Ward y Robins-Browne, 1997; Young et al., 1996). Este rango de pH es significativamente más ácido que para otras ureasas bacterianas. *In vitro*, su expresión está regulada por la fase de crecimiento y la temperatura, siendo máxima en la fase estacionaria y superior a 25 que a 37°C (De Koning-Ward y Robins-Browne, 1997; Kapatral et al., 2004). La inducción de la expresión de la ureasa a bajas temperaturas se ha relacionado con la necesidad de factores de virulencia en fases tempranas del proceso de infección (De Koning-Ward y Robins-Browne, 1995; De Koning-Ward et al., 1995).

Por otra parte, la subunidad  $\beta$  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* (Mertz et al., 1991; Skurnik et al., 1993). No obstante, Gripenberg-Lerche y colaboradores indican que dicha subunidad no está implicada en la inducción de artritis en aquellas ratas infectadas por vía intravenosa (Gripenberg-Lerche et al., 2000).

### 2.2.7. La isla de alta patogenicidad.

La captación de hierro es un requerimiento esencial para la mayoría de microorganismos. De hecho, la patogenicidad de las bacterias depende de su capacidad para captar hierro, puesto que en los mamíferos este metal se encuentra unido a proteínas eucariotas y, por consiguiente, los niveles de hierro libre son muy bajos. Las especies más patógenas de *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* serotipo I y *Y. enterocolitica* biotipo 1B) codifican una isla de alta patogenicidad de 36-43 kb en su cromosoma, cuya función principal es la captación de hierro (Buchrieser et al., 1998; Carniel et al., 1996; Rakin et al., 1995). Esta isla de alta patogenicidad está ampliamente distribuida en enterobacterias como *E. coli*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (Bach et al., 2000; Schubert et al., 1998).



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 (Rakin et al., 1999; Rakin et al., 1995). La región conservada es de unas 30 kb y comprende genes implicados en la síntesis, transporte y regulación del sideróforo yersiniabactin (Ybt) y el gen que codifica para la integrasa de la isla de patogenicidad (Bearden et al., 1997; Buchrieser et al., 1999; Fetherston et al., 1999; Haag et al., 1993; Pelludat et al., 1998; Rakin et al., 1999). Los genes del locus *ybt* están regulados negativamente por el complejo Fur-Fe<sup>2+</sup> (Carniel et al., 1992; Heesemann et al., 1993; Staggs et al., 1994), 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 (Anisimov et al., 2005; Brem et al., 2001; Fetherston et al., 1996).

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 (Gong et al., 2001; Haag et al., 1993; Heesemann et al., 1993).

#### 2.2.8. La enterotoxina Y-STa.

La producción de enterotoxina es una característica importante en la virulencia de muchos enteropatógenos. Y-STa (del inglés “*Yersinia stable toxin*”) es una enterotoxina termoestable codificada en el cromosoma de las cepas patógenas de *Y. enterocolitica* (Delor et al., 1990). Esta enterotoxina es una proteína de 30 aminoácidos que proviene del procesamiento de un polipéptido de mayor tamaño (Delor et al., 1990). La organización y el centro activo de la proteína Y-STa son muy similares a los de la enterotoxina termoestable STa de *E. coli* (Delor et al., 1990). La expresión de la enterotoxina Y-STa está regulada por la temperatura (Mikulskis et al., 1994). *In vitro*, su máxima expresión se alcanza a temperaturas de entre 20-25°C y durante el inicio de la fase estacionaria. A 37°C su expresión está inhibida a menos que la bacteria crezca en condiciones de elevada osmolaridad o pHs elevados, condiciones que se dan en el íleon (Mikulskis et al., 1994). YmoA participa en la represión de *yst* y en la regulación por la temperatura y la fase de crecimiento (Mikulskis et al., 1994).

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 (Singh y Viridi, 2004). 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 (Butt et al., 1991; Greenwood y Hooper, 1990; Greenwood et al. 1990; Singh y Viridi, 2004). Por lo tanto, Y-STb puede ser un factor de virulencia determinante para *Y. enterocolitica* biotipo 1A (Singh y Viridi, 2004). Finalmente, ni *Y. pseudotuberculosis* ni *Y. pestis* producen ninguna enterotoxina (Pai y Mors, 1978; Pai et al., 1978).

Como se ha descrito anteriormente, la infección de *Y. enterocolitica* en humanos da lugar a gastroenteritis con episodios de diarrea, fiebre y dolor abdominal (Bottone et al., 1977; Cover y Aber, 1989). Aunque el modelo de infección oral de ratón refleja el progreso de la infección en humanos (Carter et al., 1975), los brotes de diarrea no ocurren y sólo se observan en la infección de conejos jóvenes. Delor y colaboradores demostraron que la enterotoxina Y-STa es el factor de virulencia responsable de la diarrea, puesto que la incidencia de diarrea, pérdida de peso y mortalidad asociada a deshidratación no ocurrió en los conejos inoculados con un mutante deficiente en *yst* en el modelo de infección oral de conejos jóvenes (Delor y Cornelis, 1992).

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 (Inoue et al., 1983; Rao et al., 1979). Además, Y-STa regula las señales de calcio que modulan eventos celulares tanto en el núcleo como en el citoplasma de enterocitos de rata. Parece que esta regulación del calcio intracelular podría ser responsable de los efectos de la enterotoxina en el huésped (Saha et al 2009; Saha et al., 2005).

### 3. El lipopolisacárido de *Yersinia*.

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por tener una envoltura celular compuesta por la membrana plasmática, un espacio periplasmático y la membrana

externa. La membrana externa 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) (Funahara et al., 1980, Kita et al., 1973). Además, la membrana externa contiene proteínas entre las que destacan las porinas y la lipoproteína de Braun. Las porinas forman canales o poros para el paso de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular.

La molécula de LPS está formada por (i) el antígeno o cadena O, es un polisacárido situado en la parte distal, (ii) el núcleo, que es un oligosacárido y, (iii) un dominio hidrofóbico llamado lípido A (Raetz et al., 2002).

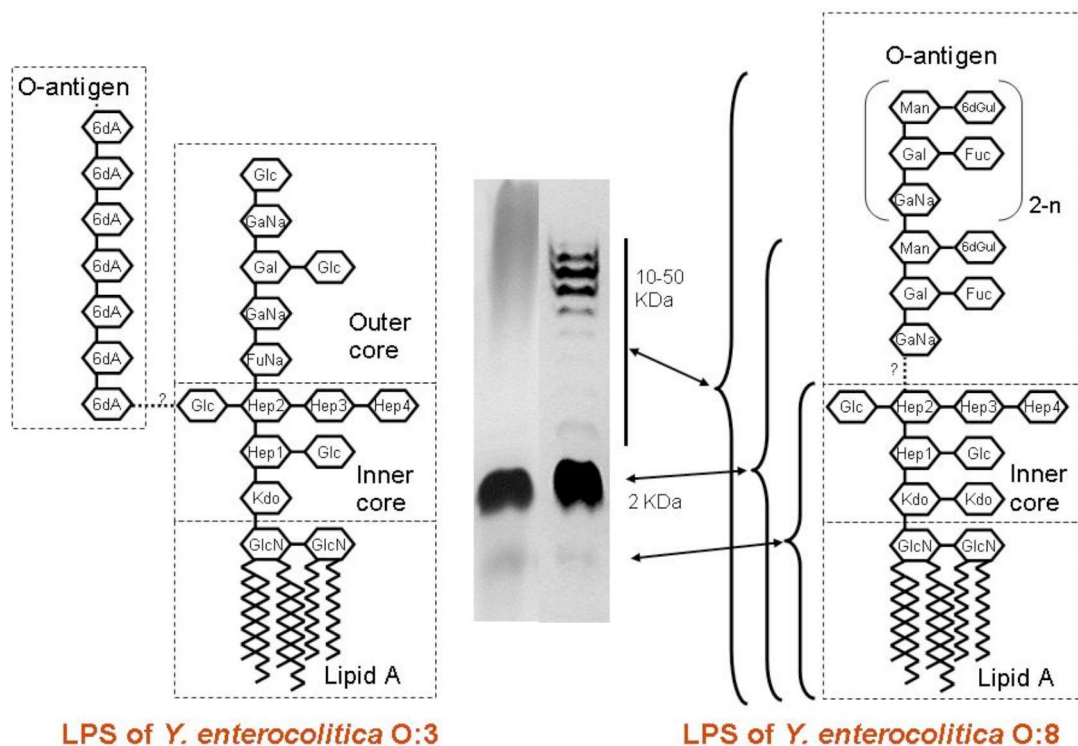
### **3.1. El antígeno o cadena O.**

#### **3.1.1. Estructura**

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 azúcares presentes, y contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad antigénica del microorganismo. Las cadenas O pueden ser de dos tipos: heteropoliméricas u 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 mismo azúcar dando lugar a un patrón de migración característico en forma de mancha (**Figura 8**).

La mayoría de las cadenas O de los LPSs de *Yersinia* presentan una estructura heteropolimérica. Únicamente *Y. enterocolitica* O:3 (**Figura 8**) y *Y. enterocolitica*

O:9 tienen cadenas O homopoliméricas, compuestas por 6-deoxi-L-altrosa y por N-formil-perosamina, respectivamente (Caroff et al., 1984; Müller-Loennies et al., 1999). La cadena O de *Y. enterocolitica* O:8 (YeO8) está formada por un polisacárido que contiene entre siete y diez unidades repetidas de un pentasacárido de N-acetilgalactosamina (GalNAc), L-fucosa (Fuc), D-galactosa (Gal), D-manosa (Man), y 6-desoxi-D-gulosa (6d-Gul) (Bengoechea et al., 2002; Zhang et al., 1996). *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 (Samuelsson et al., 1974). *Y. pestis* carece de cadena O, teniendo un LPS rugoso (Chart et al., 1995; Prior et al., 2001A; Prior et al 2001B).

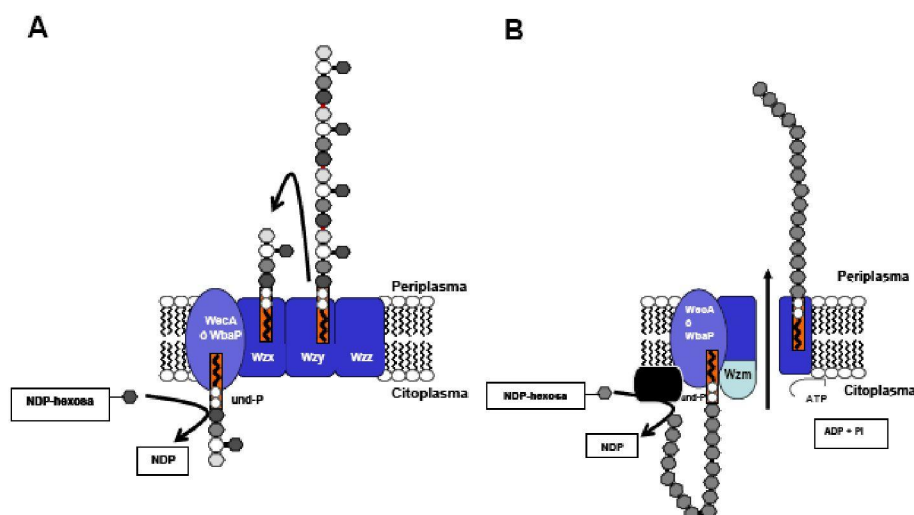


**Figura 8. Estructura del LPS de *Y. enterocolitica* O:3 y de *Y. enterocolitica* O:8.** Patrón de migración característico del LPS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). <http://www.helsinki.fi/yersinia/Research1.htm>

Un aspecto importante de la cadena O de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* es que su expresión está regulada por la temperatura, al igual que ocurre con muchos otros factores de virulencia de las especies de *Yersinia*. Cuando la bacteria crece a temperatura ambiente (21-26°C) produce mayor cantidad de cadena O y de mayor longitud que a 37°C, temperatura a la cual sólo presenta pequeñas trazas de polisacárido (Al-Hendy et al., 1991; Bengoechea et al., 2002).

### 3.1.2. Síntesis de la cadena O.

En la biosíntesis de la cadena O 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) (Raetz et al., 2002). La síntesis comienza con la unión de un primer residuo glucosídico al und-P. Este proceso está catalizado por la galactosiltransferasa (WbaP) si el primer azúcar transferido es galactosa o por la N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (WecA) si el primer azúcar es N-acetilglucosamina (Samuel et al., 2003). 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 9A).



**Figura 9.** (A) Esquema de la síntesis de la cadena O heteropolimérica. (B) Esquema de la polimerización de la cadena O homopolimérica.

En el caso de las cadenas O homopoliméricas el proceso de síntesis es diferente (**Figura 9B**) (**Raetz et al., 2002**). En primer lugar, se completa el polímero con la incorporación progresiva de residuos glucosídicos al und-P en la cara interna de la membrana citoplasmática. En este proceso no interviene ninguna polimerasa específica. A continuación, se transporta a la cara periplasmática por una proteína transportadora de la familia de transportadores tipo ABC. Los datos sugieren que la longitud de la cadena viene determinada por la acción combinada de las glicosiltransferasas y la proteína Wzm aunque son necesarios más estudios que corroboren esta hipótesis (**Whitfield et al., 1999**).

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 (**Navarro et al., 2007**).

En *Yersinia*, los genes necesarios para la síntesis de las cadenas O heteropoliméricas se encuentran agrupados entre los genes *hemH* y *gsK* del cromosoma (**Skurnik et al., 1999**). Las cepas que expresan cadenas O homopoliméricas, entre los genes *hemH* y *gsK* se encuentran los genes necesarios para la síntesis del núcleo externo (**Skurnik et al., 1995**). En estas cepas los genes de la cadena O también están agrupados, pero localizados en otro sitio del genoma. En el caso de *Y. enterocolitica* O:3, los 8 genes necesarios para la síntesis de la cadena O (*wbbX*, *wbbW*, *wbbV*, *wzt*, *wzm*, *wbbU*, *wbbT*, *wbbS*) se encuentran entre los genes anotados como Y11\_16701 (transposasa) y Y11\_16791 (ORF 0.67) (**Batzilla et al., 2011; Reeves et al., 1996; Zhang et al., 1993**). El serotipo O:9 de *Y. enterocolitica* tiene los 6 genes (*manC*, *manB*, *galV*, *galF*, *gmd*, *per*) localizados entre los genes anotados como YE105\_C1499 (proteína hipotética) y YE105\_C1506 (permeasa, sistema de transporte de LPS) (**Skurnik et al., 2007; Wang et al., 2011**).

### 3.1.3. Virulencia

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 de *Y.*

*enterocolitica* O:8 sobre la virulencia en diferentes modelos animales (**Bengoechea 2004; Najdenski et al., 2003; Zhang et al., 1997**). 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 o intravenosa, 1000 veces menos si la ruta de infección es intraperitoneal. 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 (**Zhang et al., 1997**). En otros dos modelos animales, conejos y cerdos, un mutante que no expresa la cadena O también es menos virulento que la cepa silvestre (**Najdedenski et al., 2006; Najdenski et al., 2003**). 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 (**Darwin y Miller, 1999**). 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<sub>50</sub> del mutante que no expresa la cadena O tras una infección oral en ratón es 100 veces mayor que la DL<sub>50</sub> de la cepa silvestre, mientras que la DL<sub>50</sub> del mutante del núcleo externo es 1000 veces mayor que aquella de la cepa silvestre (**Al-Hendy et al., 1992; Skurnik et al., 1999B**). Además, en este serotipo la cadena O juega un papel importante en la resistencia al sistema del complemento (**Al-Hendy et al., 1992; Biedzka-Sarek et al., 2005; Skurnik y Toivanen, 1993**). En *Y. pseudotuberculosis* la cadena O también parece ser esencial para la virulencia. Utilizando la técnica de STM, Mecsas y colaboradores hallaron que el 15% de los mutantes atenuados tenían inserciones en el operón de la cadena O (**Mecsas et al., 2001**).

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 (PAs) (**Branderburg et al., 1993**).

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* (**Bengoechea et al., 2004**). De este modo, un mutante de YeO8 desprovisto de 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 YplA (**Bengoechea et al., 2004**). En la actualidad sólo se puede especular sobre el efecto que tiene el aumento de la expresión de *flhDC* en la virulencia de *Yersinia*. Esto es incluso más difícil debido a que la naturaleza del SSTT del flagelo es poco conocida y a que *flhDC* regula otros sistemas además del flagelo (**Kapatral et al., 2004**). En otro estudio realizado por nuestro grupo, se analizó la expresión y funcionalidad del sistema tipo III de secreción codificado en el plásmido pYV en un mutante rugoso (**Pérez-Gutiérrez et al., 2007**). La ausencia de cadena O regula negativamente la transcripción de *virF* lo que se traduce en una menor secreción de Yops *in vitro* (**Pérez-Gutiérrez et al., 2007**). En el mutante rugoso, HNS se encuentra sobreexpresado, lo que causa el aumento de la expresión de *flhDC*. Y son esos niveles anormalmente elevados de *flhDC* los responsables de la menor secreción de Yops (**Pérez-Gutiérrez et al., 2007**).

Diferentes estudios relacionan la cadena O con la funcionalidad del SSTT. En *Shigella*, se observó que la bacteria glicosilaba su LPS para optimizar su virulencia. Esta glicosilación hacía que la cadena O redujera su longitud a la mitad, mejorando la función del SSTT y sin comprometer la protección de la bacteria (**West et al., 2005**). En *Pseudomonas aeruginosa*, la presencia o ausencia de cadena O del LPS afecta a los SSTT de la bacteria. Al no tener cadena O, la bacteria aumentaba su efecto citotóxico y su virulencia en modelos animales (**Augustin et al., 2007**). También se han llevado a cabo estudios en *Salmonella enterica* *Thyphimurium*, estas bacterias contienen cadenas O de tres longitudes distintas en su membrana externa. Se observó, que la regulación de la longitud de éstas era necesaria para su virulencia (**Murray et al., 2003**). La resistencia al suero es dependiente de las cadenas O muy largas (**Murray et al., 2005**). Las cadenas O largas podrían dispersar las cadenas O muy largas para facilitar el contacto con macrófagos y otras células (**Murray et al., 2005**). Las cadenas O cortas parecen estar relacionadas con la invasión a células epiteliales. La presencia de estas tres longitudes de cadena O permite a la bacteria hacer un balance entre las propiedades defensivas y virulencia para adaptarse al hospedador (**Hölzer et al., 2009**).



### 3.2. El núcleo

El núcleo se encuentra entre la cadena O y el lípido A. Es un oligosacárido que típicamente contiene de 8 a 15 azúcares que son hexosas, heptosas [Lglicero- D-mano-heptopiranososa (L,D-Hep) ó D-glicero-D-mano-heptopiranososa (D,D-Hep)] y ácidos octulosónicos que pueden ser ácido 3-desoxi-D-mano-oct- 2-ulopiranosónico (Kdo) o ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulopiranosónico (Ko). El núcleo a su vez, se divide en núcleo interno (anclado al lípido A) y núcleo externo. En la mayoría de los LPSs, el núcleo es una región que presenta numerosas cargas negativas, principalmente debido a la presencia de grupos fosfato que sustituyen a las heptosas. Esta área de cargas negativas constituye un lugar de unión de cationes divalentes y también de poliaminas, como la putrescina, la cadaverina, la espermina y la espermidina (**Lugtenberg et al., 1983**). La unión intermolecular de estos cationes contribuye a la estabilidad de la membrana externa (**Friedrich et al., 2005**).

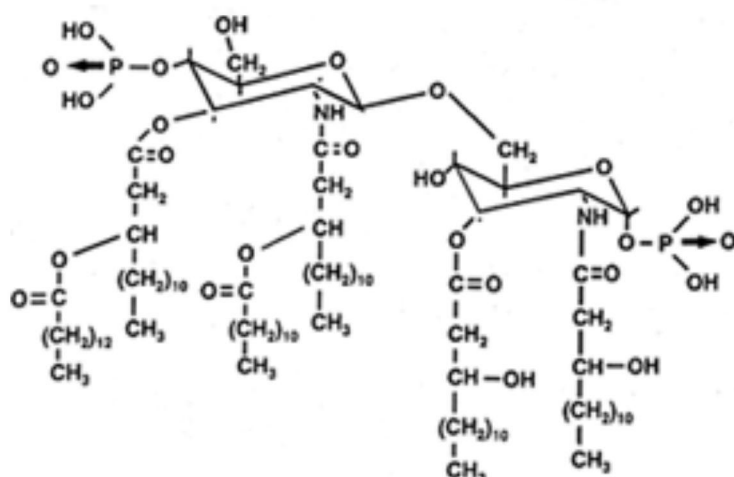
El núcleo externo, que se sitúa entre el núcleo interno y la cadena O, está formado por hexosas como glucosa (Glc), galactosa (Gal) y N-acetilglucosamina (GlcNAc). La estructura del núcleo está bastante conservada, especialmente dentro de la misma familia de bacterias. A pesar de ello, la adición no estequiométrica de otros azúcares, grupos fosfato y otros componentes como etanolamina, residuos acetil o aminoácidos contribuyen a crear cierta heterogeneidad entre las moléculas de LPS presentes, incluso dentro de un mismo cultivo bacteriano (**Lebbar et al., 1994**).

### 3.3. El lípido A

#### 3.3.1. Estructura

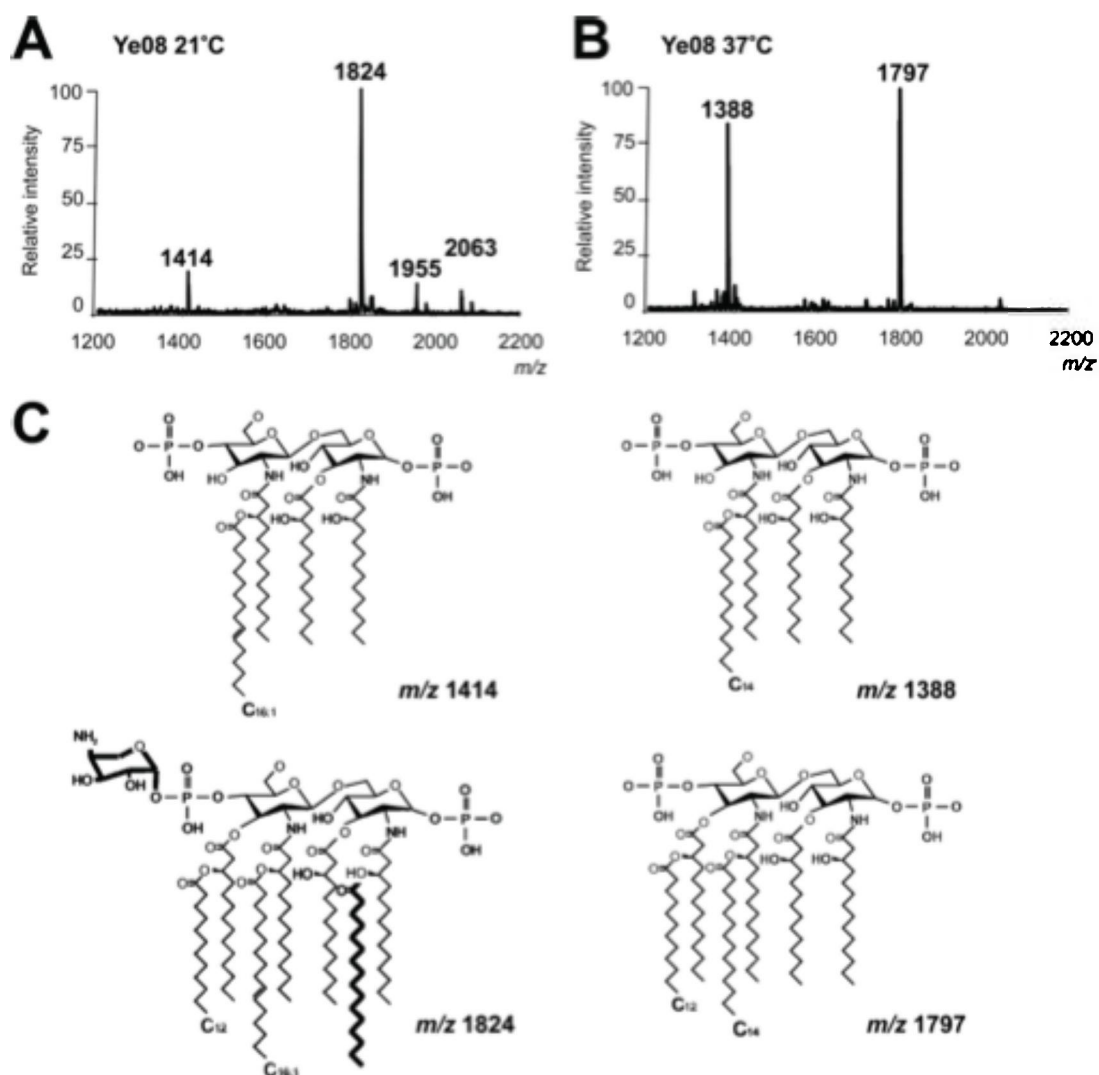
El **lípido A** es la fracción hidrofóbica del LPS anclado en la monocapa externa de la membrana externa. Aunque existen algunas excepciones, el lípido A, junto con el Kdo, es necesario para la viabilidad de las bacterias Gram negativas (**Galloway et al., 1990; Belunis et al., 1995**).

La estructura química del lípido A de *Escherichia coli* (**Figura 10**) consta de un disacárido de glucosamina (GLcN2N) con enlace  $\beta$  (1-6), acilado con residuos 3-hidroximiristato (3-OH-C14) en las posiciones 2, 3, 2', 3' y fosforilado en 1 y 4'. Además, los ácidos grasos de las posiciones 2' y 3' se encuentran esterificados con otros ácidos grasos, normalmente laureato (C12) y miristato (C14).



**Figura 10.** Estructura del lípido A de *E. coli*.

Varios estudios sugieren que la expresión del lípido A de *Yersinia* está regulada por la temperatura (Aussel et al., 2000; Bengoechea et al., 2003; Kawahara et al., 2002; Pérez-Gutiérrez., 2010; Rebeil et al., 2004; Rebeil et al., 2006). En el caso de *Yersinia pestis*, a 37°C sintetiza un lípido A tetraacilado, mientras que a 21°C el lípido A es mayoritariamente hexaacilado (Kawahara et al., 2002; Rebeil et al., 2004). El lípido A de *Y. enterocolitica* cultivada a 21°C es principalmente hexaacilado (masa/carga m/z 1824), formada por dos glucosaminas, dos grupos fosfato, cuatro ácidos grasos principales 3-OH-C14, dos de ellos acilados con un C12 y un C16:1 (Rebeil et al., 2004; Reinés et al., 2012A) (Figura 11A). No obstante, también aparece otro pico menos abundante que corresponde a una forma hexaacilada (m/z 1797) pero con un C14 en lugar de un C16:1. También aparece una forma tetraacilada (m/z 1388), compuesta por tres ácidos grasos principales y un C16:1 (Figura 11A). Por último, a 21°C presenta otros dos picos que son consistentes con la adición de L-Ara4N (m/z 1955) o C16 (m/z 2063) a la estructura hexaacilada. Por otro lado, a 37°C (Figura 11B), YeO8 presenta un lípido A mayoritariamente tetraacilado, formado por tres ácidos grasos principales 3-OH-C14 y un C14 (m/z 1388). Además, presenta otro pico minoritario correspondiente a una forma hexaacilada (m/z 1797) (Rebeil et al., 2004; Pérez-Gutiérrez et al., 2010; Reinés et al., 2012A).



**Figura 11.** Análisis mediante MALDI-TOFF de la estructura del lípido A extraído de *Y. enterocolitica* O:8 cultivada a 21°C (A) y a 37°C (B). (C) Posibles estructuras de las especies principales de lípido A de los espectros. (Reinés et al., 2012A).

### 3.3.2. Síntesis

Los genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis del lípido A se encuentran dispersos en el genoma bacteriano, en copia única, y están conservados en las bacterias Gram negativas estudiadas. El laboratorio de Chris Raetz elucidó complementamente la síntesis del lípido A en (Figura 11) y en general, se considera que todas las bacterias Gram negativas sintetizan su lípido A de la misma manera (Raetz et al., 2002).

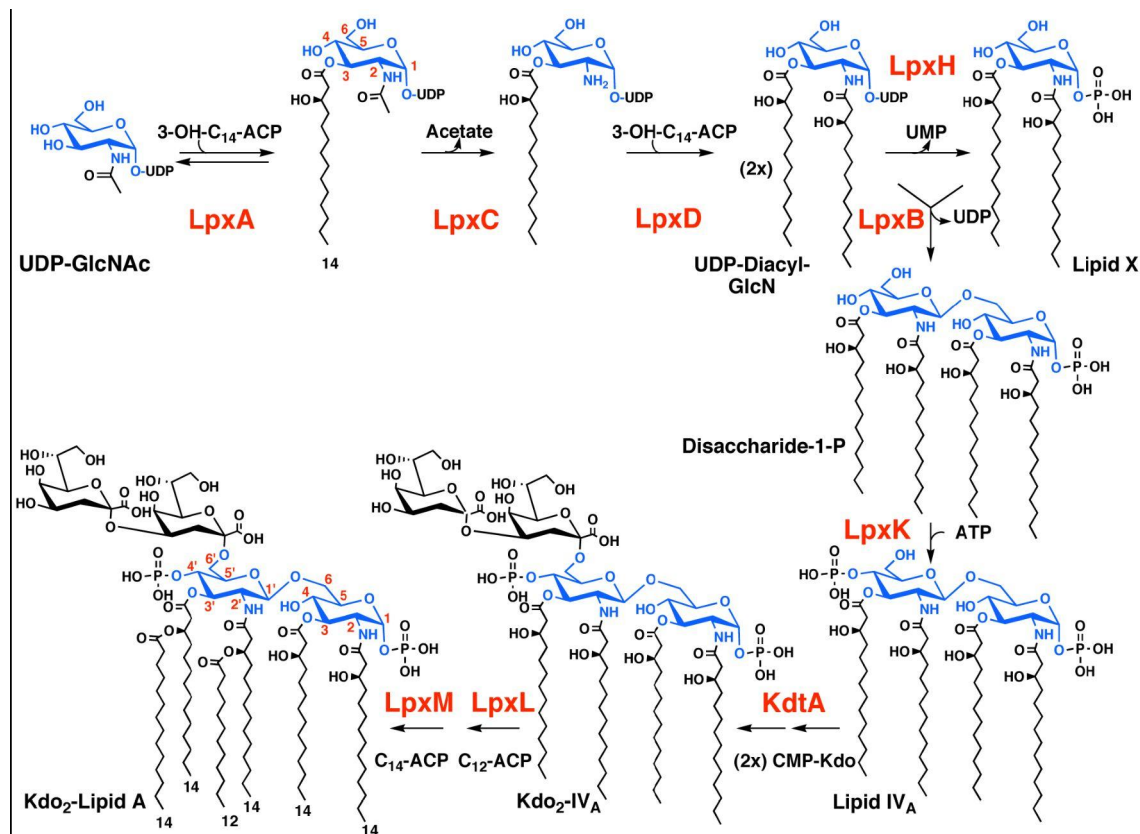


Figura 12. Biosíntesis del lípido A. Amablemente cedido por Raetz y colaboradores (Raetz et al., 2007).

La síntesis del lípido A es llevada a cabo en la cara citoplasmática de la membrana interna en la que actúan de forma secuencial nueve enzimas (Raetz et al., 2002). Brevemente, la síntesis comienza con la adición de hidroximiristato (3-OH-C14) a la molécula UDP-N-acetilglucosamina para formar UDP-3-O-monoacil-Nacetilglucosamina. Esta reacción está catalizada por la aciltransferasa LpxA. Posteriormente, la deacetilasa LpxC elimina un grupo acetilo y la aciltransferasa LpxD incorpora otra molécula de 3-OH-C14 para generar UDP- 2,3-diacilglucosamina. Sobre esta molécula, denominada lípido X, actúa una hidrolasa (LpxH) que libera UMP para obtener 3,3-diacilglucosamina-1-P. A continuación, se produce la condensación de una molécula de UDP-2,3-diacilglucosamina con una molécula de 3,3-diacilglucosamina-1-P generándose un tetraacildisacárido denominado lípido IV<sub>A</sub>. Esta reacción está catalizada por la enzima LpxB. Sobre el lípido IV<sub>A</sub>, la enzima LpxK añade un grupo fosfato en la posición 4' y la Kdo transferasa (WaaA o KdtA) añade dos moléculas de Kdo generándose la molécula (Kdo)<sub>2</sub>-lípido IV<sub>A</sub> (Brozek et al., 1989).

Los últimos pasos de la síntesis concluyen con la formación de un LPS hexaacilado (**Brozek et al., 1990**). Así, en primer lugar, se incorpora una molécula de miristato (C14), proceso catalizado por la aciltransferasa LpxM (MsbB), y posteriormente una molécula de laureato (C12), proceso mediado por la aciltransferasa LpxL (HtrB) (**Clementz et al., 1996, Clementz et al., 1997**). 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 (**Carty et al., 1999**). En *Y. enterocolitica* O:8 las aciltransferasas LpxM (MsbB), LpxL (htrB) y LpxP son las responsables de añadir al lípido IV<sub>A</sub> un C12, C14 y C16:1, respectivamente. A diferencia de *E. coli*, LpxM añade un C12 y LpxL un C14. Además estas aciltransferasas están reguladas por la temperatura. Así la expresión de *lpxM* y *lpxP* es superior a 21°C que a 37°C, mientras que la expresión de *lpxL* es superior a 37°C que a 21°C (**Pérez-Gutiérrez et al., 2010**).

### 3.3.3. Modificaciones del lípido A.

Algunas bacterias Gram negativas, entre las que se encuentran *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *Y. enterocolitica* O:8, modifican el lípido A en respuesta a las variaciones del medio de cultivo, como por ejemplo la presencia de PAs. Algunas de estas modificaciones consisten en la hidroxilación del miristato, deacilaciones, la adición de fosfoetanolamina (pEtN), aminoarabinosa (LAra-4N) y palmitato (C16) al lípido A (**Raetz et al., 2002, Raetz et al., 2007; Reinés et al., 2012A**). La evidencia disponible indica que todas estas modificaciones modulan la interacción de la bacteria con distintos elementos del sistema inmune innato (**Darveau et al., 1998, Miller et al., 2005**).

Las modificaciones en la cadena O del LPS y las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa, palmitato, y fosfoetanolamina se han relacionado con la resistencia a PAs en *Enterobacteriaceae* y otras bacterias (**Guo et al., 1998; Gunn et al., 2000; Guo et al., 1998; Lee et al., 2004; Nizet et al., 2006**).

Varias modificaciones del lípido A están controladas por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ (**Guo et al., 1997; Reinés et al., 2012A**) y PmrA/PmrB

(Gunn et al., 1998; Gunn et al., 1996; Reinés et al., 2012A). En *S. typhimurium*, la biosíntesis y adición de L-Ara4N al lípido A al igual que la adición de fosfoetanolamina, están reguladas por el sistema PmrA/PmrB (Gunn et al., 1998; Lee et al., 2004; Zhou et al., 2011). La transcripción de los genes activados por PmrA se regula por los niveles de Fe<sup>3+</sup> o pH ácido, señales detectadas por el sensor PmrB (Wosten y Groisman, 1999; Wosten et al., 2000). El sistema también se activa si la concentración de magnesio en el medio es del orden de mM, y para ello se requiere la participación de PhoP/PhoQ (Gibbons et al., 2005; Groisman et al., 2001; Soncini et al., 1996; Soncini y Groisman, 1996) y de la proteína PmrD (Kox et al., 2000). Esta proteína controla la actividad del sistema PmrA/PmrB a nivel post-transcripcional.

En *Salmonella* y *Klebsiella* la adición de palmitato al lípido A está regulada por el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (Belden y Miller, 1994; Gibbons et al., 2005; Guo et al., 1997; Miller et al., 1989; Miller y Mekalanos, 1990; Llobet et al., 2011). PhoP/PhoQ no sólo controla las modificaciones del lípido A sino que regula numerosas actividades implicadas en la virulencia como, por ejemplo, la expresión de los sistemas de secreción tipo III en *Salmonella* (Aguirre et al., 2006; Bajaj et al., 1996; Deiwick y Hensel, 1999; Fass y Groisman, 2009; Miller y Mekalanos, 1990; Nakka and Zhao, 2010).

En *Y. enterocolitica* O:8, los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB regulan positivamente la biosíntesis y adición de aminoarabinosa y de palmitato al lípido A (Reinés et al., 2012A). Las enzimas necesarias para las modificaciones del lípido A se encuentran en el operón *pmrHFIJKLM* y el gen *ugd*, responsables de la adición de aminoarabinosa, mientras que el gen *pagP* codifica la aciltransferasa necesaria para la adición de palmitato. Estos sistemas están regulados por la temperatura, siendo su expresión mayor a 21°C que a 37°C. RovA controla positivamente la expresión de PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB, por el contrario H-NS ejerce una regulación negativa sobre éstos. A 21°C, RovA alivia la represión ejercida por H-NS sobre la expresión del operón *pmrHFIJKLM*, el gen *ugd*, el gen *pagP* y los sistemas PhoPQ y PmrAB (Reinés et al., 2012A).

En *Y. enterocolitica* O:8 la enzima LpxR es la encargada de eliminar el residuo aciloxiacil de la posición 3' del lípido A, responsable de la estructura tetraacilada del

lípidos A a 37°C (**Reinés et al., 2012B**). Su expresión está regulada por la temperatura, siendo mayor a 21°C que a 37°C. A 21°C la presencia de aminoarabinosa impide la deacilación del lípido A dependiente de LpxR. La expresión de *lpxR* se encuentra negativamente regulada por PhoPQ, PmrAB y RovA (**Reinés et al., 2012B**).

En *Yersinia*, la sustitución del lípido A con aminoarabinosa y palmitato también está regulada por la temperatura, siendo mayor a 21°C que a 37°C (**Anisimov et al., 2005; Rebeil et al., 2004; Reinés et al., 2012A**). En otras bacterias, las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa están ligadas a la resistencia a polimixina B, utilizada comúnmente para demostrar resistencia a péptidos en el laboratorio. Anisimov y colaboradores, encontraron la relación entre la susceptibilidad a polimixina B y el contenido en aminoarabinosa del lípido A de *Y. pestis* (**Anisimov et al., 2005**). Recientemente, la contribución de la aminoarabinosa en la resistencia a polimixina B ha sido demostrada (**Dentovskaya et al., 2011; Reinés et al., 2012A**).

La susceptibilidad de *Y. enterocolitica* a la polimixina B es mayor cuando la bacteria crece a 37°C que a 21°C (**Bengoechea et al., 1996**). La misma relación de temperatura se observó al realizar los experimentos con otros PAs no relacionados estructuralmente con la polimixina B, donde las CMI eran inferiores a 37°C en todos los casos. Sugiriendo que el mecanismo de resistencia dependiente de la temperatura podría ser común para todos los PAs (**Reinés et al., 2012A**). Este mecanismo de resistencia regulado por la temperatura es debido a las modificaciones del Lípido A con aminoarabinosa y palmitato (**Reinés et al., 2012A**). Las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa y palmitato contribuyen a la virulencia de *Y. enterocolitica* en ratones BALB/c (**Reinés et al., 2012A**).

### **3.4. LPS y péptidos antimicrobianos PAs.**

Los PAs son producidos por una gran diversidad de organismos tanto procariontes como eucariontes. En el caso de los vertebrados son parte esencial de la respuesta inmune innata. Su actividad antimicrobiana es muy potente y constituyen un importante mecanismo defensivo frente a las infecciones.

Los PAs suelen ser moléculas con carga positiva (catiónicos) de carácter anfipático y de longitud y composición variable (de 6 a 100 aminoácidos) (**Brogden et al., 2005, Nicolas et al., 1995**).

Existen cuatro familias diferentes según sus características estructurales: péptidos con forma de lámina beta con puentes disulfuro, péptidos anfipáticos con forma de alpha hélice, péptidos extendidos y péptidos con forma de lazo (**Hancock et al., 1999, Nicolas et al., 1995**). En la mayoría de los casos, el primer paso en el mecanismo de acción de estos péptidos consiste en la interacción electrostática entre los péptidos catiónicos y las cargas negativas del LPS presentes en el núcleo y lípido A del LPS. Esto produce un desplazamiento de los cationes divalentes asociados al LPS lo que causa una desestabilización de la membrana externa. Finalmente, los péptidos atraviesan la membrana plasmática gracias a interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (**Vaara et al., 1992, Nikaido et al., 2003**).

Las bacterias han desarrollado mecanismos para resistir la acción de los PAs (**Nizet et al., 2006**). Existen dos mecanismos de resistencia a PAs que son: mecanismos de resistencia constitutivos y mecanismos de resistencia inducibles. Dentro de los mecanismos de resistencia constitutivos, las estrategias mejor estudiadas son la presencia de cadena O ya que dificulta la accesibilidad del PA a las dianas presentes en el núcleo y lípido A (**Capodici et al., 1994; Peterson et al., 1986**) y la presencia de bombas de expulsión que evitan la entrada de péptidos al interior de la bacteria de manera similar a como lo hacen los antibióticos. Nuestro grupo demostró que *Y. enterocolitica* O:8 emplea una bomba dependiente de potasio para eliminar los PAs (**Bengoechea and Skurnik, 2000**). Los mecanismos inducibles son aquellos que se expresan en respuesta a la presencia de PAs. Los más estudiados son las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa, fosfoetanolamina y palmitato (**Guo et al., 1998; Lee et al., 2004; Raetz et al., 2007; Trent et al., 2001; Reinés et al., 2012A**).



## 4. Sistemas de estrés de membrana

Las bacterias Gram negativas han desarrollado diferentes sistemas de respuesta a situaciones de estrés de membrana para mantener la integridad de la envoltura bacteriana (Darwin et al., 2005). En el cromosoma de *Y. enterocolitica* están codificados los sistemas de estrés extracitoplasmático Psp (“phage-shock-protein”), Cpx, y RpoE (sigma E), siendo Psp el único esencial para su virulencia (Carlsson et al., 2007; Darwin y Miller, 2001; Heusipp et al., 2003; Maxson y Darwin, 2004).

### 4.1. Sistema Psp

La expresión del sistema Psp se induce de manera específica por la deslocalización de secretinas (Darwin y Miller, 2001; Lloyd et al., 2004; Maxson y Darwin, 2004). Las secretinas son una familia de proteínas oligoméricas que forman poros en la membrana externa (Genin y Boucher, 1994) y deben asociarse a lipoproteínas para alcanzar su ubicación correcta en la membrana (Hardie et al., 1996). 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 (Genin y Boucher, 1994). Otros factores que pueden desencadenar la activación del sistema Psp son condiciones extremas de temperatura u osmolaridad, tratamientos con etanol, la presencia de ionóforos, incubación en fase estacionaria con pH alcalino, inhibición de la secreción de proteínas o de la síntesis de ácidos grasos (Darwin et al., 2005; Model et al., 1997). Todos estos factores explicados hasta el momento, tienen un efecto común que es la disipación del gradiente electroquímico de la membrana, aunque no está totalmente demostrado en todos los casos (Bergler et al., 1994; Brisette et al., 1990; Weiner y Model, 1994). Por lo tanto, probablemente lo que induce la activación del sistema Psp es la disipación de dicho gradiente (Kleerebezem et al., 1996). La función de este sistema podría ser la de paliar las alteraciones de la membrana con el fin de restaurar el gradiente electroquímico de la membrana (Kleerebezem et al., 1996).

En *Y. enterocolitica*, el sistema Psp está codificado en dos *loci* no adyacentes en el cromosoma, *pspF-pspABCDycjXF* y *pspG*. El sistema Psp está formado por proteínas localizadas en la membrana interna que interaccionan con proteínas del citoplasma para comunicar la presencia de un estrés extracitoplasmático. La regulación de la

expresión de los promotores *pspA* y *pspG* es compleja, dependiendo de interacciones proteína-proteína y del activador transcripcional PspF (Adams et al., 2003; Kleerebezem et al., 1996). En condiciones normales, PspF está inhibido por la interacción directa con PspA (Dworkin et al., 2000; Elderkin et al., 2005). 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 (Adams et al., 2003; Maxson y Darwin, 2006; Weiner et al., 1991). 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 (Jovanovic et al., 1996). PspA parece contribuir a restablecer el gradiente electroquímico asociándose a la membrana después de la inducción del sistema Psp (Kleerebezem et al., 1996). PspG parece ser también una proteína efectora, aunque su función es aún desconocida (Green y Darwin, 2004; Jones et al., 2003; Lloyd et al., 2004).

En *Y. enterocolitica*, el sistema Psp no afecta a la regulación o a la función del SSTT Ysc-Yop pero es esencial cuando el SSTT Ysc-Yop está formado. El sistema Psp alivia /previene el estrés causado por el SSTT Ysc-Yop (Flores-Kim et al., 2012).

El sistema Psp es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* en el modelo de infección oral de ratón (Darwin y Miller, 1999; Darwin y Miller, 2001). El hecho de que las secretinas sean un componente esencial de los SSTT explicaría, al menos en parte, la importancia del sistema Psp en la virulencia de *Y. enterocolitica* (Darwin y Miller, 2001).

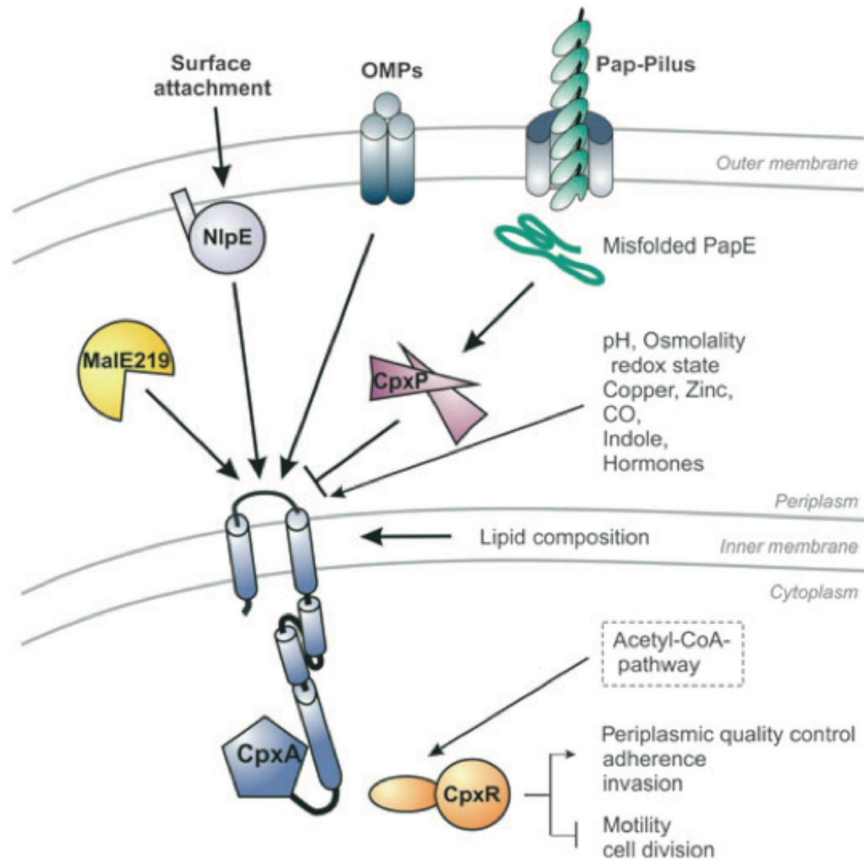
#### 4.2. El sistema de dos componentes Cpx.

La envoltura de las bacterias gram-negativas está compuesta por la membrana interna, el espacio periplasmático y la membrana externa. Además, la envoltura la completan estructuras de la superficie celular como el flagelo, las porinas, los sistemas de secreción y las adhesinas (Silhavy et al., 2010). Estas complejas estructuras están formadas por subunidades de proteínas que requieren un control adecuado de los procesos de síntesis, exportación, plegamiento y ensamblaje para garantizar la

funcionalidad de cada estructura **(Ruiz y Silhavy, 2005)**. Alteraciones que interfieren en estos procesos activan el sistema de dos componentes Cpx que responde no sólo regulando la expresión de los factores de plegamiento y proteasas, sino que también actúa regulando la expresión de las estructuras de superficie como el flagelo, los sistemas de secreción y el pili que juegan un importante papel en la patogénesis **(Dorel et al., 2006., Vogt et al., 2010)**.

El sistema Cpx pertenece al grupo de los sistemas de transducción de señales de dos componentes. Está compuesto por el sensor quinasa CpxA anclado a la membrana interna, el regulador de respuesta citoplasmático CpxR y el inhibidor accesorio del periplasma CpxP que da respuesta a estímulos adicionales **(Bluelow y Raivio, 2010; Krell et al., 2010)**. CpxP es un regulador auxiliar de CpxA que inhibe el sistema Cpx cuando es sobreexpresada **(Raivio et al., 1999)**. Esta proteína es un dímero cargado positivamente que interacciona con los grupos ácidos del dominio plasmático de CpxA **(Zhou et al., 2011)**.

Tres reacciones controlan el estado funcional del sistema: (a) la autofosforilación de una histidina conservada de CpxA, (b) la transfosforilación de un aspartato conservado de CpxR y (c) la desfosforilación de CpxR fosforilado para volver al estado no estimulado **(Gao y Stock, 2009)**. El balance entre el estado fosforilado y desfosforilado de CpxR es crucial para el desarrollo de la respuesta genética a un determinado estímulo y para determinar la duración de dicha respuesta **(Stock et al., 2000; Dorel et al., 2006)**.

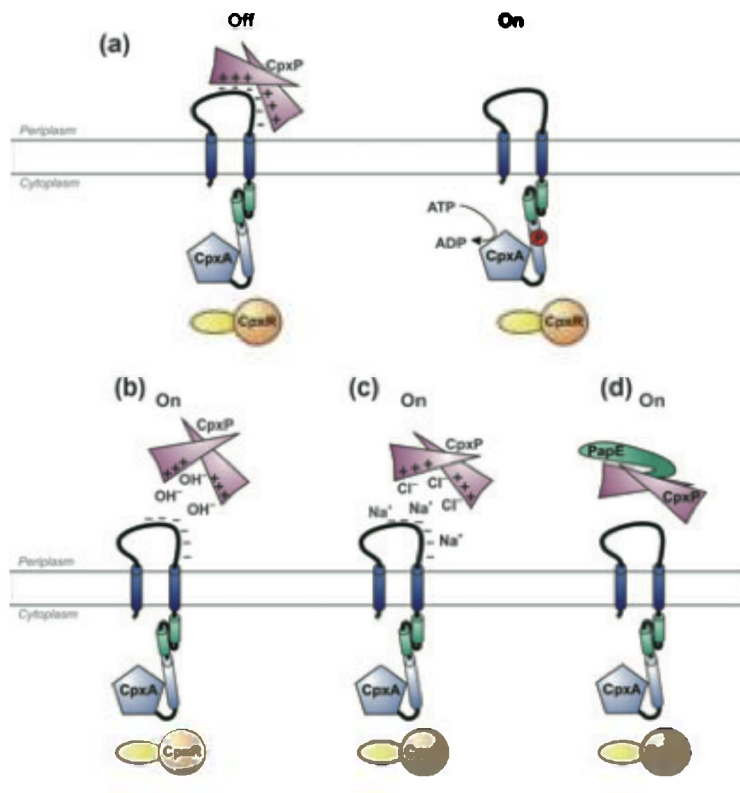


**Figura 13. Diferentes estímulos que afectan al sistema Cpx** . El sistema Cpx puede ser activado de forma dependiente o independientemente de las proteínas accesorias CpxP y NlpE. CpxP es sensible a proteínas desnaturalizadas como PapE, sal y pH alcalino. NlpE detecta la adhesión a superficies hidrofóbicas. La proteína de unión a maltosa desnaturalizada MaleE219 activa el sistema Cpx de manera independiente de CpxP y NlpE. El CpxA activado transfosforila CpxR. Alternativamente CpxR se puede fosforilar independientemente de CpxA mediante productos intermedios de la vía del acetil-CoA. El CpxR fosforilado actúa de factor de transcripción de genes de estructuras de la superficie y factores de plegamiento, entre otros (Hunke et al., 2012).

El sistema Cpx se activa por una gran variedad de estímulos (Figura 13). Las condiciones que activan el sistema Cpx son: el pH alcalino, el estado redox de la bacteria, metales como el cobre y zinc, el indol, la presencia de determinadas hormonas, una alta concentración de sales, el monóxido de carbono, la proteína desnaturalizada de unión a maltosa MaleE219 y la presencia de proteínas desnaturalizadas en el periplasma como PapE. También, la alteración de las estructuras de la membrana externa y la adhesión a superficies hidrofóbicas, así como, alteraciones en la composición lipídica de la membrana interna activan el sistema Cpx (DiGiuseppe y Silhavy, 2003; Hunke et al 2012).

La activación del sistema comienza por la percepción del estímulo que hace que CpxA autofosforile su sensor quinasa con ATP en el residuo de histidina. A continuación un grupo fosforil es transmitido al residuo de aspartato del regulador de respuesta CpxR. Alternativamente, CpxR se puede fosforilar independientemente de CpxA mediante productos intermedios de la vía del acetyl-CoA. CpxR también puede ser activado independientemente de CpxA cuando las bacterias se cultivan en exceso de carbono como glucosa o piruvato (**Wolfe et al., 2008**). El CpxR fosforilado actúa de factor de transcripción de diferentes genes (**Zhou et al., 2011; Hunke et al., 2012**). El regulón de Cpx contiene docenas o cientos de genes implicados en la respuesta del sistema Cpx. Algunos de estos genes están implicados en el mantenimiento de la envoltura, comunicación con otras vías reguladoras y la patogénesis (**Vogt y Raivio, 2012**). Esto sugiere que el sistema Cpx actúa integrando diversas señales y promueve la protección de la envoltura por múltiples vías. El mecanismo preciso de sistema Cpx sigue siendo desconocido (**Zhou et al., 2011**).

Las proteínas accesorias CpxP y NlpE también activan el sistema Cpx. CpxP reconoce proteínas desnaturalizadas del periplasma como PapE, también es sensible a la sal y al pH alcalino. La lipoproteína de la membrana externa NlpE, detecta la adhesión a superficies hidrofóbicas (**Hunke et al., 2012**).



**Figura 14. Integración de señales del sistema Cpx dependientes de la proteína accesoria CpxP .** (A) Interacción polar entre el dímero CpxP y CpxA que mantiene el sensor quinasa apagado. La separación de CpxP de CpxA activa CpxA. (B) El pH alcalino cambia la conformación de CpxP impidiendo su unión a CpxA. (C) Una alta concentración de sales impide la interacción polar entre CpxP y CpxA. (D) Proteínas desnaturadas compiten por la unión con CpxP impidiendo su unión a CpxA (Hunke et al., 2012).

En condiciones normales (Figura 14), el regulador accesorio CpxP está unido a CpxA. CpxR es un dímero cargado positivamente que interacciona polarmente con los grupos ácidos del dominio plasmático de CpxA (Zhou et al., 2011; Hunke et al., 2012). El sistema Cpx se mantiene en un estado inactivado.

Cuando aparecen estímulos que alteran la envoltura bacteriana (Figura 14), como la presencia de proteínas desnaturadas en el periplasma, altas concentraciones de sales o pH alcalino, CpxP no puede unirse a CpxA y el sistema Cpx se activa. CpxP se une a las proteínas desnaturadas y éstas son degradadas por la proteasa DegP (Bluelow y Raivio, 2005; Isaac et al., 2005; Hunke et al., 2012).

CpxA también está regulado por NlpE., al unirse la bacteria a superficies hidrofóbicas NlpE se desnaturaliza y el dominio N-terminal se une a CpxA activando la actividad quinasa (**Raivio y Silhavy, 1997; Bluelow y Raivio, 2010**).

El sistema Cpx está relacionado con la biogénesis y expresión del pili en *E.coli* enteropatógena, siendo un factor importante para su virulencia (**Roberts et al., 1994**). Una activación mínima/baja del sistema Cpx es necesaria para la formación del pili en *E.coli* enteropatógena, mientras que la activación total del sistema hace que se inhiba su expresión (**Vogt et al., 2010**). El sistema Cpx también podría estar implicado en la expresión de otros factores de virulencia.

El sistema Cpx de *E. coli*, detecta cambios en la cadena O del LPS. La sobreexpresión de la proteína Wzz activa el sistema Cpx, que se une a regiones cercanas a los promotores P<sub>wb1</sub> y P<sub>wb2</sub> pudiendo regular su expresión de forma directa (**Bengoechea et al., 2002B**). El sistema Cpx podría estar implicado en la regulación del antígeno O en función de la temperatura en *Y. enterocolitica* y en la expresión de otros factores de virulencia.

En *Y. pseudotuberculosis* se ha observado que la expresión de genes que codifican invasin está influenciada por el sistema Cpx (**Carlsson et al., 2007**). El sensor CpxA es necesario para controlar la producción de invasin. Al activarse CpxA fosforila CpxR, este CpxR fosforilado actúa como represor de la transcripción de invasin por la unión a las regiones de control de *inv* y *rovA*. Un mutante *cpxA* da como resultado una interacción deficiente con la célula eucariota por un defecto en la producción de invasin, probablemente debido a la acumulación de CpxR fosforilado (**Carlsson et al., 2007**). La activación del sistema Cpx reduce la transcripción de los STTS (**Macritchie et al., 2008B**). En *Y. pseudotuberculosis* se ha demostrado la relación entre Cpx y el SSTT Ysc-Yop. Un mutante *cpxA* da como resultado una menor secreción de Yops, debido a un defecto en algunas proteínas estructurales del SSTT y a una menor transcripción de algunos efectores Yops (**Carlsson et al., 2007B**). Este efecto es debido a la acumulación de CpxP fosforilado que se une directamente al promotor inhibiendo la transcripción de genes del SSTT Ysc-Yop (**Liu et al., 2012**). En resumen, el sistema Cpx es importante para la correcta funcionalidad del SSTT

Ysc-Yop y la adhesión a la célula eucariota en *Y. pseudotuberculosis* (**Carlsson et al., 2007A y B**).

Recientemente, en nuestro laboratorio se observó que cambios en la acilación del lípido A podrían activar los sistemas de estrés de membrana (**Pérez-Gutiérrez et al., 2010**). Un mutante lpxR de *Y. enterocolitica*, que no presenta la deacilasa necesaria para pasar a lípido A tetraacilado a 37°C, tiene reducida la motilidad y la invasión a 21°C. Debido a una reducción de la expresión de *flhDC* y *rovA*. La falta de la proteína LpxR podría activar los sistemas de estrés de membrana Sigma E y Cpx dando lugar a una reducción de la expresión de estos genes y por tanto reduciendo la expresión de factores de virulencia de *Y. enterocolitica* (**Reinés et al., 2012B**).

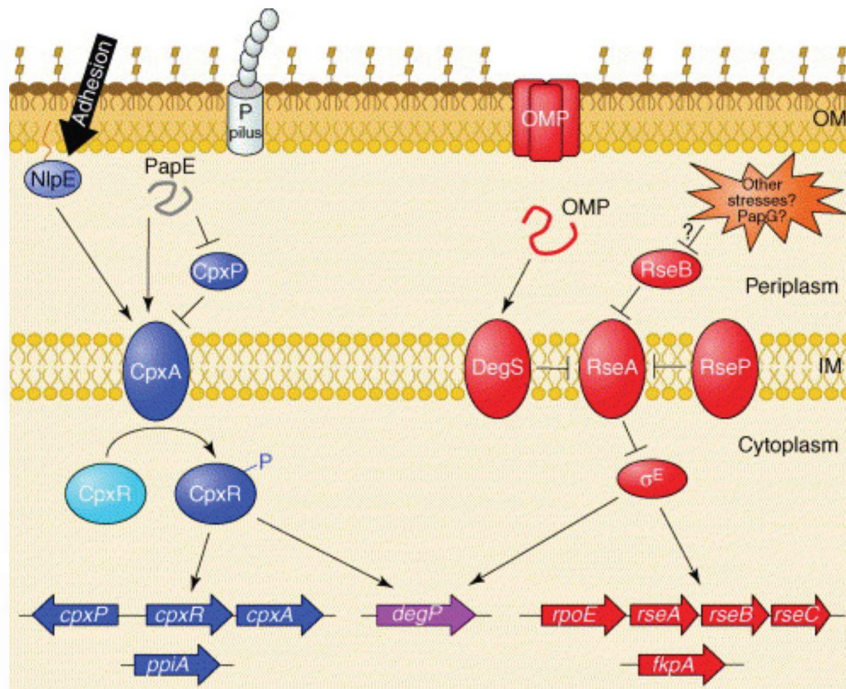
### 4.3. Sigma E

Sigma E es el sistema de estrés de membrana encargado del correcto ensamblaje de las proteínas de la membrana externa. En presencia de estrés que afecta al proceso de ensamblaje, sigma E actúa controlando la expresión de los genes involucrados en el plegamiento y degradación de las proteínas de la membrana externa (**Raivio et al., 2001**).

El gen *rpoE* codifica el factor sigma E en *Y. enterocolitica*. Como en *E. coli*, este gen es esencial para el crecimiento y su expresión está autoregulada (**Heusipp et al., 2003**). A diferencia de *E. coli*, la inducción de sigma E en *Y. enterocolitica* no se produce por choque térmico o etanol, pero sí por estrés osmótico. La superproducción de la adhesina de la membrana externa Ail no induce la expresión de *rpoE* (**Heusipp et al., 2003**). La deacilación del lípido A en *E. coli* activa el sistema Sigma E (**Tam y Missiakas, 2005**).

Los sistemas de estrés de membrana sigma E y Cpx se activan por estrés y responden incrementando la expresión de la proteasa DegP y la expresión de genes únicos para cada respuesta (**Raffa et al., 2002**) (**Figura 15**).





Current Opinion in Microbiology

**Figura 15. Múltiples vías de inducir los sistemas Cpx y Sigma E.** El sistema Cpx puede ser inducido de manera dependiente o independientemente de NlpE. Mientras la adhesión a superficies hidrofóbicas requiere NlpE para activar CpxA, la proteína desnaturalizada PapE no la requiere. La activación de CpxA fosforila CpxR, que actúa de activador transcripcional de genes relacionados con la biogénesis de la envoltura. Por otra parte, Sigma E responde a proteínas desnaturalizadas de la membrana externa de manera dependiente de DegS. Sin embargo, sigma E puede activarse de forma independiente de DegS a través de RseB. En presencia de señal se activa una cascada proteolítica que degrada RseA y se activa Sigma E. Sigma E regula la expresión de factores de la biogénesis de la envoltura. CpxA y Sigma E activan la expresión de DegP y de sus respectivos reguladores negativos periplasmáticos CpxP y RseB (Ruiz y Silhavy, 2005).

La activación de la vía Sigma E inicia cuando tres amino ácidos carboxi-terminales de las proteínas desnaturalizadas de la membrana externa interaccionan directamente con la proteasa DegS. Esta unión hace que DegS cambie la estructura de su centro activo y se una a la proteína de la membrana interna RseA, que es el factor antisigma que mantiene el factor sigma RpoE en la membrana interna. La degradación de RseA resulta en la liberación de RpoE al citoplasma, permitiendo que RpoE altere a nivel transcripcional para reparar el daño de la membrana externa (Kulp y Kuehn, 2011).

Existe un regulador adicional de la vía Sigma E. La proteína del periplasma RseB es un dímero que se une a RseA en el sitio de unión de DegS e impide la unión de DegS a RseA, actuando de inhibidor del sistema. Todavía no se conoce el mecanismo por el cual RseB se separa de RseA en la activación de Sigma E (**Kulp y Kuehn, 2011**). Podría ser que RseB respondiera a señales relacionadas con lípidos, porque estructuralmente es similar a las proteínas que se unen a lípidos (**Chaba et al., 2011**).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Los SSTT son fundamentales para la funcionalidad de la bacteria. Uno de los más estudiados es el SSTT Ysc-Yop que gracias al inyectorio permite la translocación de proteínas desde el citosol bacteriano al citosol de la célula huésped en un solo paso (**Cornelis et al., 2002**). La longitud de la aguja del inyectorio de los SSTT Ysc-Yop varía entre especies incluso entre cepas de la misma especie (**Journet et al., 2003; Kubori et al., 1998; Chakravorty et al., 2005**). Diversos estudios sugieren que la longitud de la aguja del inyectorio está regulada y adaptada a las otras estructuras de la membrana externa (**Journet et al., 2003; Minamino et al., 2005; Mota et al., 2005; West et al., 2005**). Una de estas estructuras de la membrana externa es el LPS. En nuestro grupo se han llevado a cabo estudios de la cadena O del LPS en *Y. enterocolitica* O:8 obteniendo datos relevantes que indican que la longitud de la cadena O está regulada por la temperatura siendo más larga a 21°C que a 37°C y que la cantidad de cadena O es mayor a 21°C que a 37°C (**Bengoechea et al., 2002**).

En esta Tesis Doctoral nos planteamos que la longitud de la cadena O está relacionada con la funcionalidad del SSTT Ysc-Yop. Para estudiar la siguiente hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- Construir mutantes con distintas longitudes de cadena O y que éstas pierdan la regulación típica por la temperatura. Estudiar el efecto de la longitud de la cadena O en el SSTT Ysc-Yop.
- Construir mutantes con un inyectorio más largo al de *Y. enterocolitica* O:8 y estudiar el efecto de las distintas longitudes de la cadena O sobre el SSTT Ysc-Yop.

Por otro lado, las bacterias gram-negativas poseen unos sistemas de estrés de membrana necesarios para mantener la integridad de la envoltura bacteriana (**Darwin et al., 2005**). El sistema Cpx es el encargado de detectar cambios en las estructuras de la membrana externa y de dar una respuesta regulando la expresión de los factores de plegamiento, proteasas y regulando la expresión de las estructuras de superficie (**Dorel et al., 2006., Vogt et al., 2010**). Dado que estudios previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que las modificaciones en el lípido A y en la cadena O de *Y. enterocolitica* O:8 activan éstos sistemas (**Bengoechea et al., 2002B; Pérez-Gutiérrez et al., 2010; Reinés et al., 2012B**), en este trabajo nos planteamos estudiar el papel del sistema de estrés de membrana Cpx en la regulación de los factores de

virulencia de *Y. enterocolitica* O:8. Por consiguiente, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Analizar las alteraciones del LPS que activan el sistema Cpx.
- Estudiar el papel de Cpx en la expresión de los principales sistemas reguladores.
- Evaluar el papel del Cpx en la regulación de los factores de virulencia y en la resistencia a PAs.

## **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 6, 7 y 8, respectivamente (Anexo I)

La presencia o ausencia del plásmido de virulencia pYV en las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 se determinó comprobando si las bacterias autoaglutinaban tras crecer en medio RPMI1640 sin rojo fenol (PAA Laboratorios) a 37°C (Laird et al., 1980). Las bacterias que poseen el pYV autoaglutinan debido a que expresan la proteína YadA.

### 1.1. Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *Y. enterocolitica* y de *E. coli* se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) o LB agar (LB con 1,5 % de agar bacteriológico), a 21°C (para *Yersinia*) o a 37°C. Los cultivos en medios líquidos se realizaron en agitación a 180 r.p.m. tanto a temperatura ambiente como a 37°C.

#### Medios de cultivo y composición

##### LB (Scharlau Microbiology)

Composición: 10 g peptona tríptica de caseína, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, por litro.

##### LB0

Composición: 10 g de peptona tríptica de caseína, 5 g extracto de levadura, 10 % de sacarosa por litro.

##### 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 % 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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Ampicilina (Ap): Utilizada a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$  en los cultivos de *E. coli*. En el caso de *Y. enterocolitica*, se usó a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$ , en los cultivos en medio líquido, y de 100  $\mu\text{g/ml}$ , en los cultivos en medio sólido.
- Kanamicina (Km): Utilizada a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$  en los cultivos de *E. coli*. En el caso de *Y. enterocolitica*, se usó a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$ , en los cultivos en medio líquido, y de 100  $\mu\text{g/ml}$ , en los cultivos en medio sólido.
- Cloranfenicol (Cm): Utilizado a una concentración final de 25  $\mu\text{g/ml}$ .
- Tetraciclina (Tet): Utilizada a una concentración final de 12,5  $\mu\text{g/ml}$ .
- Estreptomina (Str): Utilizada a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- Trimetropina (Tp): Utilizada a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- Carbenicilina (Cn): Utilizada a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- Gentamicina (Gm): Utilizada a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2. Técnicas de biología molecular.

Las técnicas de Biología Molecular empleadas en este trabajo se realizaron siguiendo protocolos ya descritos por Sambrook y colaboradores (**Sambrook et al., 1989**). El ADN plasmídico fue purificado usando kits comerciales (*QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit* y *Qiagen plasmid Midi Kit* de Qiagen, *Illustra<sup>™</sup> plasmidPrep Mini Spin Kit* de GE Healthcare). Las reacciones de PCR se realizaron empleando la enzima *GoTaq<sup>®</sup> Flexi* ADN polimerasa (Promega). En aquellos casos en los que fue necesaria una mayor

fidelidad se empleó la enzima *Vent* ADN polimerasa para obtener extremos romos (New England Biolabs) o *Takara Ex Taq*. para obtener extremos cohesivos (Laboratorios Conda). Para la purificación de ADN, en solución o a partir de geles de agarosa, se usaron kits comerciales (*QIAquick PCR Purification Kit* y *QIAEX II Gel Extraction Kit* de Qiagen, *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de GE Healthcare). Las enzimas de restricción del ADN (Promega o New England Biolabs), y las enzimas T4 ADN ligasa, T4 quinasa, T4 ADN polimerasa y el fragmento Klenow (New England Biolabs) se emplearon según las indicaciones del fabricante.

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

## **2.1 Caracterización rápida del ADN plasmídico a partir de colonia.**

Para comprobar la presencia de un plásmido en una bacteria se empleó el método descrito por Beuken y colaboradores (**Beuken et al., 1998**) que facilita la discriminación de plásmidos por su tamaño. Brevemente, se inoculó una colonia en 800  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo en un tubo tipo Eppendorf® y se cultivó 18 h en agitación (180 r.p.m.) a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Posteriormente, se tomó una alícuota del cultivo (300  $\mu\text{l}$ ) y las bacterias se recogieron mediante centrifugación (17500 x g, 5 min). El precipitado se resuspendió en 40  $\mu\text{l}$  de reactivo de tinción (0.1 % azul de bromofenol, 6% sacarosa) a los que se añadieron 14  $\mu\text{l}$  de una mezcla fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1). Las bacterias se lisaron mediante agitación empleando un agitador tipo vórtex. Las muestras se volvieron a centrifugar (17500 x g, 10 min) con el fin de separar la fase acuosa de la fase orgánica. Finalmente se cargaron 10  $\mu\text{l}$  de la fase acuosa (superior) en un gel de agarosa al 1 % 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.

### 2.2.1 Transformación química con cloruro cálcico.

Este método se usó para generar cepas de *E. coli* competentes para ser transformadas con ADN plasmídico. Para ello, 250 ml de medio LB se inocularon con 5 ml de un cultivo de *E. coli* en fase estacionaria crecido en LB (180 r.p.m., 16 h, 37°C). Este cultivo se incubó a 37°C con agitación (180 r.p.m.) hasta que se alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.4-0.6. Al llegar a la DO deseada, los matraces de cultivo se enfriaron en hielo picado durante 10 min y, posteriormente, se recuperaron las células por centrifugación (2000 x g, 5 min, 4°C). Las células se resuspendieron en 60 ml de MgCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Se volvieron a recuperar las células por centrifugación (2000 x g, 5 min, 4°C) y se resuspendieron con 60 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Las células se incubaron en hielo picado durante 20 min antes de ser recogidas de nuevo por centrifugación (1100 x g, 5 min, 4°C). Las células se resuspendieron en 12 ml de una solución 86 mM CaCl<sub>2</sub>-12,3 % glicerol. Seguidamente, se distribuyeron en alícuotas de 200  $\mu$ l en tubos tipo Eppendorf® fríos, que se congelaron rápidamente a -80°C.

La transformación de las células competentes de *E. coli* así preparadas se realizó siguiendo un protocolo de choque térmico. Para ello se descongeló en hielo una alícuota de células competentes, a la que posteriormente se añadió el ADN plasmídico o el producto de la reacción de ligación con el que se deseaba transformar. Luego, la mezcla se incubó en hielo durante 30 min y, a continuación, fue sometida a un choque térmico de 90 seg a 42°C en un baño termostático. Seguidamente, se mantuvo en hielo durante 2 min y se añadieron 800  $\mu$ l de medio LB, previamente atemperado a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 h, en agitación (180 r.p.m.). Finalmente, las bacterias se plaquearon en placas de LB agar que contenían los antibióticos apropiados para la selección de transformantes, y se incubaron a la temperatura adecuada durante 18-24 h (Hanahan et al., 1983).

### 2.2.2 Conjugación en medio sólido.

Los plásmidos pBAD, pGPL01Tp, pKNG101, pRV1, pPROBE-gfp[LVA] y PTM100 que contienen la región *mob* se introdujeron en *Y. enterocolitica* O:8 mediante conjugación, biparental o triparental. Esta última se empleó en aquellos casos en los que la cepa donadora de *E. coli* no expresaba la región *tra*. La cepa *E.*

*coli* HB101 o *Helper* transformada con el plásmido pRK2013, confiere las funciones de transferencia y la formación del *pili* conjugativo en las conjugaciones triparentales. Las cepas donadoras se cultivaron en LB a 37°C sin agitación y la cepa receptora (*Y. enterocolitica* O:8) en LB a 21°C con agitación durante 16 h. Las bacterias se recogieron por centrifugación (2000 x g, 20 min, 4°C), se lavaron 3 veces con 5 ml de una solución 10 mM MgSO<sub>4</sub> y se resuspendieron en 500 µl de 10 mM MgSO<sub>4</sub>. 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 o *Helper* se plaqueó en primer lugar, en segundo lugar la cepa donadora y por último, la cepa receptora de *Y. enterocolitica* que siempre fue la última en plaquearse. Tras incubar las placas durante 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.

### **2.2.3 Transformación por electroporación.**

En el caso en de los plásmidos pKNOCK, pLM21 y PKOBEG-sacB que no son conjugables, la transferencia genética se realizó por electroporación.

Para preparar las células electrocompetentes de *Y. enterocolitica* se siguió el protocolo descrito por Sharma con algunas modificaciones (**Sharma et al., 1996**). Brevemente, se cultivaron las bacterias durante 16 h en 5 ml de medio YENB en agitación (180 r.p.m.) y a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Al día siguiente, se refrescaron 500 µl del cultivo en 4,5 ml de medio YENB hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,5-0,9. A continuación, se centrifugaron los cultivos (4000 x g, 10 min. y 4°C de temperatura). Las células se lavaron dos veces con 10 ml de agua fría. A continuación, se resuspendió el precipitado con 5 ml de glicerol al 10 % frío y se centrifugó. Tras la última centrifugación, los precipitados se resuspendieron en 500 µl de glicerol al 10 % frío. Para cada electroporación, se mezclaron 40 µl de células electrocompetentes junto con el ADN con el que se pretende transformar la bacteria. 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 $\mu\text{F}$
Resistencia:	200 $\Omega$
Voltaje de descarga:	2,5 kV
Fuerza del campo eléctrico aplicado:	10-20 kV/cm
Duración del pulso:	~ 5 ms

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

### 3. Construcción de plásmidos y cepas.

#### 3.1. Construcción del mutante *Wzzpstb* mediante mutagénesis dirigida por recombinación en un punto.

Se amplificó por PCR un fragmento interno de 540 pb del gen *wzz* empleando como molde ADN genómico de la cepa silvestre *Y. pseudotuberculosis* (O1B), polimerasa Taq (Promega) y los cebadores IntWzzpstbF y IntWzzpstbR (Anexo I, Tabla 5). El fragmento amplificado se purificó de un gel de agarosa y se clonó en el vector pGEM-T<sup>®</sup> Easy (Promega) para obtener pGEM-TIntWzzpstb. Posteriormente, el inserto se obtuvo por digestión con el enzima *PvuII* y se clonó en el vector suicida pKNOCK-Km para obtener pKNOCK-IntWzzpstb. A continuación, el plásmido pKNOCK-IntWzzpstb se transformó en *E. coli* C600. La presencia del plásmido se confirmó por digestión con el enzima de restricción *ecoRI*.

El plásmido pKNOCK-IntWzzpstb se electroporó a la cepa *Y. pseudotuberculosis* (O1B) y por recombinación homóloga se obtuvo el mutante wzzpstb.

Los mutantes se seleccionaron por su resistencia a Kanamicina. A continuación, se extrajo el LPS y se analizó mediante un gel SDS-PAGE seguido de tinción con el kit comercial *Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Stain Kit (P20495)* de INVITROGEN siguiendo las instrucciones del fabricante para visualizar el efecto de la mutación.

### **3.2. Construcción de los mutantes YeO8 $\Delta$ YscP y YeO8 $\Delta$ wzz $\Delta$ YscP mediante mutagénesis dirigida por doble recombinación homóloga.**

#### **3.2.1. Construcción del vector suicida pKNG101 $\Delta$ YscP.**

En primer lugar, se amplificaron mediante PCR los fragmentos correspondientes a ambos extremos del gen a mutar, utilizando como molde el ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *GoTaq<sup>®</sup> Flexi* y las parejas de cebadores denominadas YeO8YscPUPF1/ YeO8YscPUPR1 y YeO8YscPDPoWNF1/ YeO8YscPDONWR1 (Anexo I, Tabla 5). Los cebadores DownF y UpR incluyen en su extremo 5' la diana de restricción para el enzima de restricción *BamHI*. Los dos fragmentos de PCR obtenidos para la construcción del mutante, son complementarios en sus extremos 5' gracias a esta diana.

A continuación, se purificaron ambos fragmentos a partir de un gel de agarosa y se realizó una PCR de polimerización empleando la polimerasa *GoTaq<sup>®</sup> Flexi* para unir ambos fragmentos, sin los cebadores. El fragmento de ADN obtenido a partir de la reacción de polimerización se usó como molde para una reacción de PCR empleando la polimerasa *GoTaq<sup>®</sup> Flexi* y los cebadores YeO8YscPUPF1 y YeO8YscPDONWR1. El fragmento de PCR obtenido, de un tamaño de 1719 pb, se clonó en el vector pGEM-T<sup>®</sup> Easy (Promega), generándose pGEMT $\Delta$ YscP.

El plásmido pGEMT $\Delta$ YscP se digirió con *PvuII* y el fragmento, de 2171 pb, se purificó de un gel de agarosa. Este fragmento se clonó en el vector suicida pKNG101 digerido con *SmaI* obteniéndose pKNG101 $\Delta$ YscP. Dicho vector se transformó en *E. coli* CC118- $\lambda$ pir.

### **3.2.2. Obtención de mutantes por doble recombinación homóloga.**

El vector pKNG101 es un plásmido conjugativo que contiene un origen de replicación R6K, resistente a Streptomina y que posee el gen *sacB* que confiere sensibilidad a la sacarosa (Kaniga et al., 1991). Este plásmido no puede replicar en *Yersinia* ya que éste género bacteriano no expresa la proteína Pi necesaria para la replicación del mismo. Por consiguiente, la única manera de obtener bacterias resistentes a la estreptomina 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 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 y al mutante YeO8 $\Delta$ wzz, 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 (Oxid) con 100  $\mu$ g/ml de Str. Obteniendo de esta manera los merodiploides YeO8::pKNG101YscP y YeO8 $\Delta$ wzz::pKNG101YscP.

Los merodiploides se crecieron en LB a 21°C con agitación durante 16 h y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en LB0 (Apartado 1). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 días. Se seleccionaron aquellas colonias que no crecían en Str pero si en LB agar. La sustitución del alelo silvestre por el mutado se comprobó mediante PCR. Además se comprobó que los mutantes no habían perdido el plásmido de virulencia analizando su autoaglutinación.

### **3.3. Reemplazo de genes mediante recombinación homóloga entre el gen cromosomal y su copia linear (*vir*FFLAG).**

La metodología se basa en la expresión del operón red $\gamma$  $\beta$  $\alpha$  del fago  $\lambda$  codificado en el plásmido pKOBEG usado para promover la recombinación entre la región



cromosomal de interés y la secuencia de ADN lineal, fruto de la reacción de la polimerasa, de secuencia homóloga a la secuencia cromosomal pero marcada con el epítipo FLAG para su posterior detección.

El vector pKOBEG es un plásmido que contiene el operón  $red\gamma\beta\alpha$  del fago  $\lambda$  cuya expresión está controlada por el promotor pBAD inducible con L-arabinosa. El gen *cat*, le confiere resistencia a Cloranfenicol (**Chaverоче et al., 2000**). En el caso de *Yersinia* el plásmido pKOBEG no es termosensible por este motivo se utiliza el derivado pKOBEG-sacB (**Derbise et al., 2003**). El gen *sacB* facilita la selección de aquellas bacterias que hayan perdido el plásmido tras la recombinación homóloga. La enzima sacB hidroliza la sacarosa, lo que genera compuestos tóxicos para bacterias Gram negativas. Por tanto, la pérdida del vector es necesaria para el crecimiento de *Y. enterocolitica* O:8 en presencia de sacarosa.

En primer lugar, se amplificó mediante PCR el fragmento *virFFLAG*, utilizando como molde el ADN del plásmido pSUB11 (**Uzzau et al., 2001**), la polimerasa *GoTaq® Flexi* y las parejas de cebadores denominadas *virFFLAGfw* / *virFFLAGrv*. Las cepas de *Yersinia* que contenían el plásmido pKOBEG-sacB, obtenidas por electroporación, se cultivaron en LB con cloramfenicol a 28°C durante 16 horas. Al día siguiente se refrescó 1 ml del cultivo en 90 ml de medio YENB. La expresión del operón  $red\gamma\beta\alpha$  del fago  $\lambda$  tiene que ser inducida añadiendo 0.2% L-arabinosa al medio durante 2-4 h. A continuación, las bacterias se hicieron competentes siguiendo el método descrito anteriormente. Se electroporaron aproximadamente 1  $\mu$ g del fragmento lineal de PCR *virFFLAG*. Las bacterias electroporadas se transfirieron a 1 ml LB durante 1h 30min a 28°C y la selección se llevó a cabo en placas de LB agar con kanamicina. Después de la selección primaria, los mutantes se cultivaron en placas de LB agar sin NaCl y con un 10% de sacarosa para eliminar el plásmido pKOBEG-sacB. Los mutantes se confirmaron por PCR para comprobar que el fragmento estaba correctamente insertado con los cebadores *VirFcheckF1* / *VirFcheckR1* (**Derbise et al., 2003**).

### 3.4. Construcción del plásmido pLM21O8.

El gen *yscP* se amplificó mediante PCR utilizando como molde ADN de *Y. enterocolitica* O:8 8081, la polimerasa *Vent* y el par de cebadores YscPOF1/YscPOR1 (Tabla 5, Anexo I). El fragmento obtenido de PCR (1,4 kb) se purificó a partir de un gel de agarosa, se digirió con *XhoI* y *NdeI*, y se clonó en el plásmido pLM21 (Wagner et al., 2010) digerido con los mismos enzimas de restricción, obteniéndose el plásmido pLM21O8. Dicho plásmido se electroporó en *E.coli* DH5 $\alpha$ - $\lambda$ pir y se introdujo en las cepas YeO8 $\Delta$ *YscP*, YeO8 $\Delta$ *wzz-YscP*, YeO8 $\Delta$ *wzz-YscP*/pBADwzzYe, YeO8 $\Delta$ *wzz-YscP*/pBADwzzYp y YeO8 $\Delta$ *wzz-YscP*/pBAD33wzzH3 por electroporación.

### 4. Construcción de las fusiones transcripcionales *lucFF* y *gfp*.

Las regiones promotoras de los genes *cpxP*, *mgta*, *inv*, *clpXP*, *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 descritas en la (Tabla 5, Anexo I). Los fragmentos obtenidos (600 pb para la región promotora de *cpxP*, 840 pb para la región promotora de *mgta*, 923 pb para la región promotora de *inv*, 603 pb para la región promotora de *clpXP*, 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 *EcoRI* y se clonaron en el plásmido pGPL01Tp (Reinés et al., 2012B) y/o pPROBE'-gfp[LVA]Tp (Tomàs et al.,) digeridos con *EcoRI* y *SmaI* (Tabla 8, Anexo I).

pGPL01Tp es un derivado del plásmido pGPL01 (Gunn et al., 1996) en el que se clonó un casete que confiere resistencia a trimetropina, obtenido mediante digestión con *PstI* del plasposón p34S-Tp (Dennis et al., 1998.), en el sitio *PstI* del gen de la  $\beta$ -lactamasa de pGPL01 (Tabla 8, Anexo I). pGPL01Tp confiere únicamente resistencia a trimetropina. Este vector contiene el gen de la luciferasa sin su propio promotor y el origen de replicación R6K. Al construir las fusiones transcripcionales, el gen de la luciferasa queda bajo el control de los promotores de YeO8. Los diferentes plásmidos se transformaron químicamente en *E.coli* DH5 $\alpha$ - $\lambda$ pir. Para introducir las fusiones

transcripcionales en YeO8 se realizó mediante conjugación triparental (véase apartado 2.2.3). Finalmente, se comprobó mediante PCR (Anexo I, Tabla 5) la correcta inserción de los vectores mediante recombinación homóloga.

pPROBE<sup>7</sup>-gfp[LVA]Tp es un derivado del plásmido pPROBE-gfp[LVA] (Miller et al., 2010) con un casete de Tp. El casete de Tp se obtuvo mediante digestión con SmaI del plásmido p34S-Tp (Dennis et al., 1998) y se clonó en el vector pPROBE-gfp[LVA] digerido con SphI y los extremos hechos romos con el fragmento Klenow. Confiere resistencia a la trimetropina. La expresión de GFP queda bajo el control de los promotores de *Yersinia*. La GFP producida tiene un tiempo de vida media de 40 min lo que permite la realización de estudios de transcripción empleando GFP como proteína indicadora.

#### 4.1. Medida de la actividad luciferasa.

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

#### 4.2. Medida de la fluorescencia.

La expresión de los genes *virF*, *YopE* se analizó en cepas portadoras del plásmido con la fusión transcripcional entre la región promotora de dichos operones/genes y el gen *gfp*. Las cepas indicadoras se cultivaron en LB durante 16 h con agitación, a 37°C. Los cultivos se refrescaron a 21°C y a 37°C y se dejaron crecer

hasta alcanzar una densidad óptica DO<sub>540</sub> de 1.2. Las células se recogieron mediante centrifugación (2.000 x g, 20 min, 15°C) y se resuspendieron en PBS a una DO<sub>540</sub> de 0.6. Se transfirieron 800 µl 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 un 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]Tp se sustrajeron a las medidas obtenidas con los plásmidos que contenían las fusiones transcripcionales.

## **5. Ensayos de resistencia frente a péptidos antimicrobianos.**

### **5.1 Ensayos de supervivencia.**

Para los ensayos de supervivencia las bacterias se cultivaron a 21°C en un caldo de 5 ml de LB durante toda la noche. Al día siguiente los cultivos se diluyeron 1:10 y se incubaron (a 21°C o a 37°C) y se recogieron por centrifugación (2000 x g, 20 min, 24°C) tras alcanzar su fase de crecimiento exponencial (OD<sub>540</sub> 0.8). Las células se lavaron una vez con PBS y se preparó una suspensión bacteriana de 1x10<sup>5</sup> ufc/ml en PBS 10 mM (pH 6.5), 1 % TSB (Oxoid), y NaCl 100 mM.

Se preparó una batería de tubos tipo Eppendorf® con 25 µl de diferentes concentraciones (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml) de péptido antimicrobiano, polimixina B y se añadieron a cada uno de los tubos 5 µl de la suspensión bacteriana anteriormente preparada. En todos los casos el volumen final fue de 30 µl. Los tubos se incubaron durante 1 h a la temperatura de crecimiento de las bacterias y, transcurrido este tiempo, se plaqueó todo el contenido de los tubos en placas de LB agar que se incubaron a temperatura ambiente. A los dos días se contaron las colonias y los resultados fueron expresados como porcentajes con respecto al número de colonias de las bacterias no expuestas al agente antimicrobiano. El 50 % de la concentración inhibitoria de cada péptido antimicrobiano (IC<sub>50</sub>) fue definido como la concentración que producía una reducción del 50 % del número de colonias, comparando siempre con las bacterias no expuestas al péptido. Los

experimentos se realizaron por duplicado en al menos cuatro ocasiones independientes.

## **5.2 Ensayos de difusión radial.**

La actividad antimicrobiana de la polimixina B fue determinada siguiendo el método de difusión radial descrito por Lehrer y colaboradores con pequeñas modificaciones **(Lehrer et al., 1991)**

Brevemente, las bacterias se cultivaron en LB a 21°C y a 37°C durante toda la noche, se recogieron por centrifugación (2000 x g, 20 min, 24°C) y se resuspendieron en PBS a una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/ml. Por otro lado, se preparó un gel con 1 % de agarosa (SeaKem LE agarose; FMC, Rockland, ME) en 2 mM HEPES (pH 7,2) y 0,3 mg/ml de TSB que se atemperó a 50°C. Se inocularon 180 µl de la suspensión bacteriana en 30 ml de gel que se añadieron a una placa de Petri cuadrada (10 cm x 10 cm). Una vez polimerizado el gel, se excavaron unos pocillos de unos 10 µl de capacidad a los que se añadieron 10 µl de distintas concentraciones de los diferentes péptidos. La placa se incubó durante 3 h a la temperatura de crecimiento de las bacterias. A continuación, se preparó un segundo gel con 1 % agarosa y 6 % TSB que se vertió sobre el gel anterior (un volumen final de 30 ml). La placa se incubó durante toda la noche a la temperatura de crecimiento de las bacterias. Al día siguiente se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento y se expresó como unidades de difusión según la siguiente relación: 10 unidades = 1 mm. Los coeficientes de correlación y la concentración mínima inhibitoria (intersección con el eje X) se determinaron a partir de la curva de regresión donde el eje X corresponde al  $\log_{10}$  de la concentración de péptido antimicrobiano y el eje Y a las unidades de difusión.

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

## **6. Extracción de LPS y análisis mediante SDS-PAGE.**

Para realizar la extracción de LPS se cultivó la bacteria en 10 ml de LB con el antibiótico correspondiente durante 16 horas a 21°C. Pasado este tiempo, se diluyó el

cultivo 1:10 y se incubó durante 2.5 horas. A continuación, se centrifugó el cultivo (4000 r.p.m., 20 min) y se resuspendió el pellet en PBS hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 1,5. Se transfirieron 1,5 ml a un tubo Eppendorf y se centrifugó (13000 r.p.m., 3 min). A continuación, se resuspendió en 80 µl de solución de lisis (2 % SDS, 4 % β-mercaptoetanol, 0.5M Tris-HCl [pH 6.8]) y se hirvió a 95°C durante 10 minutos. Se dejó enfriar 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió 10 µl de la solución proteinasa K (20 mg/ml) para digerir las proteínas y se incubó a 60°C durante 1h. Se añadieron 150 µl de fenol caliente (70°C) y se incubó a 70°C durante 15 min, vortexando cada 5 min. Seguidamente se pusieron en hielo 10 min, para facilitar la separación de la fase acuosa del fenol, y se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 min. Se transfirieron 100 µl de la fase acuosa en un tubo nuevo y se extrajeron los restos de fenol con 10 volúmenes de etanol mediante agitación. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Por último, se secó el precipitado y 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]) Las muestras se congelaron a -20°C hasta su análisis mediante SDS-PAGE seguido de tinción del LPS mediante el kit comercial *Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Satin Kit (P20495)* de INVITROGEN siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **7. Secreción de proteínas Yops.**

Para analizar la secreción de Yops, las bacterias se cultivaron en LB a 21°C durante 16 h. A continuación, el cultivo se diluyó 1:50 en 25 ml de medio TSB<sub>OX</sub> en matraces de 100 ml de capacidad. El cultivo se creció durante 3 h a 21°C con agitación (180 r.p.m.). Transcurrido este tiempo, el cultivo se transfirió a 37°C y se continuó la incubación en agitación (180 r.p.m) durante 3h más. Al finalizar este período, se midió la DO<sub>540</sub> 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.

Para el análisis electroforético de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS se utilizó el equipo MINI-PROTEAN IITM de Bio-Rad. Se empleó un gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS con un gradiente del 4 % (gel de compactación) al 12 % (gel de resolución). Se cargaron 20 µl por pocillo de las muestras previamente hervidas durante 5-10 min a 100°C, para su desnaturalización. La electroforesis se realizó en tampón de carrera 1X (Tampón 10X: 0,25 M Trizma base, 1,9 M glicina, 1 % SDS) aplicando un voltaje de 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.

## **8. Expresión de la proteína YadA.**

Las bacterias se cultivaron en 2 ml de RPMI sin el indicador de pH rojo fenol (PAA Laboratories) a 37°C sin agitación durante toda la noche. A continuación, se midió la DO<sub>540</sub> alcanzada por los cultivos y se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de ufc por ml. En un tubo tipo Eppendorf<sup>®</sup>, se centrifugó 1 ml de cultivo (16000 x g, 10 min, 4°C) y las bacterias se resuspendieron en 200 µl de solución de carga 1X (10 % glicerol, 2,5 % β-mercaptoetanol, 1 % SDS, 0,01 % azul de

bromofenol en 62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8]). Las muestras se incubaron durante 4 horas a 37°C y, posteriormente, se congelaron a -20°C hasta su análisis mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 7, aunque las muestras no se hirvieron.

## **9. Citotoxicidad en células A549.**

Para realizar el ensayo de citotoxicidad en células A549, éstas se cultivaron en placa de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) con cubreobjetos y con medio RPMI 1640 (LabClinics) complementado con 1 % de HEPES y 10 % de STF. Al alcanzar una confluencia del 70%, las células se infectaron con diferentes cepas de *Y. enterocolitica* y de *Y. pseudotuberculosis* con una multiplicidad de infección 25:1 durante 1 h. A continuación, las células se lavaron dos veces con 500 µl de PBS y se añadieron 300 µl de una solución de PFA para fijar las células. Tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente, se lavó con 500 µl de PBS tres veces. A continuación, se añadió 1 ml de PBS con 14 µl de NH<sub>4</sub>Cl a 4°C durante 16 horas para neutralizar los aldehídos libres.

Se realizó la tinción de las células con Hoechst 33342 (Invitrogen) para visualizar el núcleo de la célula y Faloidina verde para el citoesqueleto. Las tinciones se realizaron en un volumen de 40 µl de PBS con 10 % de suero de caballo, 0,1 % de saponina, Hoechst 1:2500 y Faloidina verde 1:100. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0,1 %, una vez con PBS y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad 30 minutos. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS-saponina 0,1 %, una vez con PBS y otra con agua. Se secaron cuidadosamente los cubreobjetos y se fijaron con una gota de Prolong Gold antifade mounting gel (Invitrogen) en el porta.

Se observaron los cubres mediante microscopía de fluorescencia y se realizaron fotos de varios campos representativos. El experimento se realizó por triplicado en tres ocasiones independientes.



## **10. Adhesión e invasión a células A549.**

Para realizar estos ensayos, las células A549 se cultivaron 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 70 %, las células se infectaron con diferentes cepas de *Y. enterocolitica* y de *Y. pseudotuberculosis* con una multiplicidad de infección 25:1 durante 1 h.

Adhesión, las células se lavaron 5 veces con 500 µl de PBS y se añadieron 300 µl de una solución de saponina 0,5 % para lisar las células. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se plaquearon las diluciones en placas de LB agar.

Invasión, las células se lavaron 2 veces con 500 µl de PBS y se añadieron 500 µl de medio RPMI 1640 con Gentamicina 100 µg/ml durante 90 minutos de incubación adicionales. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se añadió una solución de saponina 0,5 % para lisarlas. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se plaquearon diluciones seriadas en placas de LB agar.

El experimento se realizó tres veces por triplicado.

## **11. Translocación de la proteína YopE al citosol de las células A549.**

Para analizar la translocación de la proteína YopE al citosol de células A549, éstas se cultivaron en placa de 12 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* y de *Y. pseudotuberculosis* con una multiplicidad de infección 25:1. Se centrifugó la placa (200 x g durante 5 minutos) y se incubó durante 1 hora.

A continuación, las células se lavaron dos veces con 500 µl de PBS y se añadieron 400 µl PBS. Mediante un *Scraper* se recogieron las células en tubos tipo Eppendorf®. Seguidamente se centrifugaron las células (14.000 r.p.m. durante 12 segundos). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 100 µl de una solución de digitonina al 1 % e inhibidor de proteasas 1X en PBS. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron (14000 r.p.m., 10 min, 4°C) y se recogieron 80 µl del sobrenadante, a los que se añadieron 20 µl de solución de carga 5X (50 % glicerol, 12,5 % β-mercaptoetanol, 5 % SDS, 0,05 % azul de bromofenol en 312,5 mM Tris-HCl [pH 6,8]). El precipitado se resuspendió con 100 µl de solución de carga 1X (10 % glicerol, 2,5 % β-mercaptoetanol, 1 % SDS, 0,01 % azul de bromofenol en 62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8]).

Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) y Western Blot usando anticuerpo de conejo anti- YopE.

### **11.1. Western Blot.**

El análisis electroforético de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 7.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana usando un sistema de transferencia semihúmedo (TRANS-BLOT® SD SemiDry Transfer Cell de Bio-Rad) y aplicando un voltaje de 10 V durante 35 min. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 0,45 mm de poro (Whatman® PROTRAN®). En el caso del análisis de las proteínas de membrana se utilizó el Buffer V de transferencia: mezcla 1:1 de SDS running buffer 1X (Tris 12 mM, glicina 96 mM, SDS 0,1 %) y de buffer de lisis con urea (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, 1 % beta-mercaptoentanol (v/v), SDS 1 %, urea 6M) (Abeyrathne et al., 2007, Heesemann et al., 1986).

La eficiencia de la transferencia se controló rutinariamente tiñendo la membrana con una solución comercial de *Ponceau S* (Sigma), que se eliminó con tampón de lavado (0,1 % Tween-20 en TBS 1x del inglés “Tris-buffered saline” compuesto por Tris 20 mM y NaCl 140 mM, ajustando el pH a 7,6 con HCl). La membrana se bloqueó durante 3 h a temperatura ambiente empleando el tampón de bloqueo (4 % de leche en

polvo desnatada en una solución 0.1% Tween-20 en TBS 1x). A continuación, se incubó la membrana durante 18 h a 4°C y agitación con el anticuerpo primario. Para la detección de 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, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (1 h, temperatura ambiente, en agitación). Para la detección de YopE, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Stabilized Goat Anti-Rabbit HRP-Conjugated, PIERCE), diluido 1:1000 en tampón de bloqueo (1 h, temperatura ambiente, en agitación). Antes del revelado, la membrana se lavó dos veces con tampón de lavado (15 min, temperatura ambiente, en agitación). El revelado se realizó incubando la membrana con el reactivo del kit *SuperSignal West-Dura* de PIERCE siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron y procesaron con el sistema de análisis de quimioluminiscencia *GeneGenome HR* de Syngene.

## **12. Adhesión a colágeno humano.**

El día anterior al experimento, se prepararon placas de 24 pocillos con cubreobjetos a las que se les añadió 100 µl de solución de colágeno (10 µg/ml) en PBS, y se mantuvieron a 4°C. En paralelo, se pusieron los cultivos bacterianos en 5 ml de LB durante 16 horas a 37°C.

El día del experimento, se lavaron las placas con TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y se bloquearon con 150 µL de una solución al 2% de BSA en TBS durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se lavaron con 500 µl de TBS 3 veces.

Además, los cultivos bacterianos se diluyeron 1:10 en 5 ml de LB durante 2,5 horas a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron y se ajustaron a  $10^8$  bacterias/ml en PBS. Las placas de colágeno se inocularon con 100 µl de bacterias durante 1h a 37°C. Se usaron 100 µl de PBS como control sin infección. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas 3 veces con 500 µl de TBS y se fijaron con 300 µl de solución al 4 % de Paraformaldehído. Tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente, se lavaron

las placas con 500  $\mu$ l de PBS tres veces. A continuación, se añadió 1 ml de PBS con 14  $\mu$ l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 4°C durante 16 horas para neutralizar los aldehídos libres.

Se realizó la tinción de las células con Hoechst 33342 (Invitrogen) para visualizar el ADN de las bacterias. Las tinciones se realizaron en un volumen de 40  $\mu$ l de PBS con 10 % de suero de caballo, 0,1 % de saponina, Hoechst 1:2500. Los cubreobjetos se sumergieron dos veces en una solución de PBS-saponina 0.1 %, una vez en PBS y se incubaron en una cámara húmeda en oscuridad 30 minutos. A continuación, los cubreobjetos se sumergieron dos veces en PBS-saponina 0.1 %, una vez en PBS y otra en agua. Se secaron cuidadosamente los cubreobjetos y se fijaron con una gota de Prolong Gold antifade mounting gel (Invitrogen) en el portaobjetos.

Se observaron los cubreobjetos mediante microscopía de fluorescencia y se realizaron fotografías de cuatro campos representativos. Para la cuantificación se contaron las bacterias adheridas de los 4 campos representativos a 100 aumentos y se hizo el sumatorio, obteniendo un valor total para cada cubreobjetos. El 100 % de adhesión se consideró que era la media del sumatorio de cuatro cubreobjetos de la cepa silvestre. Las otras cepas se representaron en función del % de adhesión respecto a la cepa silvestre. El experimento se realizó por triplicado.

### **13. Adhesión a macrófagos THP-1.**

Para realizar el ensayo de adhesión a macrófagos THP-1, éstos se cultivaron en placa de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) en medio RPMI 1640 (LabClinics) complementado con 1 % de HEPES y 10 % de STF. Para diferenciar los monocitos a macrófagos se añadieron 10 ng/ml de PMA al medio 16 h antes del experimento.

Al día siguiente, los cultivos bacterianos se diluyeron 1:10 en 5ml de LB durante 2,5 horas (1.5 h a 21°C y 1 h a 37°C para fomentar la producción de las proteínas efectoras). Posteriormente, se centrifugaron y se ajustaron a  $10^8$  bacterias/ml en PBS y las células se infectaron con diferentes cepas de *Y. enterocolitica* y de *Y. pseudotuberculosis* con una multiplicidad de infección 20:1, se centrifugó (200 x g, 5 min) y se incubaron durante 30 minutos.

A continuación, las células se lavaron 5 veces con 500 µl de PBS y se añadieron 300 µl de una solución de saponina 0,5 % en PBS para lisar las células. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se plaquearon diluciones seriadas en placas de LB agar.

#### **14. Secreción de LDH por macrófagos THP-1.**

La secreción de lactato deshidrogenasa se utiliza como medida de evaluación del daño celular producido por la bacteria a la célula.

Para realizar el ensayo de secreción de LDH en macrófagos THP1, éstos se cultivaron en placa de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) en medio RPMI 1640 (LabClinics) complementado con 1 % de HEPES y 10 % de STF. Para diferenciar los monocitos a macrófagos se añadieron 10 ng/ml de PMA al medio 16 h antes del experimento.

Las células se infectaron durante 1 hora con diferentes cepas de *Y. enterocolitica* con una multiplicidad de infección 20:1 y se centrifugó la placa a (400 x g, 5 min). Pasado el tiempo de infección se lavó la placa con PBS y se añadió 500 µl de RPMI 1640 complementado con Gentamicina 100 µg/ml durante 4 horas. Se recogió el sobrenadante del pocillo, se pasó a un tubo Eppendorf y se centrifugó (14000 x g, 1 min). Se recogieron 200 µl del sobrenadante y se congelaron a -80°C.

Se midió la cantidad de LDH liberada por los macrófagos al medio empleando el kit comercial *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* de Promega ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

#### **15. Fagocitosis en macrófagos THP-1.**

Para realizar el ensayo de fagocitosis con macrófagos THP-1, éstos se cultivaron en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Inc.) en medio RPMI 1640 (LabClinics) complementado con 1 % de HEPES y 10 % de STF. Para diferenciar los monocitos a macrófagos se añadieron 10 ng/ml de PMA al medio 16 h antes del experimento.

Al día siguiente, los cultivos bacterianos se diluyeron 1:10 en 5 ml de LB durante 2,5 horas (1.5 h a 21°C y 1 h a 37°C para fomentar la producción de las proteínas efectoras). Posteriormente, se centrifugaron y se ajustaron a  $10^8$  bacterias/ml en PBS y las células se infectaron con diferentes cepas de *Y. enterocolitica* y de *Y. pseudotuberculosis* con una multiplicidad de infección 20:1, se centrifugó (200 x g, 5 min) y se incubaron durante 30 minutos.

A continuación, las células se lavaron 2 veces con 500 µl de PBS y se añadieron 500 µl de medio RPMI 1640 sin antibiótico complementado con Gentamicina 100 µg/ml durante 90 minutos. A continuación, se lavó 2 veces con PBS y se añadió una solución de saponina 0.5 % para lisar las células. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se plaquearon las diluciones en placas de LB agar.

## 16. Ensayo de movilidad.

Las bacterias se cultivaron 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 movilidad del género *Yersinia* spp. (Axler-DiPerte et al., 2009, Niléhn et al., 1969, Nummala et al., 1995). Las placas se inocularon con 2 µl de los cultivos bacterianos. Tras dejar las placas incubando durante 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.

## 17. Cuantificación de la cantidad de proteína FlhDC y VirF.

Para analizar la cantidad de proteína flhDC producida por las bacterias, éstas se cultivaron en LB a 21°C durante 16 h. Al día siguiente, los cultivos se refrescaron a 21°C para las cepas flhDC y a 37°C para las cepas virF, hasta que los cultivos alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0,9-1. Se centrifugaron 3,5 ml del cultivo y se resuspendieron en 200 µl de solución de carga 1X (10 % glicerol, 2,5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 % SDS, 0,01 % azul de bromofenol en 62,5 mM Tris- HCl [pH

6,8]). Posteriormente, se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis mediante SDS-PAGE y western blot. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 7.

Para la detección del epítipo FLAG se utilizó un anticuerpo de ratón anti-flag comercial (Sigma), diluido 1:2000. Para la detección del epítipo FLAG, se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Stabilized Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Thermo Scientific), diluido 1:1000 en tampón de bloqueo (4 % de leche en polvo desnatada en una solución 0,1 % Tween-20 en TBS 1x). Según el protocolo descrito en el apartado 11.1.

## **18. 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 a 0,05.





## **RESULTADOS**

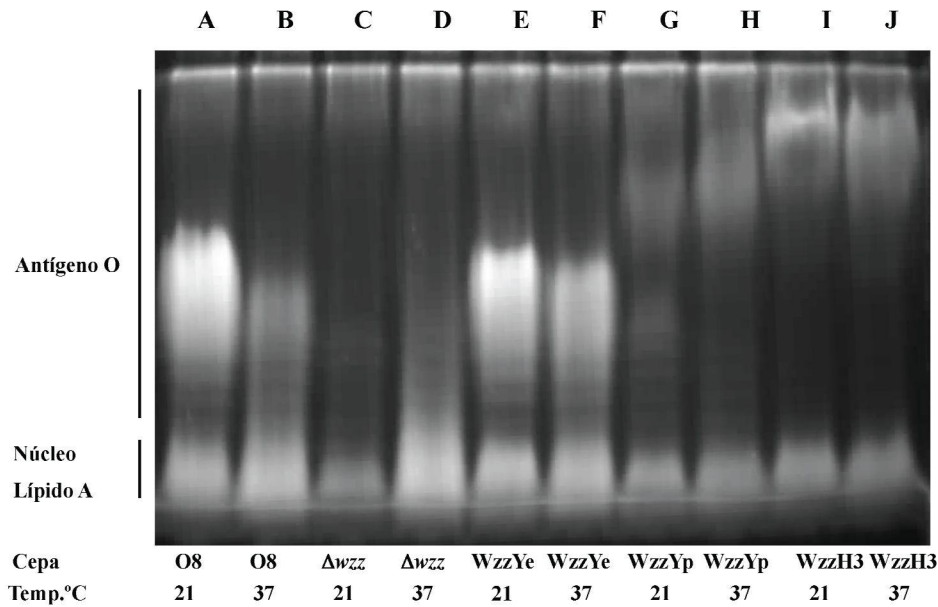


# 1. Estudio de la relación entre la longitud de la cadena O del lipopolisacárido y la función de los sistemas tipo III de secreción.

## 1.1. Generación de cepas con diferente longitud de cadena O.

La proteína Wzz es la única encargada de regular la longitud de la cadena O del LPS. Cada Wzz confiere una longitud de cadena O específica determinada para cada bacteria mediante un mecanismo molecular desconocido. Construimos cepas con Wzz heterólogas procedentes de *Y. enterocolitica* O:8, *Y. pseudotuberculosis* O:1B y de *Aeromonas hydrophila* AH-3 y para estudiar cómo estaba afectada la expresión de la cadena O en *Y. enterocolitica* O:8 y *Y. pseudotuberculosis* O:1B. Se ha publicado que la expresión de la cadena O en *Yersinia* esta controlada por la temperatura (**Al-Hendy et al., 1991; Bengoechea et al., 2002A**).

En la **Figura 12.**, observamos que la expresión de la cadena O en la cepa silvestre de *Yersinia enterocolitica* O:8 era mayor a 21°C (**A**) que a 37°C (**B**). Además, la longitud de la cadena O también era mayor a 21°C (**A**) que a 37°C (**B**). Éstos datos confirman resultados previos de nuestro laboratorio (**Bengoechea et al., 2002A**). En el caso del mutante en el gen *wzz* observamos cadenas O de longitud muy corta a 21°C y a 37°C (**C, D**). Acorde con resultados previos de nuestro laboratorio (**Bengoechea et al., 2002B**), la sobreexpresión de WzzYe en un mutante *wzz* de YeO8 a 21 °C (**E**) y a 37 °C (**F**) confiere una longitud de cadena O similar a la que expresa la cepa silvestre a 21°C (**A**). Por tanto, estos mutantes pierden la regulación por la temperatura (**E, F**). En cambio, si se expresa WzzYp tanto a 21°C como a 37°C observamos cadenas de longitudes más largas que la cepa silvestre a 21°C, a las que llamaremos de longitud “intermedia” (**G, H**),. Al expresar Wzz de *Aeromonas* observamos cadenas O de longitud más larga a las anteriores tanto a 21°C como a 37°C (**I, J**), a las que llamaremos de longitud “larga”.



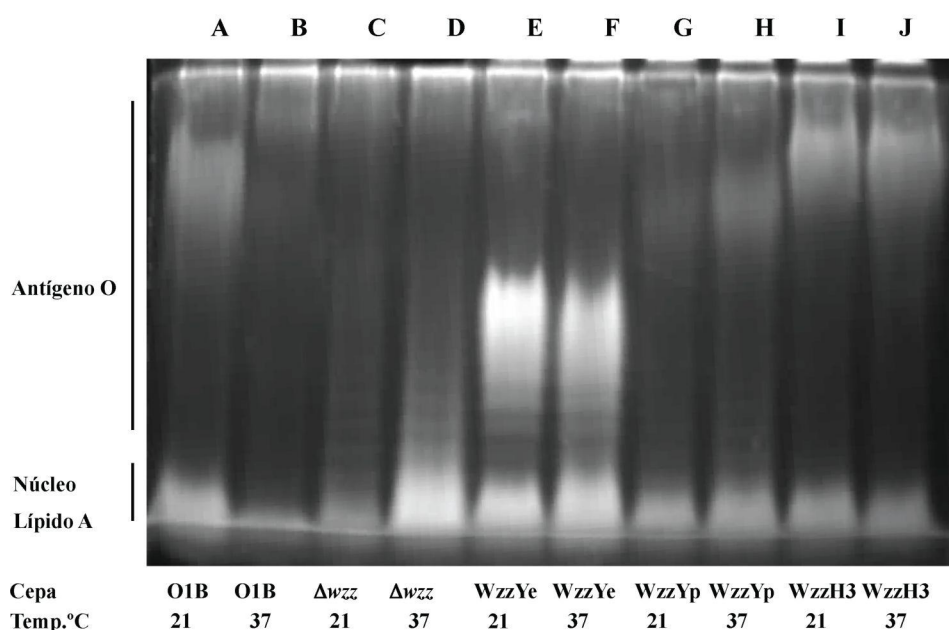
**Figura 12. Características del LPS de las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 utilizadas en el estudio.** Las bacterias se cultivaron en LB a 21°C y a 37°C, y fueron procesadas para la extracción del LPS y analizadas en el gel SDS-PAGE seguido de tinción con el kit comercial *Pro-Q® Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Satin Kit (P20495)* de INVITROGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Paralelamente, se construyeron cepas con Wzz heterólogas en un mutante *wzz* de *Yersinia pseudotuberculosis* O:1B. La cepa silvestre posee una Wzz que confiere cadenas O largas.

En la **Figura 13.**, observamos que la expresión de la cadena O en la cepa silvestre de *Yersinia pseudotuberculosis* O:1B era mayor a 21°C (A) que a 37°C (B). Además, la longitud de la cadena O era también mayor a 21°C (A) que a 37°C (B). En el caso del mutante en el gen *wzz* observamos cadenas O de longitud muy corta tanto a 21°C como a 37°C (C, D).

Al igual que con las cepas de *Yersinia enterocolitica*, se observó que la sobreexpresión de WzzYe en un mutante *wzz* de *Y. pseudotuberculosis* O:1B confiere a 21°C y a 37°C una longitud de cadena O similar a la expresa que expresa la cepa silvestre de *Y. enterocolitica* a 21°C (**Figura 12A**). Por tanto, pierden la regulación por la temperatura (E, F) y confieren cadenas O de longitud “corta” respecto a su

cepa silvestre. En cambio, si se expresa WzzYp tanto a 21°C como a 37°C (G, H) observamos cadenas de longitud igual a la de su cepa silvestre a 21°C, a las que llamaremos de longitud “intermedia”. Al expresar Wzz de *Aeromonas* observamos cadenas O de longitud más larga a las anteriores tanto a 21°C como a 37°C (I, J), a las que llamaremos de longitud “larga”.



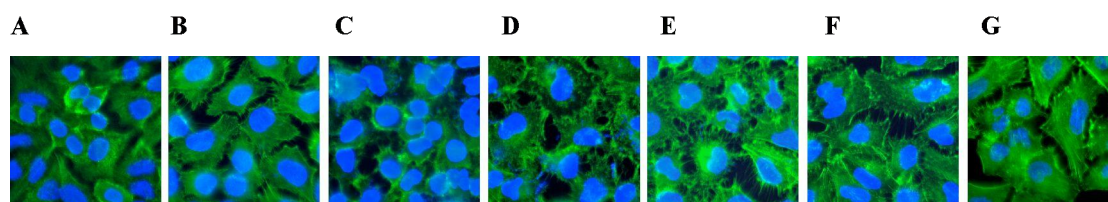
**Figura 13. Características del LPS de las cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B utilizadas en el estudio.** Las bacterias se cultivaron en LB a 21°C y a 37°C, y fueron procesadas para la extracción del LPS y analizadas en el gel SDS-PAGE seguido de tinción con el kit comercial kit comercial *Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Satin Kit (P20495)* de INVITROGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

## 1.2. Efecto de la longitud de la cadena O en la citotoxicidad en células A549

Un efecto dependiente del STTS es la citotoxicidad en células epiteliales. Se sabe que está causada por la inyección de YopE al citosol de la célula. La citotoxicidad se detecta por la contracción de las fibras del citoesqueleto y el redondeamiento de las células, causado por la disrupción y condensación de la estructura de los filamentos de actina de las células (Rosqvist et al., 1991). Por consiguiente, nos planteamos si la

longitud de la cadena O afecta a la translocación de YopE y por tanto a la citotoxicidad.

En la **Figura 14.**, observamos que las células epiteliales infectadas con la cepa silvestre presentaban una elevada citotoxicidad, el 100% de las células (**C**). Las células infectadas con el mutante *wzz* (**D**) presentaban una elevada citotoxicidad, similar a la de la cepa silvestre. Las células infectadas con WzzYe (**E**) también presentaban citotoxicidad pero menor que las anteriores. En cambio, en las cepas con WzzYp (**F**) y *Aeromonas* (**G**), la citotoxicidad era baja. Las células sin infectar (**A**) y las células infectadas con la cepa silvestre sin plásmido de virulencia (**B**) se utilizaron como control de células sanas.



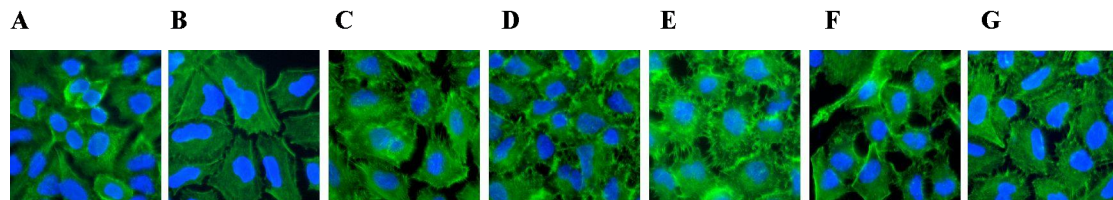
**Figura 14. Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de *Y. enterocolitica* O:8.** Microscopía de fluorescencia de células epiteliales A549 infectadas con diferentes cepas de *Yersinia*, cultivadas en LB, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Tinción del citoesqueleto (Faloidina verde) y del núcleo (Hoescht), tras 1 hora de infección. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. (A) Células sin infectar; (B) YeO8c; (C) YeO8; (D) YeO8Δwzz; (E) YeO8Δwzz/pBADwzzYe; (F) YeO8Δwzz/pBADwzzYp; (G) YeO8Δwzz/pBAD33wzzH3.

Por lo tanto, se observó que a medida que la longitud de la cadena O aumentaba la citotoxicidad era menor respecto a la cepa silvestre de *Yersinia enterocolitica* O:8. A continuación, nos planteamos si este efecto se también se daba en las cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B.

En la **Figura 15.**, observamos que la citotoxicidad de las células epiteliales infectadas con la cepa silvestre O1B era baja (**C**). En cambio, en las células infectadas con el mutante *wzz* (**D**) al igual que las infectadas con el mutante *wzz*, que expresa WzzYe (**E**) presentaban citotoxicidad elevada. Sin embargo, en los mutantes *wzz*, que expresan WzzYp (**F**) y *Aeromonas* (**G**), la citotoxicidad era menor que en las anteriores (mutante *wzz* y la cepa con WzzYe (**D, E**)). Las células sin infectar (**A**) y

las células infectadas con la cepa silvestre sin plásmido de virulencia (**B**) se utilizaron como control de células sanas.

Observamos que a longitudes de la cadena O cortas, la citotoxicidad era mayor respecto a la cepa silvestre de *Yersinia pseudotuberculosis*.



**Figura 15. Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B.** Microscopía de fluorescencia de células epiteliales A549 infectadas con diferentes cepas de *Yersinia*, cultivadas en LB, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Tinción del citoesqueleto (Faloidina verde) y del núcleo (Hoescht), tras 1 hora de infección. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. (A) Células sin infectar; (B) O1Bc; (C) O1B; (D) YptΔwzz; (E) YptΔwzz/pBADwzzYe; (F) YptΔwzz/pBADwzzYp; (G) YptΔwzz/pBAD33wzzH3.

Podemos afirmar entonces que, tanto en *Yersinia enterocolitica* O:8 como en *Yersinia pseudotuberculosis* O:1B, que la longitud de la cadena O afecta a la citotoxicidad. Cuando las cadenas O son cortas se produce mayor citotoxicidad.

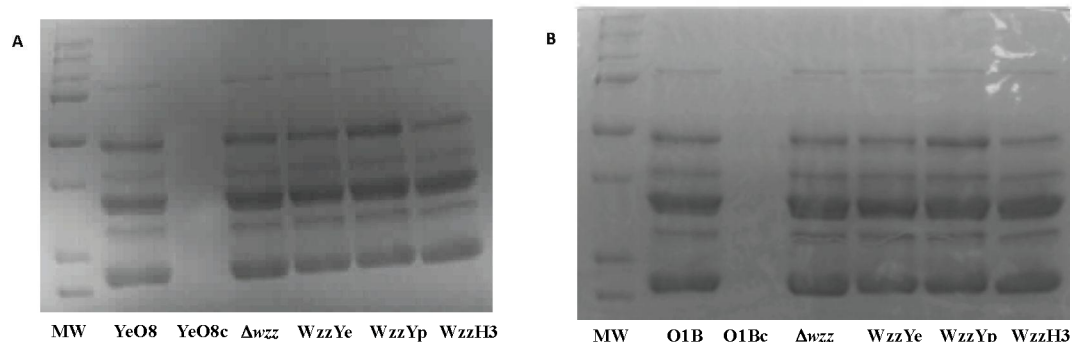
### 1.3. Efecto de la longitud de la cadena O en la secreción de proteínas Yops al medio

Con el fin de comprobar si la diferencia en la citotoxicidad era debida a que las cepas tenían afectada la producción de proteínas Yops, se realizó el ensayo de secreción de Yops *in vitro*, mediante incubación en ausencia de calcio (**Pettersson et al., 1996, Cornelis y Wolf-Watz et al., 1997**).

En el caso de las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 no se observaron diferencias en la secreción de Yops al medio (**Figura 16A**).

En el caso de las cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B no se observaron diferencias en la secreción de Yops al medio (**Figura 16B**).

Podemos afirmar entonces, que la longitud de la cadena O no afecta a la secreción de Yops *in vitro*.



**Figura 16. Secreción de Yops y análisis mediante gel SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.** Crecimiento de las bacterias en TSBox durante 3 horas a 21°C y 3 horas a 37°C, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

**Panel A:** Cepas de *Y. enterocolitica* O:8.

**Panel B:** Cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B.

#### 1.4. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión e invasión a células A549

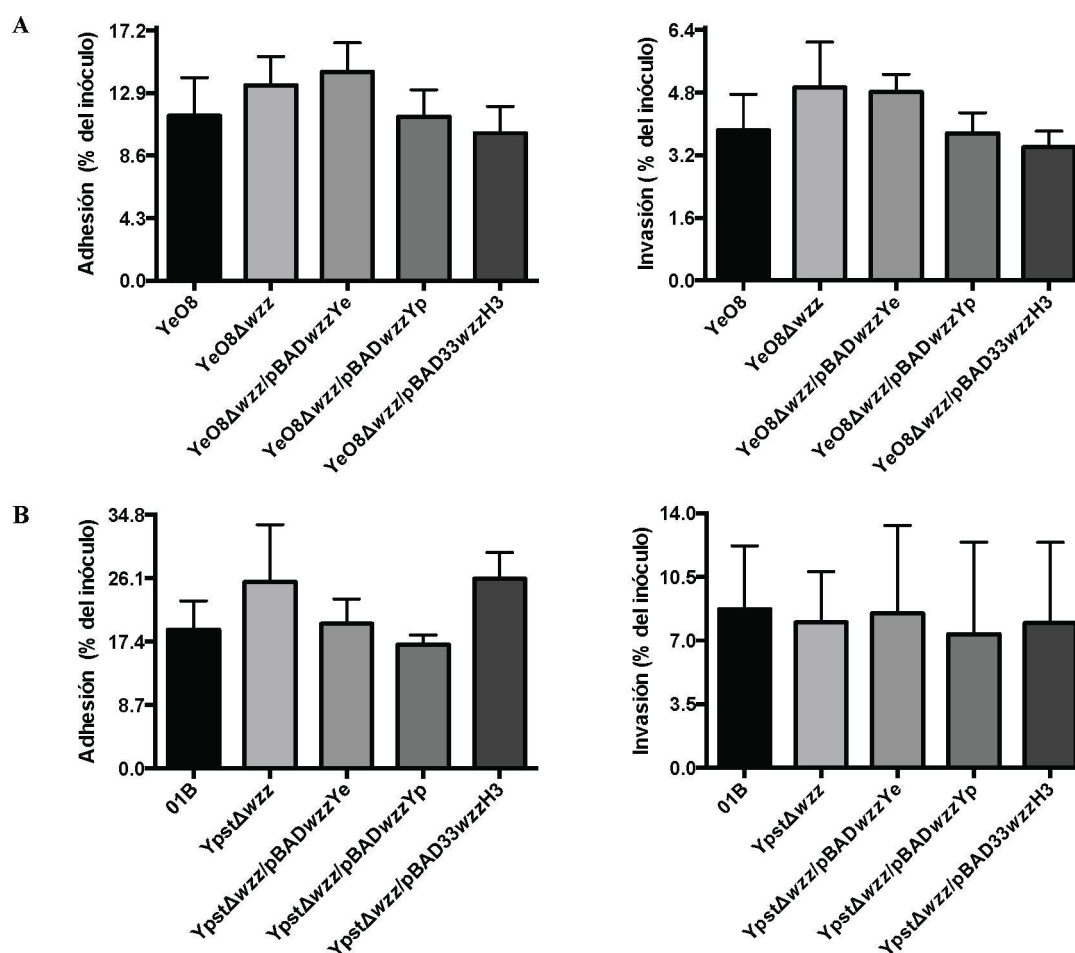
Con el fin de comprobar si la diferencia en la citotoxicidad era debida a que la adhesión de las bacterias al epitelio estaba afectada, realizamos el ensayo de adhesión a células epiteliales A549 a 21°C. La adhesina “invasin” actúa en las primeras fases de la infección, es responsable de la colonización inicial y de la internalización en la célula diana. Su expresión es máxima a 25°C y está reprimida a 37°C en *Y. enterocolitica* O:8 (Wyborn et al., 2004; Uliczka et al., 2011).

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la adhesión e invasión de células infectadas a 21°C con ninguna de las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 (**Figura 17A**).



En el caso de las cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B tampoco observamos diferencias significativas en la adhesión e invasión de células infectadas a 21°C (**Figura 17B**).

Podemos afirmar entonces, que la adhesión e invasión de las células epiteliales dependiente de la adhesina invasina a 21°C, no depende de la longitud de la cadena O de las cepas de *Yersinia*.



**Figura 17. Adhesión e invasión a células epiteliales A549 con diferentes cepas de *Yersinia*.** Las células epiteliales A549 fueron infectadas (25:1) con diferentes cepas de *Yersinia* cultivadas en LB e induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Después de 1 hora de infección se calculó la adhesión de las cepas de *Y. enterocolitica* (A) y de *Y. pseudotuberculosis* (C) a los macrófagos THP-1. las bacterias intracelulares se cuantificaron tras 90 minutos con gentamicina (B y D). Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, \*indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ , test *t* de Student de dos colas) respecto a sus cepas silvestres.

**Panel A:** Cepas de *Y. enterocolitica* O:8: YeO8, YeO8c y las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*..

**Panel B:** Cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B: O1B, O1Bc y las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*..

### 1.5. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión a Colágeno

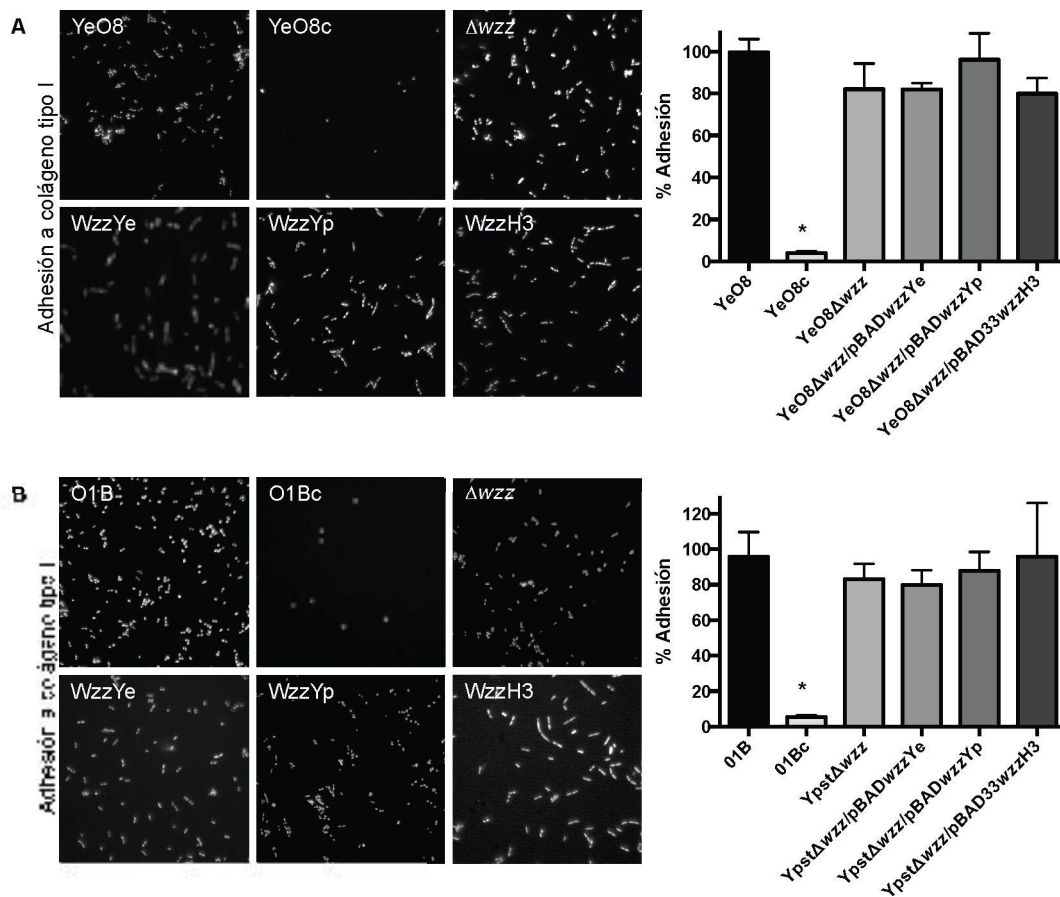
Con el fin de estudiar si la diferencia en la citotoxicidad era debida a una peor adhesión, se realizó el ensayo de adhesión a colágeno humano a 37°C. YadA es una adhesina localizada en la membrana externa responsable de la adhesión a células epiteliales, neutrófilos y macrófagos (Heesemann et al., 1987; Roggenkamp et al., 1996). Se une al colágeno, fibronectina y laminina de las células (Schulze-Koops et al., 1992). Es una adhesina codificada en el plásmido pYV que sólo se expresa a 37°C (Bölin et al., 1982; Kapperud et al., 1985). Existe una correlación entre la adhesión al colágeno y la adhesión al epitelio.

En las imágenes (Figura 18A), correspondientes a las cepas de *Y. enterocolitica* O:8, podemos observar las bacterias adheridas de la cepa silvestre YeO8 y de las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*. Observamos que el número de bacterias adheridas al colágeno era similar en todos los casos. En la imagen correspondiente a células A549 infectadas con la cepa silvestre sin plásmido de virulencia de *Y. enterocolitica*, YeO8c, se puede observar que había menos bacterias adheridas respecto a las otras imágenes correspondientes a células infectadas con la cepa silvestre de *Y. enterocolitica* y las cepas de cadena O debido a que no posee plásmido de virulencia pYV y por tanto no expresa YadA.

No se observaron diferencias significativas en la adhesión a colágeno humano a 37°C con ninguna de las cepas en las cepas de *Yersinia enterocolitrica* O:8. (Figura 18A).

En las imágenes (Figura 18B) correspondientes a células infectadas con diferentes cepas de las cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B, podemos observar las bacterias adheridas de la cepa silvestre O1B y de las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*.

Observamos que el número de bacterias adheridas al colágeno era similar en todos los casos. En la imagen que corresponde a células infectadas con la cepa silvestre sin plásmido de virulencia O1Bc se puede observar que había menos bacterias adheridas respecto a las otras imágenes correspondientes a la cepa silvestre y las cepas de cadena O, ésta menor adhesión era debida a la falta de plásmido de virulencia pYV. En la gráfica (**Figura 18B**) podemos observar que no se apreciaron diferencias significativas en la adhesión a colágeno humano a 37°C en las cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* O:1B.



**Figura 18. Adherencia de las cepas de *Yersinia* a colágeno humano tipo I.** Cultivo de las bacterias en LB a 37°C, y posterior infección de 1 hora en colágeno. Marcaje de las bacterias con Hoescht y análisis por microscopia de fluorescencia. Cálculo de la adhesión de diferentes cepas de *Yersinia* a colágeno. Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, \*indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ , test  $t$  de Student de dos colas) respecto a sus cepas silvestres.

**Panel A:** Cepas de *Y. enterocolitica* O:8: YeO8, YeO8c y las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*.

**Panel B:** Cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B: O1B, O1Bc y las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*.

## 1.6. Efecto de la longitud de la cadena O en la translocación de YopE

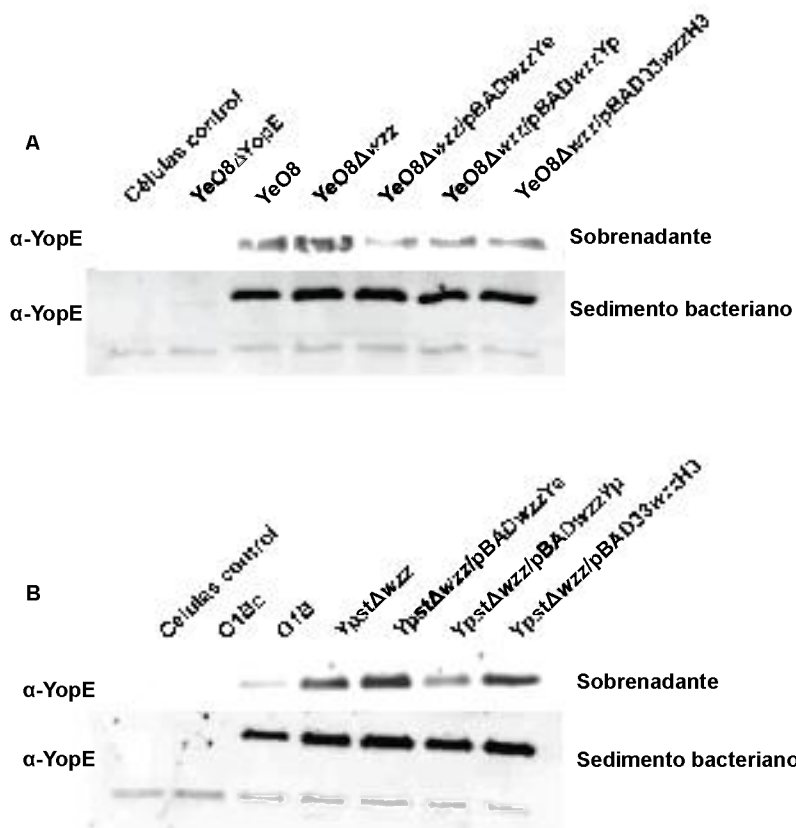
Un efecto dependiente del STTS es la translocación de proteínas Yops al citosol. Es conocido que YopE es la proteína causante de la citotoxicidad en células epiteliales. Desestabiliza los filamentos de actina, redondea las células, provoca que las células en cultivo se despeguen de la matriz extracelular (**Black et al., 2000; Rosqvist et al., 1991; Sory et al., 1995; Von Pawel-Rammingen et al., 2000**). Resultados previos de este trabajo (apartado 1.2 de resultados) sugieren que la citotoxicidad era mayor en las cepas de cadenas O cortas. Nos planteamos, por tanto, si esta mayor citotoxicidad era debida a una mayor translocación de YopE al citosol de las células A549.

Se puede observar que la translocación de YopE al citosol varía en función de la longitud de la cadena O en el caso de *Yersinia enterocolitica* O:8 (**Figura 19A**). La translocación de YopE fue mayor en la cepa silvestre YeO8 que en el resto de las cepas: con WzzYe, con WzzYp y con WzzH3 de *Aeromonas*. El mutante *wzz* presentó una mayor translocación que la cepa silvestre.

Por tanto, los resultados muestran que al aumentar la longitud de la cadena O se produce menos translocación de YopE en las cepas de *Y. enterocolitica* O:8.

En el caso de las cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* O:1B (**Figura 19B**), podemos observar que la translocación también variaba con la longitud de la cadena O. El mutante *wzz* y el mutante *wzz* que expresa WzzYe presentaban una mayor translocación muy superior a la de la cepa silvestre. En la cepa que expresa Wzz de *Aeromonas* la translocación era elevada pero inferior a las anteriores. En cambio, en la cepa silvestre y en el mutante *wzz* que expresa WzzYp la translocación era baja.

Los datos sugieren que al disminuir la longitud de la cadena O aumenta la translocación de YopE.



**Figura 19. Análisis por Western Blot de la translocación de YopE al citosol de las células epiteliales A549.** Cultivo de las cepas de las bacterianas en LB, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Tras 1 hora de infección se lisaron las células con digitonina 1% y se procesaron las muestras mediante gel SDS-PAGE y Western Blot, usando un anticuerpo policlonal de ratón (1:2000). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

**Panel A.** Cepas de *Y. enterocolitica* O:8: YeO8, YeO8c y las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*.

**Panel B.** Cepas de *Y. pseudotuberculosis* O:1B: : O1B, O1Bc y las diferentes cepas de cadena O: mutante *wzz*, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*.

### 1.7. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión y fagocitosis en macrófagos humanos THP-1

Con el fin de comprobar si la longitud de la cadena O afectada a la adhesión y fagocitosis. Realizamos ensayos de adhesión y fagocitosis en macrófagos humanos THP1. La adhesión al macrófago depende de la adhesina invasiva, mientras que la fagocitosis es un efecto dependiente del SSTT. La capacidad antifagocítica de la

bacteria se da como resultado de la translocación mediante el STTS de YopE, YopH y YopO al interior del macrófago (Persson et al., 1999; Rosqvist et al., 1991).

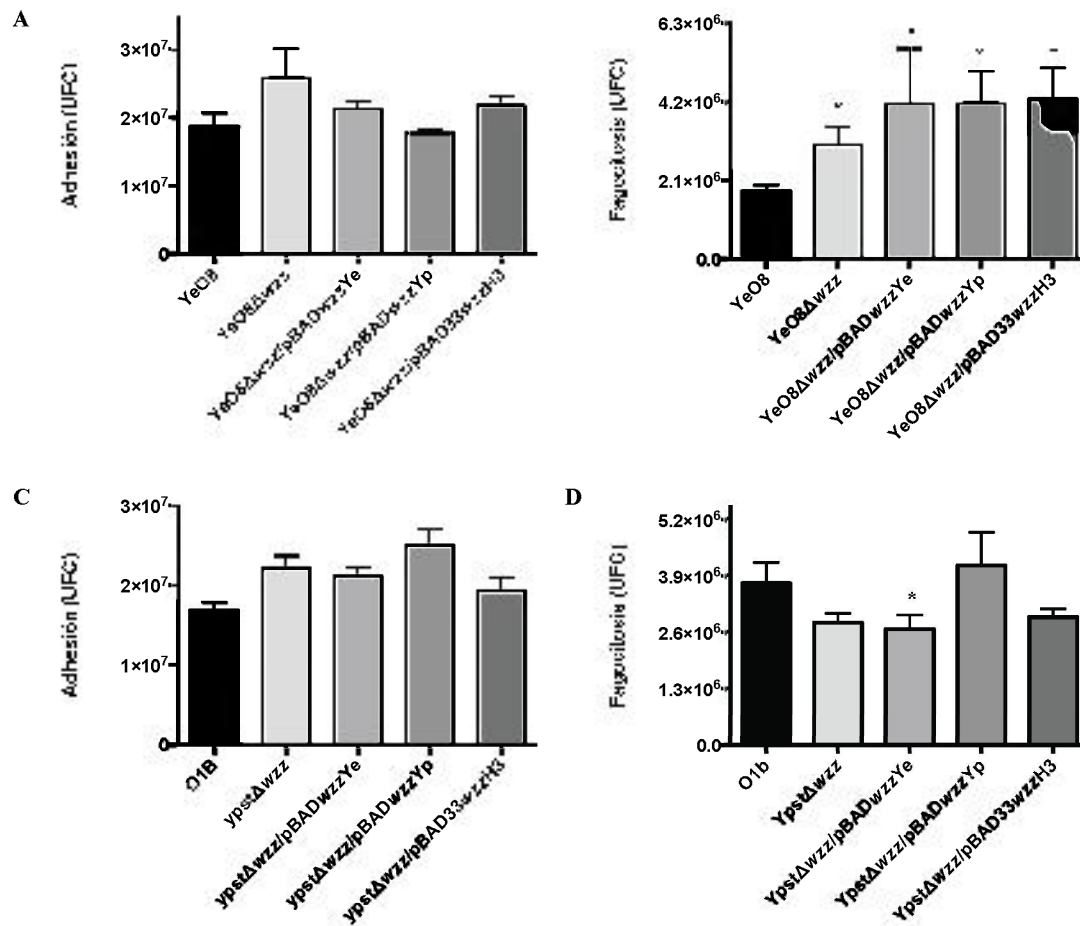
En la **Figura 20A**, se observa que no hay diferencias significativas en la adhesión a macrófagos entre las diferentes cepas de cadena O de *Yersinia enterocolitica* O:8. Estos datos sugieren que la longitud de la cadena O no afecta a la adhesión en macrófagos THP-1.

Por otra parte, podemos observar en la **Figura 20B**, que la cepa silvestre de *Yersinia enterocolitica* YeO8 era fagocitada con menor eficiencia por los macrófagos humanos THP-1. En cambio, que el mutante *wzz* y el mutante *wzz* que expresa Wzzye, el que expresa WzzYp y el que expresa Wzz de *Aeromonas* fueron significativamente fagocitados con mayor eficiencia que la de la cepa silvestre.

En el caso de *Yersinia pseudotuberculosis*, podemos observar en la **Figura 20C** que no había diferencias significativas en la adhesión entre la cepa silvestre y los mutantes *wzz* con distintas longitudes de cadena O. Estos datos muestran que la longitud de la cadena O no afecta a la adhesión a macrófagos THP-1.

Por otro lado, podemos observar en la **Figura 20D**, que la cepa silvestre de *Y. pseudotuberculosis* O1B era fagocitada con mayor eficiencia que la cepa silvestre de *Y. enterocolitica* YeO8 (**Figura 20B y D**). El mutante *wzz* y los mutantes *wzz* que expresan WzzYp y Wzz de *Aeromonas*, presentaron niveles similares de fagocitosis a la cepa silvestre O1B. En cambio, la fagocitosis por los macrófagos THP-1 del mutante *wzz* que expresa WzzYe fue significativamente menor a la de la cepa silvestre YeO8.

Por lo tanto, en conjunto, los datos muestran que la longitud de la cadena O de *Yersinia* no afecta a la adhesión pero sí a la fagocitosis en los macrófagos THP-1.



**Figura 20. Efecto de la longitud de de la cadena O en la adhesión y fagocitosis en macrófagos THP-1.** Los macrófagos humanos THP-1 fueron infectados (20:1) con diferentes cepas de *Yersinia* cultivadas en LB e induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Después de 30 minutos de infección se calculó la adhesión de las cepas de *Y. enterocolitica* (A) y de *Y. pseudotuberculosis* (C) a los macrófagos THP-1. las bacterias intracelulares se cuantificaron tras 90 minutos con gentamicina (B y D). Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, \*indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ , test *t* de Student de dos colas) respecto a sus cepas silvestres.

**Panel A, B.** Cepas de *Y. enterocolitica* O:8: YeO8 y las diferentes cepas de cadena O: mutante wzz, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*.

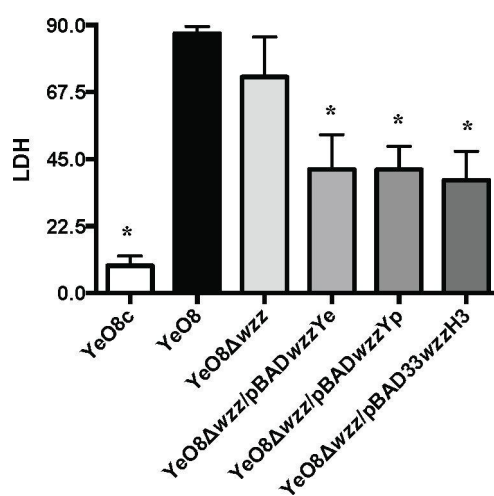
**Panel B, C.** Cepas de *Y. pseudotuberculosis* O1B: O1B y las diferentes cepas de cadena O: mutante wzz, la cepa con WzzYe, la cepa con WzzYp y la cepa con WzzH3 de *Aeromonas*.

### 1.8. Efecto de la longitud de la cadena O en la citotoxicidad en macrófagos humanos THP-1.

Un efecto dependiente del SSTT es la citotoxicidad en macrófagos. La secreción de lactato deshidrogenasa (LDH) es indicativa de citotoxicidad. Por lo tanto, a mayor secreción de LDH por parte del macrófago mayor citotoxicidad. Con el fin de comprobar si la diferencia en la longitud de la cadena O afectaba a la citotoxicidad del macrófago realizamos el ensayo de secreción de LDH (apartado 14 de materiales y métodos). Algunos estudios demuestran que YopE es la proteína del SSTT causante de la citotoxicidad en macrófagos (Black et al., 2000; Rosqvist et al., 1991; Sory et al., 1995; Von Pawel-Rammingen et al., 2000).

Como se podemos observar en la gráfica de la **Figura 21**, la secreción de LDH tanto en la cepa silvestre YeO8 como en el mutante *wzz* era muy elevada. Sin embargo, en el mutante *wzz* que expresa WzzYe, en el que expresa WzzYp y en el que expresa Wzz de *Aeromonas* la secreción era significativamente más baja que en la cepa silvestre. Como control se usó la cepa YeO8c, es conocido que no causa citotoxicidad.

Estos datos muestran que la longitud de la cadena O de *Yersinia enterocolitica* O:8 afecta a la secreción de LDH en los macrófagos THP-1.





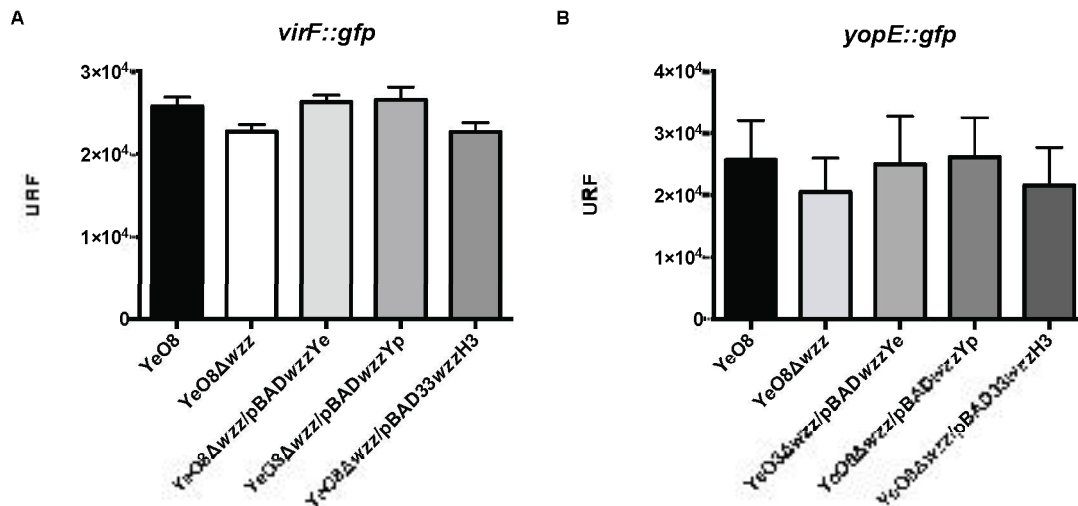
**Figura 21. Estudio de la citotoxicidad en macrófagos THP-1.** Las cepas bacterianas fueron cultivadas en LB induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Los macrófagos THP-1 fueron infectados (20:1) con diferentes cepas de *Yersinia enterocolitica* O:8 durante 1 hora más 4 horas de tratamiento con gentamicina (100ug/ml). Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, \*indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ , test *t* de Student de dos colas) respecto a la cepa silvestre.

### **1.9. Efecto de la longitud de la cadena O en la expresión de los genes *virF* y *yopE*.**

Con el fin de comprobar si la longitud de la cadena O afectaba a la expresión del SSTT se realizó el ensayo de la expresión del gen *virF* y se midió también la expresión de *yopE* como principal responsable de la citotoxicidad causada por el STTS. La transcripción de los genes del STTS *ycs* y *yop* está regulada por la temperatura siendo VirF el activador transcripcional que controla este proceso (Cornelis et al., 1989; Cornelis et al., 1998B; Lambert de Rouvroit et al., 1992; Skurnik et al., 1992). La expresión de los genes *virF*, *YopE* se analizó en cepas portadoras del plásmido con la fusión transcripcional entre la región promotora de dichos genes y el gen *gfp*.

Como se puede observar en la gráfica de la **Figura 22A**, la expresión del gen *virF*, el activador transcripcional del SSTT no estaba afectada por la longitud de la cadena O. Para asegurar que la transcripción de genes *yop* del SSTT no estaba afectada por la longitud de la cadena O, se determinó la expresión de *yopE* (**Figura 22B**) representativa de la transcripción de las proteínas Yop.

Como se puede observar en la gráfica de la **Figura 22A y B**, la expresión de *virF* y *yopE* no se vió afectada por la longitud de la cadena O de *Y. enterocolitica* O:8.



**Figura 22. Análisis de la expresión de *virF* y *yopE* en diferentes cepas de *Y. enterocolitica* O:8.** Análisis de la expresión de *virF* y *yopE* en YeO8; YeO8 $\Delta$ wzz; YeO8 $\Delta$ wzz/pBADwzzYe; YeO8 $\Delta$ wzz/pBADwzzYp; YeO8 $\Delta$ wzz/pBAD33wzzH3 YeO8 $\Delta$ wzz/pBADwzzYe, mediante la medición de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *virF*::*gfp* (A) y *yopE*::*gfp* (B). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \*, indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ , test *t* Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

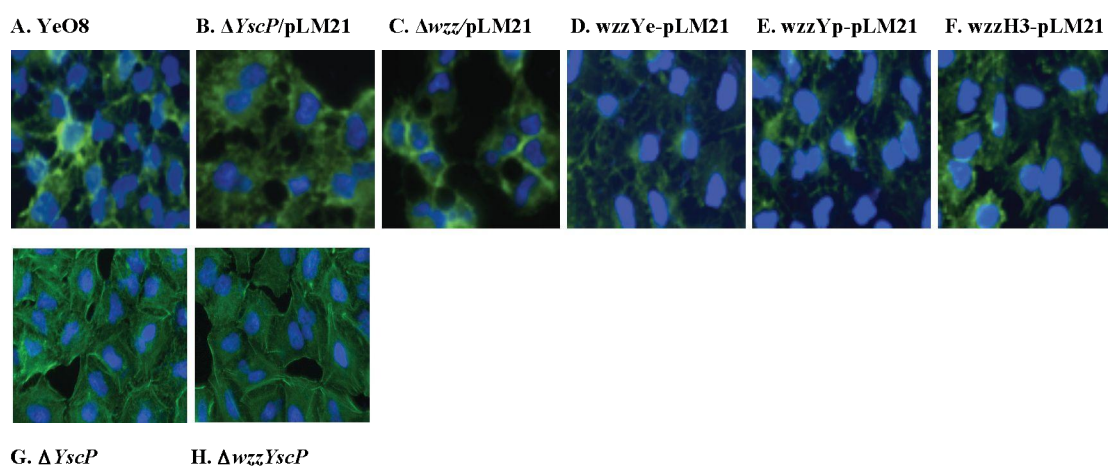
### 1.10. Efecto de la longitud de la cadena O al sustituir el inyectiosoma por otro de mayor longitud.

El SSTT está formado por el inyectiosoma que le permite inyectar las proteínas Yop en el citosol de la célula diana en un solo paso. La parte externa del inyectiosoma está compuesta por una aguja extracelular cuya longitud viene determinada por la proteína YscP. Existe una relación lineal entre la longitud de la aguja y el tamaño de la proteína YscP. La aguja de *Yersinia enterocolitica* mide 65 nm de longitud y está compuesta por 140 copias de la proteína de 9 kDa YscF (Wagner et al., 2010). Construimos mutantes *yscP* complementados con el plásmido pLM21 que codifica la proteína YscP<sub>686</sub> de gran tamaño, dando lugar a cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con longitud de aguja más larga que la cepa silvestre, de aproximadamente  $100 \pm 12$  nm (Wagner et al., 2010). A su vez, que construimos cepas con aguja larga y diferentes longitudes de cadena O. Estudiamos el efecto que producía en la citotoxicidad en células epiteliales A549.

Como se observa en las imágenes de la **Figura 23**, la cepa silvestre (A) y el mutante doble *wzz-yscP* (C) presentan niveles similares de citotoxicidad de aproximadamente el 100%. El mutante simple *yscP* (B) y los mutantes dobles complementados con WzzYe (D), con WzzYp (E) y Wzz de *Aeromonas* (F) también presentaban una elevada citotoxicidad, aunque siendo inferior a la de la cepa silvestre.

Al comparar estos resultados con los de la **Figura 14**, observamos que al tener la aguja larga hay un aumento de la citotoxicidad en las cepas con cadenas O largas, respecto a las correspondientes a las mismas cepas con aguja “corta”, donde la citotoxicidad estaba reducida al expresar cadenas O largas.

Los mutantes *yscP* sin complementar (G y H) fueron utilizados como control de células sanas, al no expresar la proteína YscP los inyectiosomas no son funcionales y por lo tanto no secretan proteínas Yop (**Agrain et al., 2005B**).

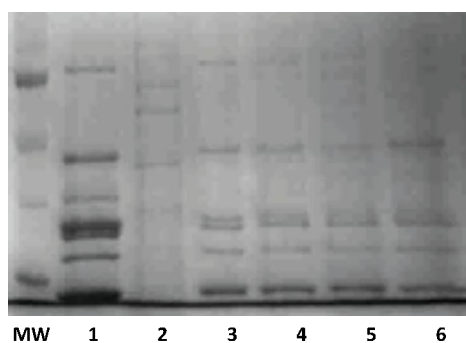


**Figura 23. Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con diferentes longitudes de cadena O y con aguja larga.** Microscopía de fluorescencia de células epiteliales A549 infectadas con diferentes cepas de *Yersinia*, cultivadas en LB, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Tinción del citoesqueleto con Faloidina (verde) y el núcleo con Hoescht (azul), tras 1 hora de infección. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. (A) YeO8; (B) YeO8 $\Delta$ *YscP*/pLM21; (C) YeO8 $\Delta$ *wzzYscP*/pLM21; (D) YeO8 $\Delta$ *wzzYscP*/pBADwzzYe-pLM21; (E) YeO8 $\Delta$ *wzzYscP*/pBADwzzYp-pLM21; (F) YeO8 $\Delta$ *wzzYscP*/pBAD33wzzH3-pLM21; (G) YeO8 $\Delta$ *YscP*; (H) YeO8 $\Delta$ *wzzYscP*.

### 1.11. Efecto de la longitud de la cadena O en la secreción de Yops al medio en cepas con inyectorio largo.

Nos planteamos si la longitud de la aguja del inyectorio comprometía la funcionalidad del SSTT. Realizamos el ensayo de secreción de Yops al medio en condiciones de restricción de calcio (Pettersson et al., 1996, Cornelis y Wolf-Watz et al., 1997).

Sorprendentemente, obtuvimos que la secreción de proteínas Yop al medio estaba reducida en las cepas de aguja larga respecto a la cepa silvestre de *Y. enterocolitica* O:8. La secreción entre las diferentes cepas de aguja larga y cadenas O de longitud distinta no estaba afectada, siendo igual en todas ellas (Figura 24).

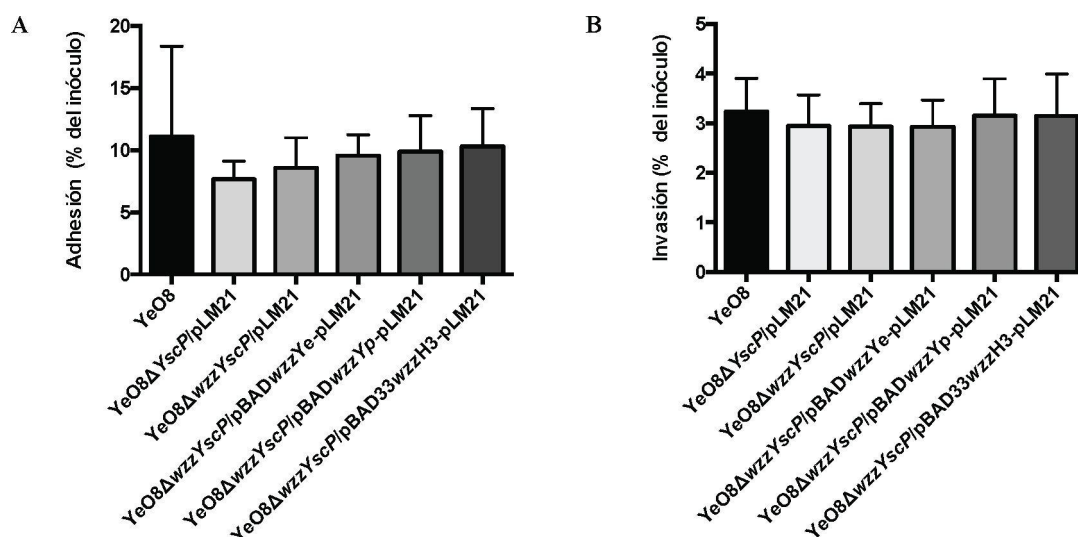


**Figura 24. Análisis del efecto de la cadena O en cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con aguja larga sobre la secreción de Yops.** Electroforesis de las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos en condiciones de restricción de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Crecimiento de las bacterias en TSBox durante 3 horas a 21°C y 3 horas a 37°C, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. (1) YeO8; (2) YeO8c; (3) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pLM21; (4) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pBADwzzYe-pLM21; (5) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pBADwzzYp-pLM21; (6) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pBAD33wzzH3-pLM21.

### 1.12. Efecto de la longitud de la cadena O en la adhesión e invasión a células epiteliales A549 en cepas con inyectiosoma largo.

Con el fin de ver si la adhesión e invasión al epitelio estaba afectada por la longitud de la cadena O en cepas de aguja larga, realizamos el experimento a 21°C del mismo modo que en el apartado 1.4. La adhesina invasiva actúa en las primeras fases de la infección, es responsable de la colonización inicial y de la internalización en la célula diana. Su expresión es máxima a 25°C y está reprimida a 37°C en *Y. enterocolitica* O:8 (Wyborn et al., 2004; Uliczka et al., 2011).

Los resultados obtenidos en la Figura 25, muestran que la adhesión y la invasión no están afectadas por la longitud de la cadena O en las cepas inyectiosoma de aguja larga.



**Figura 25. Estudio de la interacción de cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con inyectiosoma largo en células epiteliales A549.** Cultivo de las cepas bacterianas en LB a 21°C, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. (A) Adhesión de diferentes cepas de *Yersinia* en células A549 tras 1 hora de infección. (B) Internalización de las diferentes cepas bacterianas en las células A549 tras 1 hora de infección más 90 minutos de tratamiento con gentamicina. Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, \*indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ , test  $t$  de Student de dos colas) respecto a sus cepas silvestres.

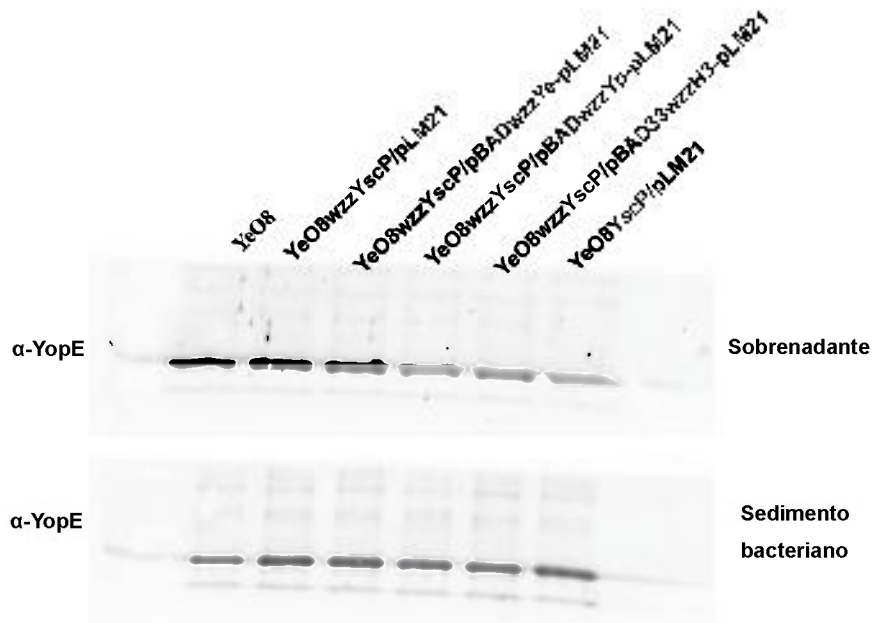
### 1.13. Efecto de la longitud de la cadena O en la translocación de YopE, en cepas con inyectiosoma largo.

Un efecto dependiente del SSTT es la translocación de proteínas Yop al citosol. Algunos estudios demuestran que YopE es la causante de la citotoxicidad (**Black et al., 2000; Rosqvist et al., 1991; Sory et al., 1995; Von Pawel-Rammingen et al., 2000**). Según nuestros resultados previos de este trabajo (**Figura 14 y Figura 19A**) **muestran** que la citotoxicidad es mayor en las cepas de cadenas O cortas debido a una mayor translocación de YopE al citosol en las de las células epiteliales. Nos planteamos por tanto, si al aumentar el efecto citotóxico (**Figura 23**) observado al expresar cadenas O largas y aguja larga, la translocación de YopE también estará aumentada.

Podemos observar que la cantidad de YopE de los extractos celulares correspondientes a cepas de aguja larga (**Figura 26**) del mutante doble *wzz-yscP* y del mutante doble *wzz-yscP* complementado con WzzYe es muy alta, con unos niveles similares al de la cepa silvestre. Los mutantes dobles *wzz-yscP* complementados con WzzYp y WzzH3 también presentar unos niveles de proteína elevados pero inferiores a los de la cepa silvestre. El mutante simple *yscP* es el que presentar una cantidad de proteína translocada.

Resultados previos de este estudio (**Figura 19A**), muestran que en las cepas con cadenas O largas (WzzYe, WzzYp y Wzz de *Aeromonas*) la translocación de YopE estaba muy reducida respecto a la cepa silvestre. En cambio al tener una aguja más larga (**Figura 26**), esta diferencia en la translocación por parte de las cepas con cadenas O largas es menos aparente. La translocación de la proteína YopE en las cepas con cadenas O largas se ve favorecida cuando el inyectiosoma es largo.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que hay una mejora en la translocación en las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con cadenas O largas cuando la aguja del inyectiosoma es larga.



**Figura 26. Análisis de la translocación de YopE al citosol de las células epiteliales A549 en las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con inyectosoma largo.** Cultivo de las cepas de las bacterianas en LB, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Tras 1 hora de infección se lisaron las células con digitonina 1% y se procesaron las muestras mediante gel SDS-PAGE y Western Blot, usando un anticuerpo policlonal de ratón (1:2000). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

#### **1.14. Efecto de la longitud de la cadena O en la fagocitosis en macrófagos humanos THP-1, en cepas de aguja larga.**

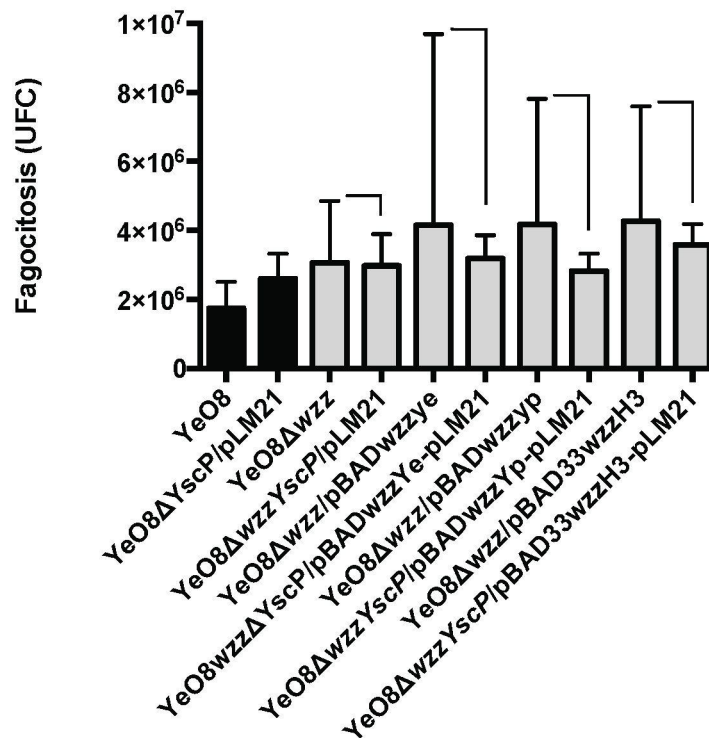
La capacidad antifagocítica de la bacteria depende, en parte, de la translocación mediante el SSTT de las proteínas YopE, YopH y YopO al citosol del macrófago (Persson et al., 1999; Rosqvist et al., 1991). Resultados previos de este trabajo sugieren que en los mutantes dobles complementados con aguja larga y cadenas O largas, la translocación de YopE es superior a la de los mutantes simples *wzz* complementados con cadenas O largas. A continuación estudiamos si este efecto ocurría también en la fagocitosis, puesto que depende de la capacidad de la bacteria de translocar al citosol de la célula.

Al poner todos los resultados de fagocitosis de las cepas de *Yersinia enterocolitica* O:8 juntos (**Figura 27**), los resultados muestran que los mutantes simples *wzz* eran fagocitados con mayor eficiencia que los mutantes dobles *wzz-yscP*. La cantidad de bacterias internalizadas en la cepa silvestre era baja.

No se observaron diferencias en el número de UFC fagocitadas entre los mutantes simple (YeO8 $\Delta$ *wzz*) y del mutante doble sin complementar con Wzz (YeO8 $\Delta$ *wzzYscP*/pLM21) que daban un valor similar en ambos casos (**Figura 27**).

En cambio, en los mutantes dobles *wzz-yscP* y cadenas O largas (WzzYe, WzzYp y Wzz de *Aeromonas*) las bacterias eran fagocitadas con menor eficiencia que en el caso de los mutantes simples *wzz* complementados con cadenas O largas (WzzYe, WzzYp y Wzz de *Aeromonas*) (**Figura 27**).

En conjunto, los resultados sugieren que una mayor longitud de la aguja del inyectosoma favorece la translocación y disminuye la cantidad de bacterias internalizadas por macrófagos en las cepas de *Y. enterocolitica* con cadenas O largas.



**Figura 27. Efecto de la longitud de de la cadena O y de la aguja en la fagocitosis en macrófagos THP-1.** Crecimiento de diferentes cepas de *Yersinia* en LB induciendo con arabinosa 0.2% la última hora y posterior infección a los macrófagos THP-1 durante 30 minutos. Las bacterias intracelulares se



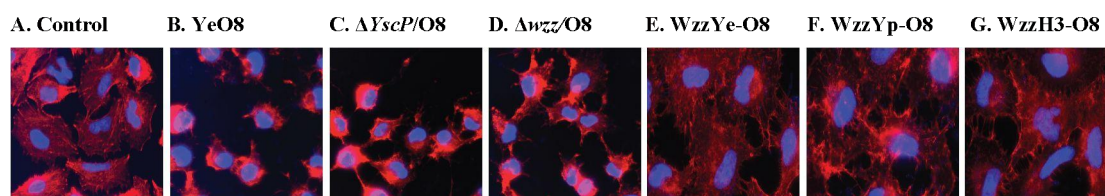
cuantificaron tras 90 minutos con gentamicina. Los resultados son medias y error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, \* indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ , test *t* de Student de dos colas) respecto a sus cepas silvestres.

### 1.15. Efecto de la longitud de la cadena O al sustituir el inyectorio por el suyo propio.

Por último, nos preguntamos si al complementar los mutantes dobles con la proteína YscP de *Y. enterocolitica* O:8, es decir su propia aguja, se volvería a la situación inicial, en la que estas cepas se comportarían como los mutantes simples. Por tanto, volveríamos a ver que cadenas O cortas funcionan mejor que las largas.

En la **Figura 28.**, observamos que las células epiteliales infectadas con la cepa silvestre YeO8 presentan una elevada citotoxicidad, el 100% de las células (**B**). Las células infectadas con el mutante simple *yscP* (**C**), al igual que las infectadas con el mutante doble *wzz-yscP* (**D**) también presentan altos niveles de citotoxicidad, con valores similares a la cepa silvestre. En cambio, las células infectadas con los mutantes dobles *wzz-yscP* complementados con con WzzYe (**E**), con WzzYp (**F**) y *Aeromonas* (**G**), presentaban una citotoxicidad mucho más baja. Las células sin infectar (**A**) se utilizaron como control de células sanas.

Los resultados muestran que al expresar su propia aguja volvemos a los valores iniciales de citotoxicidad, en los que se pierde citotoxicidad al expresar cadenas O largas.

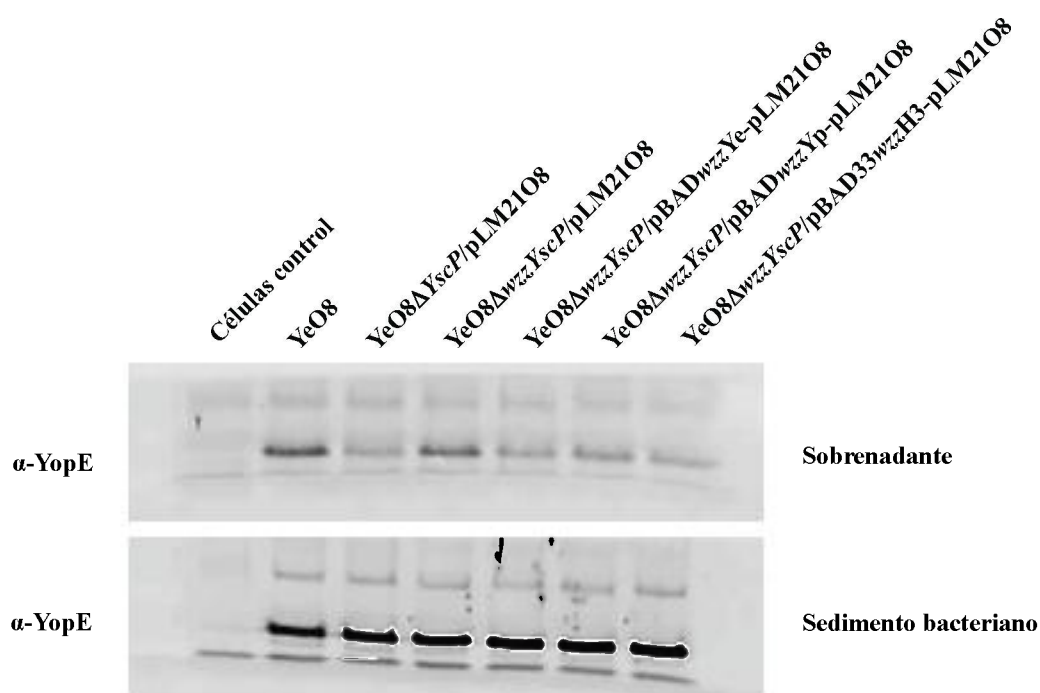


**Figura 28. Análisis de la citotoxicidad en células epiteliales A549 por cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con diferentes longitudes de cadena O y con su propia aguja O:8.** Microscopía de fluorescencia de células epiteliales A549 infectadas con diferentes cepas de *Yersinia*, cultivadas en LB, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Tinción del citoesqueleto con Faloidina (rojo) y el núcleo con Hoescht (azul), tras 1 hora de infección. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

experimentos independientes realizados por triplicado. (A) YeO8; (B) YeO8 $\Delta$ YscP/pLM21O8; (C) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pLM21O8; (D) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pBADwzzYe-pLM21O8; (E) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pBADwzzYp-pLM21O8; (F) YeO8 $\Delta$ wzzYscP/pBAD33wzzH3-pLM21O8.

Para acabar, estudiamos el efecto que producía en la translocación de la preteína YopE. En la **Figura 29** podemos observar que al expresar su propia aguja, la cantidad de proteína YopE translocada era elevada en la cepa silvestre y en el mutante doble. Mientras que la cantidad de proteína translocada era baja en las cepas con cadenas O largas (WzzYe, WzzYp y Wzz de *Aeromonas*).

Todos estos resultados sugieren que al aumentar la longitud de la cadena O se produce menos translocación de YopE en las cepas de *Y. enterocolitica* O:8, al igual que en la situación inicial.



**Figura 29. Análisis de la translocación de YopE al citosol de las células epiteliales A549 en las cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con su propia aguja O:8.** Cultivo de las cepas de las bacterianas en LB, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora. Tras 1 hora de infección se lisaron las células con digitonina 1% y se procesaron las muestras mediante gel SDS-PAGE y Western Blot, usando un anticuerpo policlonal de ratón (1:2000). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

## 2. Papel del sistema de estrés de membrana Cpx en la regulación de los factores de virulencia de *Y. enterocolitica* O:8.

### 2.1. Efecto de las modificaciones del LPS sobre el sistema Cpx.

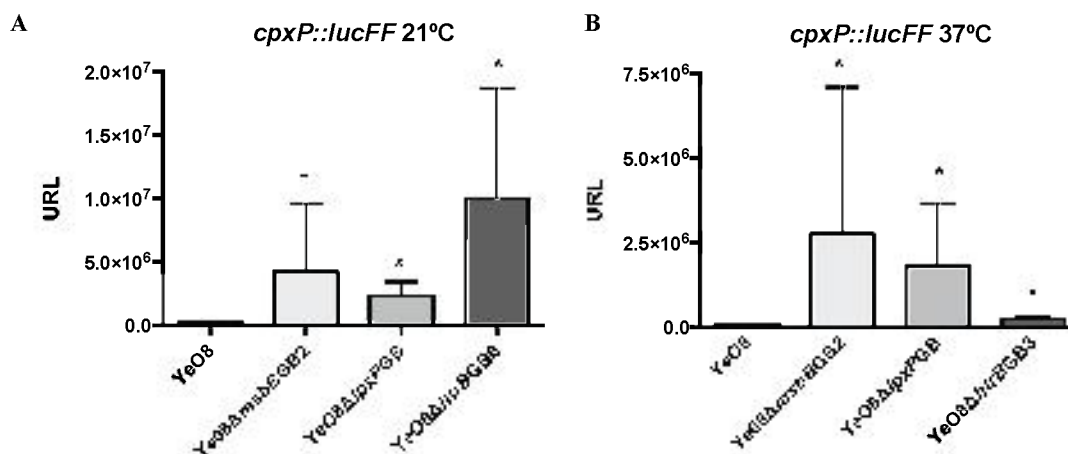
Alteraciones externas como pH alcalino, hormonas, osmolaridad, alteraciones de la envoltura celular y la acumulación de proteínas desplegadas en el periplasma activan el sistema de estrés de membrana Cpx. El sistema Cpx pertenece al grupo de los sistemas de transducción de dos componentes. Está compuesto por el sensor Kinasa CpxA anclado a la membrana interna, el regulador de respuesta citoplasmático CpxR y el inhibidor accesorio del periplasma CpxP que da respuesta a estímulos adicionales **(Bluelow y Raivio, 2010; Krell et al., 2010)**.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha observado que alteraciones en el LPS podrían activar los sistemas de estrés de membrana **(Pérez-Gutiérrez., 2010; Reinés et al., 2012B)**.

Con el fin de saber cómo las modificaciones del LPS afectaban al sistema de estrés de membrana, se construyeron fusiones transcripcionales en las que el gen de la luciferasa se encontraba bajo el control de las regiones promotoras del gen *cpxP* (materiales y métodos, apartado 4). Estas fusiones transcripcionales se introdujeron en el cromosoma de YeO8 y de diferentes mutantes de LPS y se midió la actividad luciferasa al crecer la bacteria a 21°C y a 37°C.

En primer lugar, se estudiaron las cepas con las mutaciones en los genes *msbB*, *htrB* y *lpxP*. Éstos genes son aciltransferasas responsables de añadir un C12, C14 y C16:1 en los últimos pasos de la síntesis del lípido A **(Pérez- Gutiérrez et al 2010)**.

Observamos, en la **Figura 30**, que la expresión de *cpxP* en los mutantes de las aciltransferasas era muy elevada respecto a la cepa silvestre, tanto a 21°C como a 37°C.

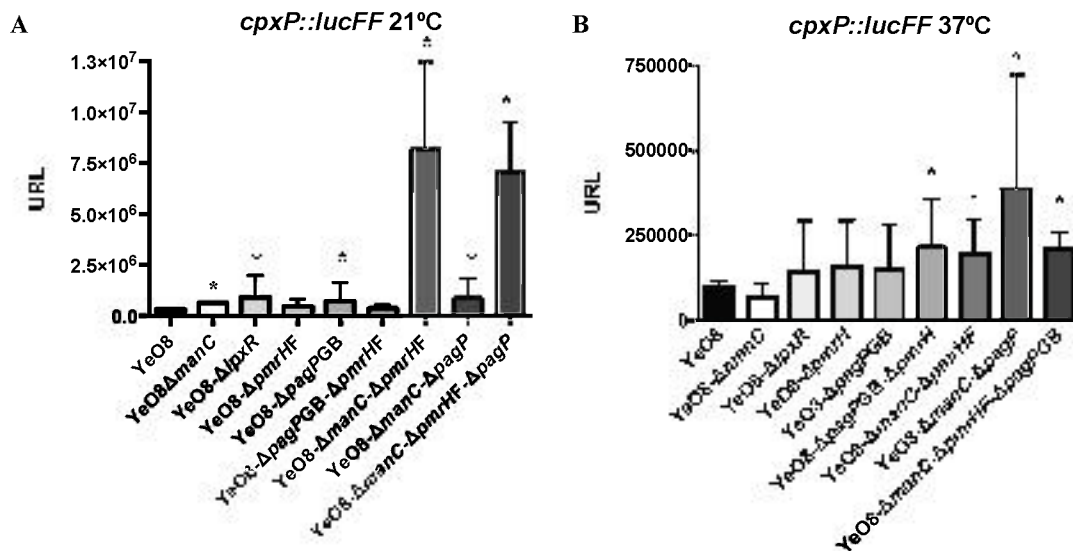


**Figura 30. Aumento de la expresión de *cpxP* en los mutantes de las aciltransferasas del lípido A.** Expresión de la fusión transcripcional *cpxP::lucFF* en la cepa silvestre (YeO8), y en los mutantes YeO8Δ*msbBGB2*, YeO8Δ*lpxPGB* y YeO8Δ*htrBGB* crecidos a 21°C (A) y a 37°C (B). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

A continuación, se estudió el efecto que produce el mutante rugoso *manC*, que carece de cadena O, así como el efecto de mutar el gen *lpxR* que carece de la deacilasa responsable de la estructura tetraacilada del lípido A a 37°C (Reinés et al., 2012B).

La síntesis y adición de aminoarabinosa al lípido A implica la actividad de las enzimas codificadas en el operón *pmrHFIJKLM* y el gen *ugd* (Trent et al., 2001). El gen *pagP* es el que codifica la acetiltransferasa que añade palmitato al lípido A (Guo et al., 1998). Estudiamos como estaría afectada la expresión de *cpxP* en los mutantes del operón *pmrH* y del gen *pagP*.

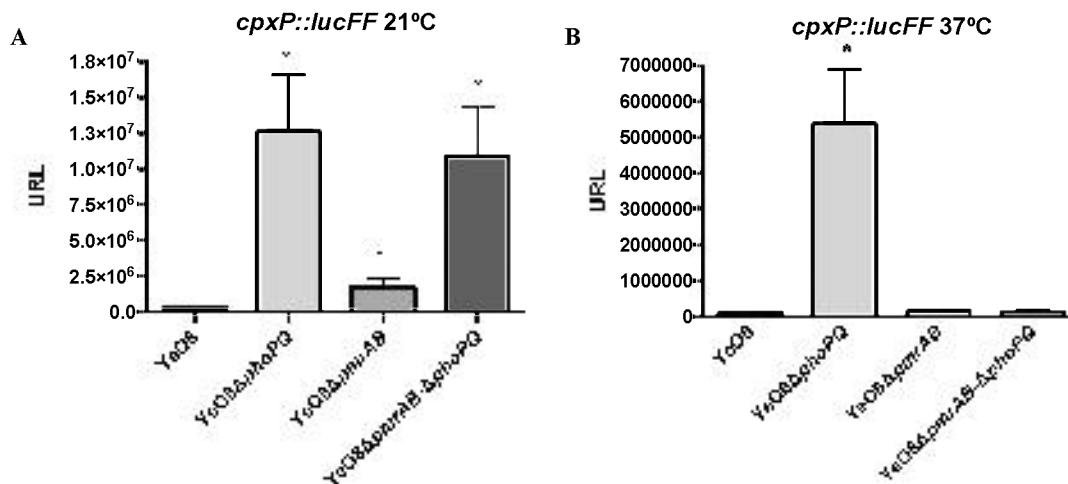
En la **Figura 31** observamos que la modificaciones en el lípido A activaban la expresión de *cpxP*. Así, A 21°C, la expresión de *cpxP* tanto en el mutante rugoso, como en el mutante en la deacilasa *lpxR* y en el mutante *pagP* era significativamente mayor respecto al de la cepa silvestre en el mutante rugoso *manC*, y el mutante doble *manC-pagP*. En el mutante doble *manC-pmrH* y el triple *manC-pmrH-pagP* eran los que presentaban mayores niveles de expresión de *cpxP* respecto a la cepa silvestre. A 37°C la expresión de *cpxP* era elevada de forma significativa en los mutantes dobles *pagP-pmrH*, *manC-pmrH*, *manC-pagP* respecto a la cepa silvestre.



**Figura 31. Aumento de la expresión de *cpxP* en los mutantes dobles de los genes responsables de las modificaciones del lípido A y cadena O.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *cpxP::lucFF* en la cepa silvestre (YeO8), y los mutantes YeO8Δ*manC*, YeO8Δ*lpxR*, YeO8Δ*pmrHF*, YeO8Δ*pagPGB*, YeO8Δ*pagPGB*-Δ*pmrHF*, YeO8Δ*manC*-Δ*pmrHF*, YeO8Δ*manC*-Δ*pagPGB*, YeO8Δ*manC*-Δ*pmrHF*-Δ*pagPGB* crecidos a 21°C (A) y a 37°C (B). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

Al observar que en los mutantes de los genes de las aciltransferasas y de las modificaciones en la estructura del lípido A y de la cadena O, sobretodo las causadas por los mutantes dobles y triples, producía una elevada expresión de *cpxP*, estudiamos si los sistemas reguladores de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB pudieran también estar implicados. Estos sistemas regulan la expresión de *pagP*, *ugd* y *pmrH*, responsables de las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa y palmitato (Reinés et al., 2012A).

Observamos en la **Figura 32**, el efecto de los sistemas de dos componentes sobre la expresión de *cpxP*. A 21°C los niveles de expresión de *cpxP* en los mutantes *phoPQ*, *pmrAB* y el mutante doble *pmrAB-phoPQ* eran significativamente superiores respecto a la cepa silvestre. A 37°C los niveles de expresión de *cpxP* en el mutante *phoPQ* eran superiores de forma significativa respecto a la cepa silvestre.

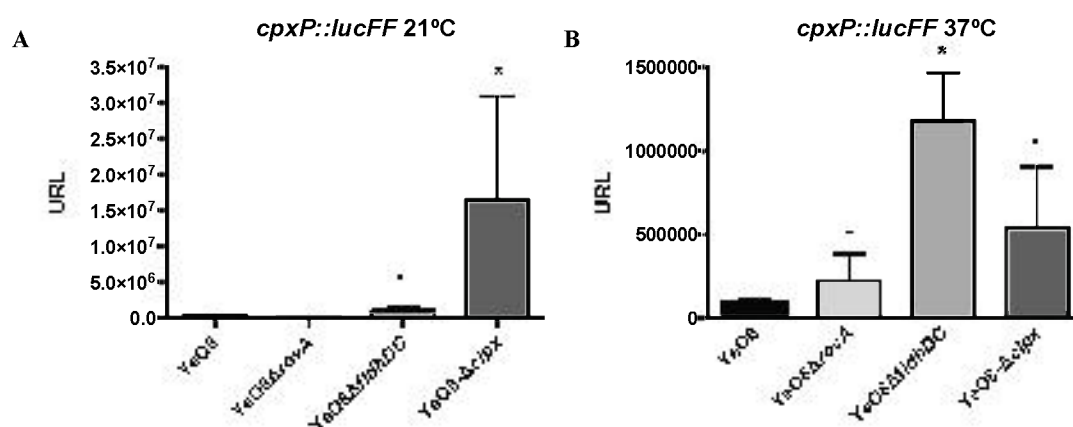


**Figura 32. Análisis de la expresión de *cpxP* en los mutantes de los sistemas de dos componentes.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *cpxP::lucFF* en la cepa silvestre (YeO8), y en los mutantes YeO8Δ*phoPQ*, YeO8Δ*pmrAB*, YeO8Δ*pmrAB*-Δ*phoPQ* cultivados a 21°C (A) y a 37°C (B). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test  $t$  de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

De la misma manera, también estudiamos cómo estaba afectada la transcripción de *cpxP* en un mutante de *rovA*, *flhDC* y *clpX*. El regulador transcripcional RovA es tal vez el mejor estudiado en *Yersinia*. A 21°C RovA actúa desplazando H-NS-YmoA de las regiones promotoras de *inv* activando su expresión. En cambio, a 37°C la expresión de invasin se encuentra inhibida por el complejo H-NS-YmoA (Ellison and Miller, 2006; Nieto et al., 2002; Revell and Miller, 2000). FlhDC además de su función como regulador de la síntesis del flagelo, es un regulador global que afecta a la expresión de un gran número de genes: genes implicados en el metabolismo, en concreto los implicados en el metabolismo del nitrógeno y en el ciclo de la urea (Kapatral et al., 2004). Además FlhDC inhibe la expresión de los genes *ysc* y *yop* a temperaturas inferiores a 37°C, posiblemente actuando también sobre su activador transcripcional VirF (Bleves et al., 2002) y regula la síntesis de la fosfolipasa A (YplA) (Schmiel et al., 2000). La proteína ClpX es una proteasa dependiente de ATP necesaria para regular los niveles de YmoA y para la correcta expresión del SSTT (Butler et al., 2006).

Observamos en la Figura 33 que a 21°C los niveles de expresión de *cpxP* en los mutantes *flhDC* y *clpX* eran significativamente superiores a los de la cepa silvestre.

A 37°C los niveles de expresión de los mutantes *rovA*, *flhDC* y *clpX* eran significativamente superiores respecto a la cepa silvestre.



**Figura 33. Análisis de la expresión de *cpxP* en los mutantes de los reguladores *rovA* y *flhDC*, así como y de la proteasa *clpX*.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *cpxP*::*lucFF* en la cepa silvestre (YeO8), y los mutantes YeO8Δ*rovA*, YeO8Δ*flhDC*, YeO8Δ*clpX* crecidos a 21°C (A) y a 37°C (B). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

## 2.2. Efecto de un mutante *cpxR* en los principales sistemas reguladores.

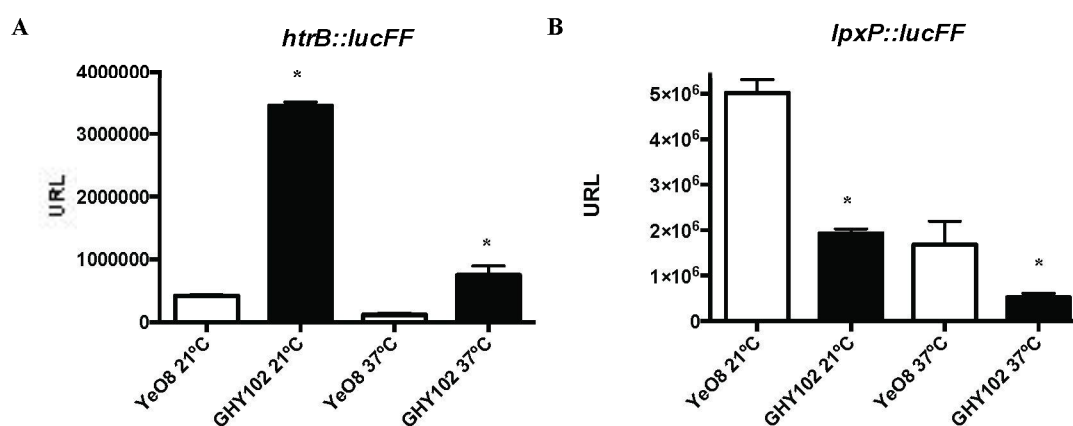
Resultados previos de este trabajo demuestran que las alteraciones en el LPS activan la expresión de *cpxP*. A continuación, nos planteamos cómo estaría afectada la expresión de los principales reguladores de la bacteria en un mutante *cpxR*. CpxR es el componente regulador del sistema Cpx que se encuentra en el citosol. En respuesta a un estímulo, *cpxP* se fosforila y activa o inhibe la expresión génica. Estos genes están implicados en el mantenimiento de la envoltura bacteriana, comunicación con otras vías reguladoras y la patogénesis. Esto sugiere que este sistema actúa integrando diversas señales y promueve la protección de la envoltura por múltiples vías (**Vogt and Raivio, 2012**).

Con el fin de estudiar de estudiar el papel de CpxR en *Y. enterocolitica* O:8, utilizamos un mutante *cpxR* para estudiar cómo estaba afectada la expresión de los principales reguladores implicados en el mantenimiento de las membranas bacterianas, modificaciones del LPS y síntesis del flagelo, se construyeron fusiones transcripcionales en las que el gen de la luciferasa se encontraba bajo el control de las

regiones promotoras de los genes *flhDC*, *mgta*, *inv*, *clpXP*, *htrB*, *lpxP*, *pagP*, *ugd*, *lpxR* y de los operones *pmrH*, *phoPQ* y *dacBpmrAB* (materiales y métodos, apartado 4). Estas fusiones transcripcionales se introdujeron en el cromosoma de YeO8 y del mutante *cpxR* (GHY102) para analizar los niveles de expresión de dichos genes y se midió la actividad luciferasa al crecer las bacterias a 21°C y a 37°C.

En primer lugar, estudiamos el efecto de CpxR en la expresión de las aciltransferasas *htrB* y *lpxP*.

Observamos en la **Figura 34** que a 21°C y a 37°C los niveles de expresión de *htrB* en el mutante *cpxR* eran significativamente superiores a los de la cepa silvestre. En cambio, los niveles de expresión de *lpxP* en el mutante *cpxR* eran significativamente inferiores a los de la cepa silvestre, tanto a 21°C como a 37°C. Estos resultados sugieren que CpxR actúa como de represor de la expresión del gen *htrB* y como activador de la expresión del gen *lpxP*.



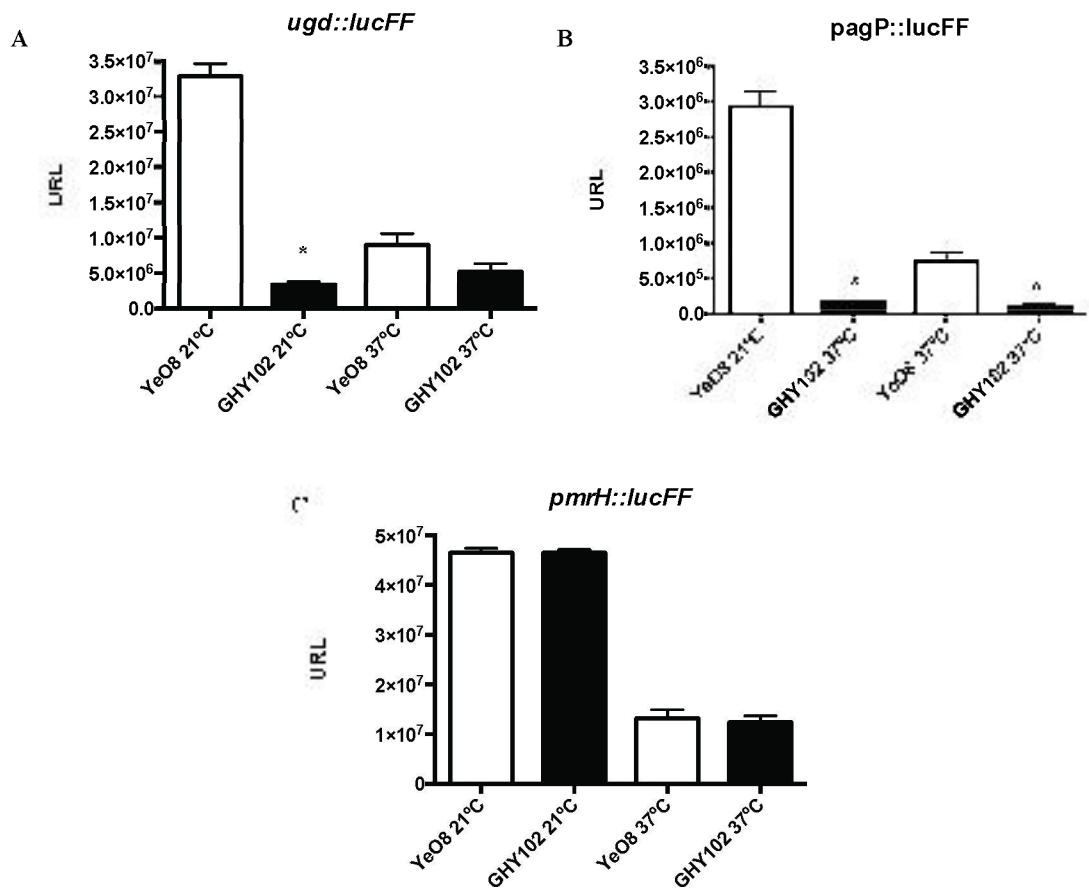
**Figura 34. Análisis de la expresión de las aciltransferasas *htrb* y *lpxP* en el mutante *cpxR*.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *htrB::lucFF* (A) y *lpxP::lucFF* (B) en la cepa silvestre (YeO8), y el mutante *cpxR* (GHY102). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) respecto a la cepa silvestre.

A continuación, estudiamos el efecto de CpxR sobre la expresión de los genes *ugd*, *pagP* y *pmrH* implicados en las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa y palmitato (Trent et al., 2001; Guo et al., 1998).

Los resultados muestran en la **Figura 35**, que los niveles de expresión de *ugd* en el mutante *cpxR* eran significativamente inferiores a los de la cepa silvestre a 21°C, en cambio a 37°C no se observaron diferencias (Figura 35A). Los niveles de expresión



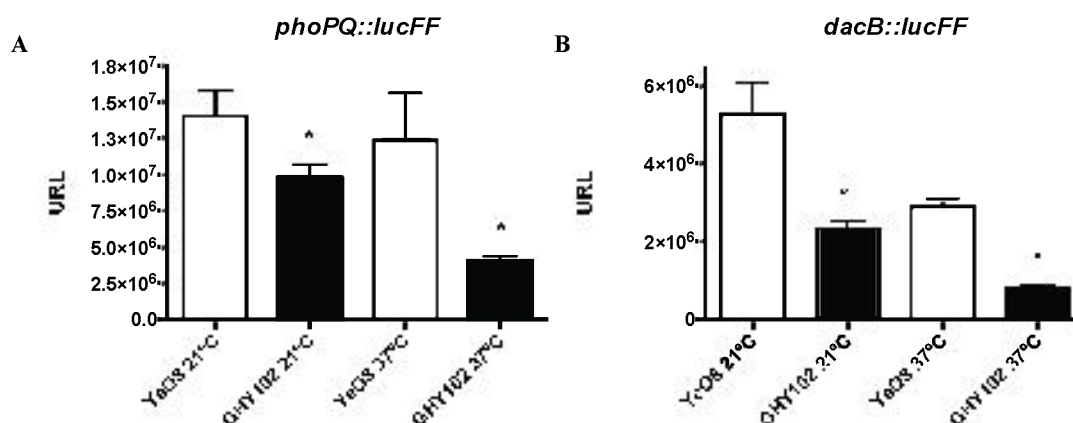
de *pagP* en el mutante *cpxR* eran significativamente inferiores respecto a la cepa silvestre tanto a 21°C como a 37°C (**Figura 35B**). Por último, los niveles de expresión de *prmH* en el mutante *cpxR* no estaban alterados (**Figura 35C**). En resumen, podríamos decir que CpxR ejerce una regulación positiva sobre la expresión del gen *pagP* a ambas temperaturas y del gen *ugd* a 21°C.



**Figura 35. Análisis de la expresión de los genes implicados en las modificaciones del lípido A en el mutante *cpxR*.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *ugd::lucFF* (A), *pagP::lucFF* (B) y *prmH::lucFF* (C) en la cepa silvestre (YeO8), y el mutante *cpxR* (GHY102). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

Después quisimos determinar si CpxR afectaba a la expresión de los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB, para ello analizamos la expresión de *phoPQ* y *pmrAB* en un mutante *cpxR*. Estos sistemas regulan la expresión de los genes *pagP*, *ugd* y *prmH* responsables de las modificaciones del lípido A con aminoarabinosa y palmitato en *Y. enterocolitica* O:8 (**Reinés et al., 2012A**).

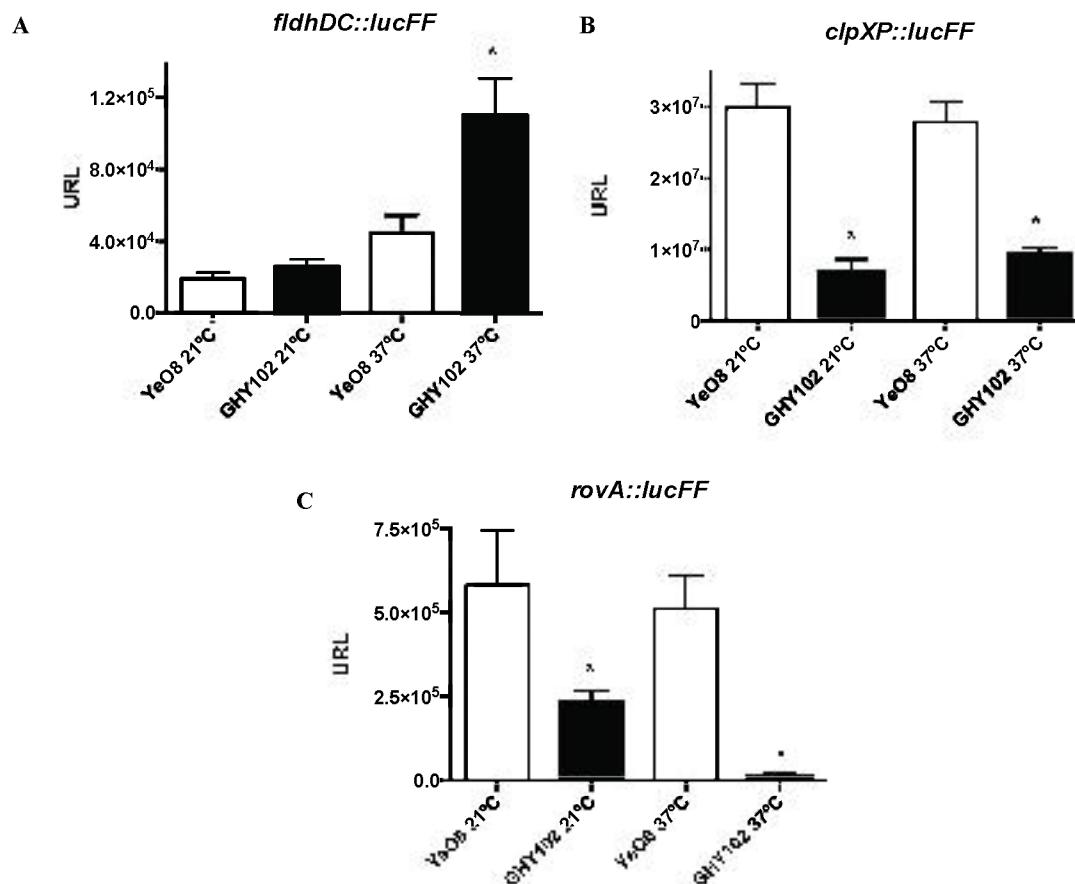
Observamos en la **Figura 36** que los niveles de expresión de *phoPQ* (**A**) y de *dacB* (**B**) en el mutante *cpxR* eran significativamente inferiores a los de la cepa silvestre a ambas temperaturas 21°C y 37°C. Estos resultados sugieren que CpxR ejerce una regulación positiva sobre la expresión de los genes *phoPQ* y *dacB*.



**Figura 36. Análisis de la expresión de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB en el mutante *cpxR*.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *phoPQ::lucFF* (A) y *dacB::lucFF* (B) en la cepa silvestre (Ye08), y el mutante *cpxR* (GHY102). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

A continuación, estudiamos la expresión de los genes *flhDC*, *clpXP* y *rovA*, en un mutante *cpxR*. Éstos genes están implicados en la regulación del flagelo (*flhDC*), de una proteasa (*clpXP*) y del regulador global (*rovA*).

Observamos en la **Figura 37** que los niveles de expresión de *flhDC* en el mutante *cpxR* eran significativamente superiores respecto a la cepa silvestre a 37°C (**A**). En cambio, los niveles de expresión del gen *clpXP* (**B**) y de *rovA* (**C**) en el mutante *cpxR* eran significativamente inferiores a los de la cepa silvestre tanto a 21°C como a 37°C. Por tanto, los resultados sugieren que CpxR actúa como regulador negativo a 37°C para el gen *flhDC* y de regulador positivo para los genes *clpXP* y *rovA* a ambas temperaturas.

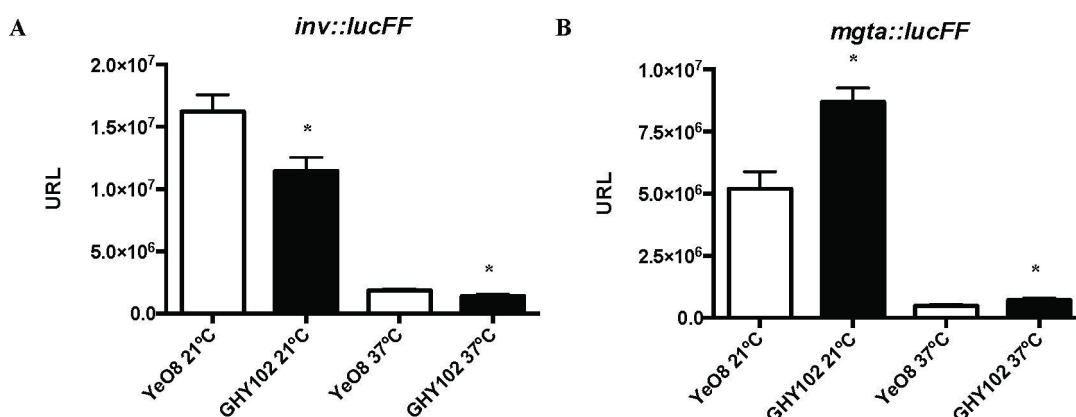


**Figura 37. Análisis de la expresión de la proteasa ClpXP y de los reguladores FlhDC y RovA en el mutante *cpxR*.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *flhDC::lucFF* (A), *clpXP::lucFF* (B) y *rovA::lucFF* (C) en la cepa silvestre (YeO8), y el mutante *cpxR* (GHY102). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre.

Por último, estudiamos la expresión de *inv* y de *mgta* en un mutante *cpxR*. Invasin es una proteína de la membrana externa de *Yersinia* y es el factor de invasión primario de *Y. enterocolitica* en el epitelio intestinal (Pepe et al., 1995). Se ha demostrado que RovA es el activador transcripcional de *inv* (Nagel et al., 2001). Experimentos anteriores demuestran que un mutante *cpxR* presenta unos niveles de expresión de *rovA* inferiores a los de la cepa silvestre, nos planteamos si también disminuiría la expresión de *inv* en un mutante *cpxR*.

Observamos que los niveles de expresión de *inv* en el mutante *cpxR* eran significativamente inferiores a los de la cepa silvestre (**Figura 38A**). Este resultado sugiere que CpxR también ejerce una regulación positiva sobre el gen *inv*.

Mgta es una proteína ATPasa transportadora de magnesio, se ha descrito que su expresión en *E. coli* esta regulada por la limitación de magnesio y depende de PhoP y PhoQ (**Kato et al., 1999**). En *Y. enterocolitica* *mgta* responde a la concentración de  $Mg^{2+}$  regulando la expresión de la proteína transportadora de magnesio (**Korth y Sigel, 2012**). Estudiamos si en el mutante *cpxR* que ejercía una regulación positiva en la expresión de *phoPQ* también afectaba a la expresión de *mgta*. Observamos en la **Figura 38B** que CpxR ejerce una regulación negativa sobre la expresión del gen *mgta*.



**Figura 38. Análisis de la expresión de la adhesina invasiva y de la proteína Mgta en el mutante *cpxR*.** Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *inv::lucFF* (A) y *mgta::lucFF* (C) en la cepa silvestre (YeO8), y el mutante *cpxR* (GHY102). Los datos expuestos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. \* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ , test *t* de Student de dos colas) respecto a la cepa silvestre.

### 2.3. El sistema Cpx y los péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos desempeñan un papel clave en la defensa del huésped frente a las infecciones. Existe cierta diversidad en cuanto a tamaño y estructura pero todos comparten dos características importantes que determinan su mecanismo de

acción: son catiónicos y de naturaleza anfipática (**Brogden et al., 2005; Nicolas and Mor, 1995**). En un primer paso, los péptidos catiónicos interactúan electrostáticamente con las cargas negativas del LPS localizadas en el núcleo y en el lípido A. Seguidamente, esta interacción produce un desplazamiento de los cationes divalentes asociados al LPS lo que causa una desestabilización de la membrana externa (**Nikaido et al., 2003; Vaara et al., 1992**).

Con el objetivo de definir si el sistema Cpx tenía una contribución relativa en la resistencia a PAs, se realizaron ensayos de difusión radial con polimixina B (materiales y métodos 5.2.) con el mutante *cpxR* (GHY102) y con la cepa silvestre YeO8 a 21°C y a 37°C. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) (**Tabla 4**) y se puede observar como a 21°C la concentración mínima de polimixina B necesaria para inhibir el crecimiento del mutante *cpxR* era de 0,9472 µg/ml siendo significativamente más bajo que para la cepa silvestre que era del orden de 4,36 µg/ml. A 37°C, el mutante *cpxR* también era significativamente más sensible que la cepa silvestre a la polimixina B, obteniendo unos valores de CMI de 0.3403 µg/ml para el mutante *cpxR* y de 0.6235 µg/ml para la cepa silvestre. Por lo tanto, los datos sugieren que CpxR juega un papel en la resistencia a la polimixina B porque su falta aumenta la sensibilidad a este PA.

**Tabla 4.** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de PxB para YeO8 y GHY102

Cepa	CMI 21°C	CMI 37°C
YeO8	4,36 µg/ml	0,6235 µg/ml
GHY102	0,9472* µg/ml	0,3403* µg/ml

\* indica una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) comparando con la cepa silvestre a la misma temperatura.

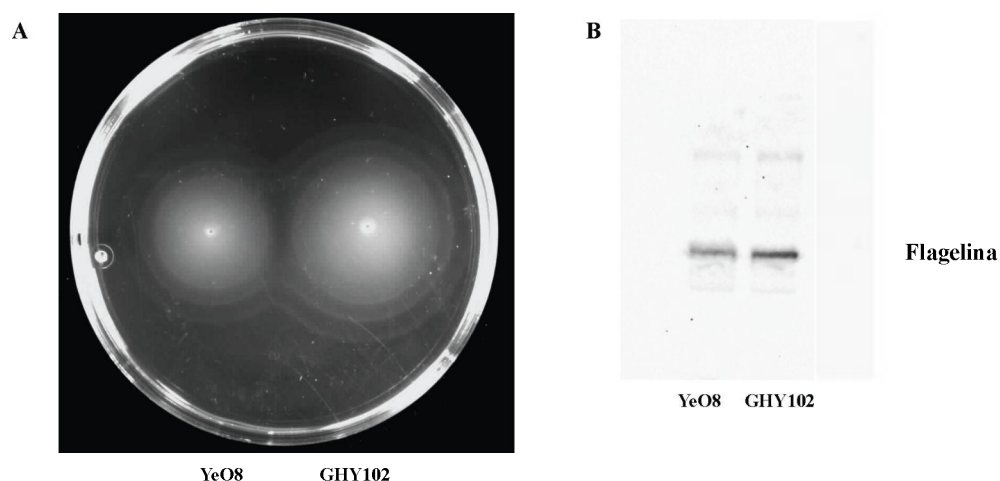
## 2.4. Relación entre el sistema Cpx y la expresión de factores de virulencia.

### 2.4.1. Ensayo de movilidad.

*Y. enterocolitica* presenta movilidad a un rango de temperaturas de entre 21°C y 29°C (**Kapatral and Minnich, 1995; Niléhn et al., 1969**). Varios estudios han demostrado

que existe una correlación entre movilidad, los niveles de producción de flagelina, y la expresión de *flhDC* que codifica el principal complejo de regulación del flagelo (Bengoechea et al., 2004; Young et al., 1999B).

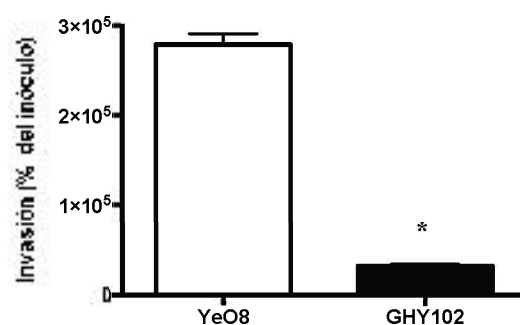
En resultados previos observamos que los niveles de expresión de *flhDC* en el mutante *cpxR* eran significativamente superiores a los de la cepa silvestre, especialmente a 37°C. Nos planteamos si la mayor expresión de *flhDC* se correlacionaba con una mayor movilidad y, a la vez, con una mayor producción de flagelina en la bacteria. Para determinar la movilidad se cuantificó la migración de la cepa silvestre y del mutante *cpxR* tras ser cultivarlas a 21°C en medio 1% triptona-0,3% agar (Young et al., 1999B). En la Figura 39A se pudo observar como el mutante *cpxR* presentó mayor motilidad que la cepa silvestre. A continuación, se determinó la cantidad de flagelina producida por la bacteria cultivándolas a 21°C y analizando los niveles de flagelina mediante Western Blot. En la Figura 39B se puede observar que la producción de flagelina era mayor en la cepa GHY102 (mutante *cpxR*) que en la cepa silvestre.



**Figura 39. Análisis de la motilidad y los niveles de flagelina en la cepa silvestre de *Y. enterocolitica* O:8 y el mutante *cpxR*.** (A) Movilidad de las cepas YeO8 y GHY102 (*cpxR*) cultivadas a 21°C. (B) Análisis por Western Blot de los niveles de la producción de flagelina de las cepas YeO8 y GHY102 cultivadas a 21°C.

### 2.4.2. Invasin

Invasin es una proteína de la membrana externa y es el factor de invasión primario de *Y. enterocolitica* en el epitelio intestinal (Pepe et al., 1995). Invasin es importante en las primeras fases del proceso de infección. Su expresión es máxima a 25°C y está reprimida a 37°C en *Y. enterocolitica* O:8 (Wyborn et al., 2004; Uliczka et al., 2011). Un mutante deficiente en esta proteína no coloniza eficientemente las Placas de Peyer en los primeros estadios de la infección (Pepe and Miller, 1993). Resultados previos sugieren que la expresión de invasin está reducida en el mutante *cpxR*. Por consiguiente, nos planteamos realizar el ensayo de invasión en células epiteliales humanas A549 para estudiar si la invasión estaba afectada. Los resultados indican, en la Figura 44, que la invasión a las células epiteliales A549 en el mutante *cpxR* estaba disminuida significativamente respecto a la cepa silvestre.



**Figura 40. Invasión a células epiteliales A549 en el mutante *cpxR*.** Crecimiento de las cepas bacterianas en LB a 21°C, induciendo con arabinosa 0.2% la última hora y posterior infección a las células epiteliales (25:1) durante 1 hora. Los resultados están expresados como porcentaje del inóculo, y son representativos de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante Student t test, \* indica una diferencia significativa respecto a la cepa silvestre YeO8 ( $P < 0,05$ ).

### 2.4.3. Factores de virulencia codificados en el plásmido pYV y el sistema Cpx.

En estudios previos se ha demostrado que la activación del sistema Cpx reduce la transcripción de los SSTT (Macritchie et al., 2008B). En *Y. pseudotuberculosis* se ha demostrado la relación entre Cpx y el SSTT Ysc-Yop. En un mutante *cpxA* la secreción de Yops se ve disminuida debido a un defecto en algunas proteínas estructurales del SSTT y a una menor transcripción de algunos efectores Yop

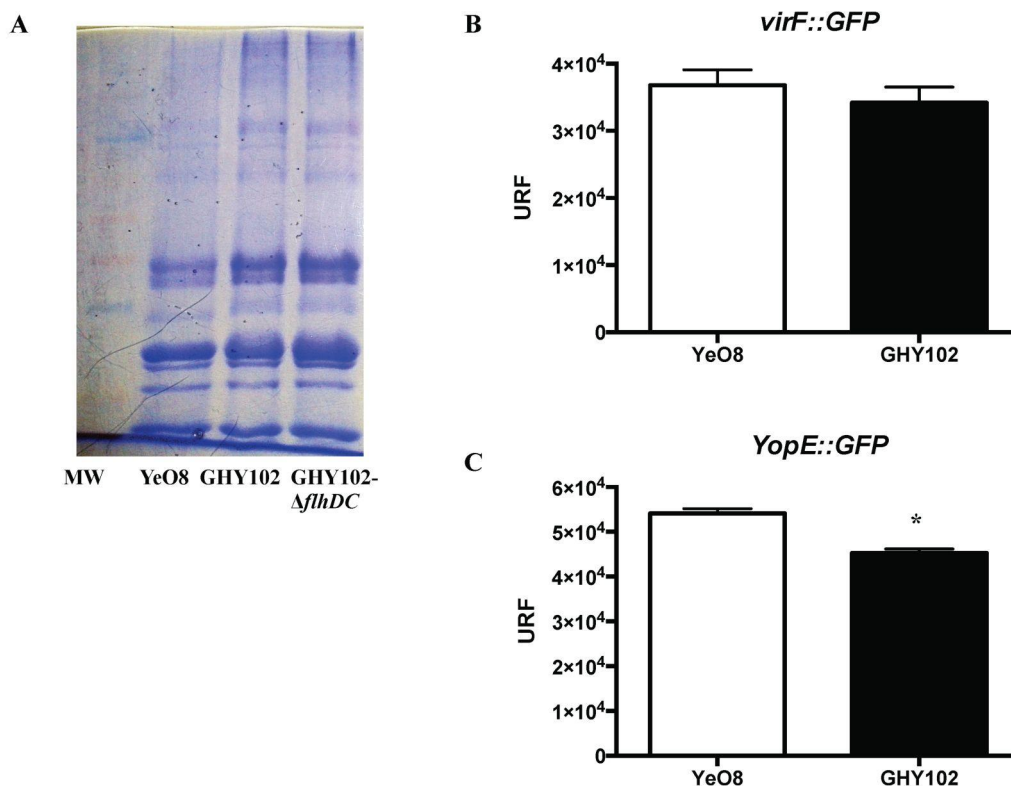
(**Carlsson et al., 2007B**). Este efecto se debe a la acumulación de CpxP fosforilado que se une directamente al promotor inhibiendo la transcripción de genes del SSTT Ysc-Yop (**Liu et al., 2012**).

Por consiguiente, estudiamos si el SSTT, codificado en el plásmido de virulencia pYV, también estaba afectado por la activación del sistema Cpx en *Y. enterocolitica* O:8. A 37°C y concentraciones bajas de calcio, el SSTT secreta una serie de proteínas efectoras denominadas Yops que permiten a la bacteria multiplicarse extracelularmente en los tejidos linfoides (**Cornelis et al., 2002; Cornelis y Wolf-Watz, 1997**). Se analizó la secreción de Yops en el mutante *cpxR* y como se puede observar en la **Figura 41A**, el mutante secretó más Yops que la cepa silvestre. Utilizamos el mutante doble *cpxR-flhDC*, como control de que el aumento en la secreción fuera debida a una sobreexpresión de *flhDC* del flagelo, su secreción fue igual que la del mutante *cpxR*, descartando así que el aumento de la secreción fuera efecto de la sobreexpresión de *flhDC* en el mutante *cpxR*.

La transcripción de los genes *ysc* y *yop* está regulada por la temperatura, es máxima a 37°C. VirF el activador transcripcional que controla este proceso (**Cornelis et al., 1989, Cornelis et al., 1998B, Lambert de Rouvroit et al., 1992, Skurnik et al., 1992**). CpxR fosforilado se une directamente a la región promotora de Ysc-Yop impidiendo de esta forma la transcripción de estos genes (**Liu et al., 2012**). Con el fin de estudiar si la expresión del activador transcripcional VirF en un munte *cpxR* estaba afectada a 37°C, clonamos las regiones promotoras de *virF* en el plásmido pPROBE'-gfp[LVA] y determinamos la expresión de *virF* mediante un ensayo de fluorescencia. Los resultados sugieren que la expresión de *virF* a 37°C no estaba afectada en el mutante *cpxR* ya que los niveles de expresión de *virF* a esta temperatura eran similares a los expresados por la cepa silvestre (**Figura 41B**).

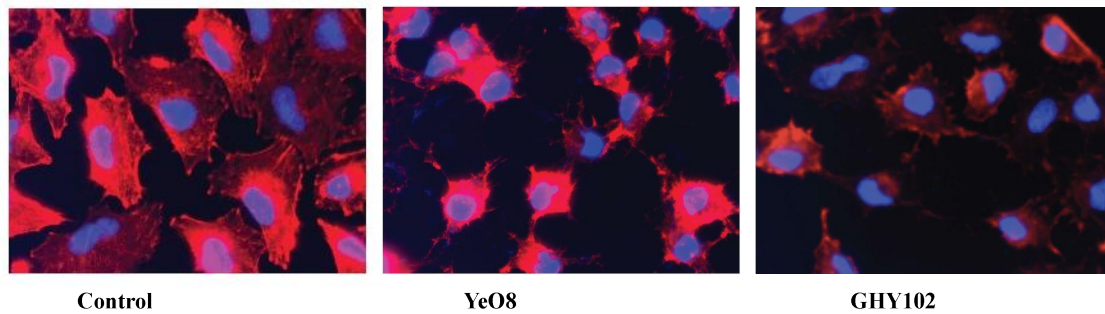
La proteína YopE es la principal proteína Yop responsable de la citotoxicidad celular. Al estar aumentado el patrón de secreción de estas proteínas en un mutante *cpxR*, nos planteamos si la expresión de YopE estaba aumentada en el mutante *cpxR*. Las regiones promotoras has de posar de del gen *yopE* se clonaron en el plásmido pPROBE'-gfp[LVA]. Sorprendentemente, las medidas de fluorescencia determinaron que la expresión de *yopE* a 37°C estaba disminuida de forma significativa en el mutante *cpxR* (**Figura 41C**).





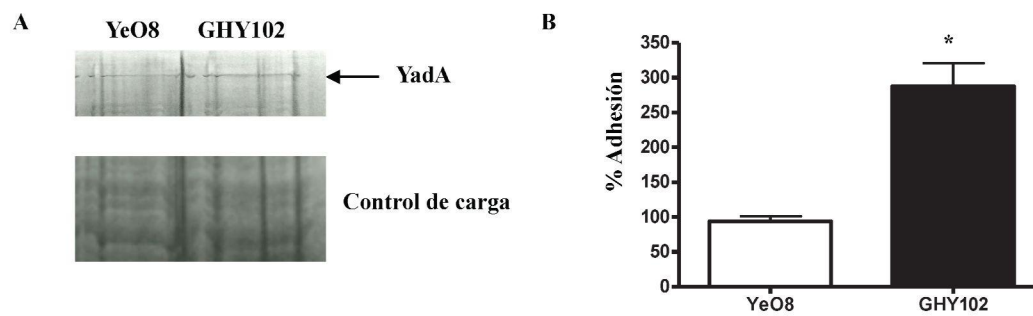
**Figura 41. Análisis de la secreción de Yops y de la expresión de *virF* y *yopE* en un mutante *cpxR*.** (A) Electroforesis de las proteínas Yops presentes en los sobrenadantes de los cultivos de YeO8, GHY102 y GHY102 $\Delta flhDC$  en condiciones de restricción de Ca<sup>2+</sup> analizados mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Análisis de la expresión de *virF* (B) y *yopE* (C) en YeO8 y GHY102, mediante la medición de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *virF::gfp* y *yopE::gfp*. Las cepas se cultivaron a 37°C. Los datos expuestos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. \*, indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ , *t* Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a la misma temperatura.

Seguidamente, se determinó el nivel de citotoxicidad en células epiteliales A549 tras una infección con el mutante *cpxR*. La inyección de YopE al citosol de las células A549 por parte de YeO8 induce la disrupción y condensación de la estructura de los filamentos de actina de las células (Rosqvist et al., 1991; Pawel-Rammingen et al., 2000). Este fenómeno recibe el nombre de citotoxicidad y es una de las formas más sensibles para detectar la translocación de YopE al citosol de la célula eucariota (Rosqvist y Wolf-Watz, 1986). El mutante *cpxR* alteró el citoesqueleto de las células A549 de la misma manera que la cepa silvestre (Figura 42). Las células sin infectar se utilizaron como control.



**Figura 42. Análisis del efecto citotóxico del mutante *cpxR*.** Microscopía de fluorescencia de células epiteliales A549 infectadas con YeO8 y GHY102, cultivadas en LB. Tinción del citoesqueleto con Faloidina (rojo) y el núcleo con Hoescht (azul), tras 1 hora de infección. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Estudiamos si el sistema Cpx afectaba a la expresión de YadA. YadA también es otro factor de virulencia codificado en el plásmido pYV y que sólo se expresa a 37°C (**Skurnik y Toivanen, 1993**). Esta proteína se localiza en la membrana externa de la bacteria y esta implicada en la virulencia, en la adhesión a células eucariotas, la unión al colágeno  $\alpha 1$  y en la resistencia al complemento (**El Tahir y Skurnik, 2001**). Nos planteamos si la cantidad de proteína YadA estaba afectada en el mutante *cpxR*. La expresión de YadA se analizó mediante SDS-PAGE seguido de una tinción de azul de Coomassie. Los resultados muestran que el mutante *cpxR* expresó más cantidad de proteína YadA en su membrana que la cepa silvestre (**Figura 43A**). A continuación, para determinar si la funcionalidad de YadA estaba alterada en el mutante *cpxR*, se realizó un experimento de adhesión a colágeno humano de tipo I. Al total de bacterias adheridas de la cepa silvestre se le dio el 100% de adhesión, las bacterias adheridas al colágeno correspondientes al mutante *cpxR* se expresaron en función de la cepa silvestre. Se obtuvo que el mutante *cpxR* tenía una adhesión en torno al 300% (**Figura 43B**).



**Figura 41. Análisis de la expresión de YadA en el mutante *cpxR*.** (A) Análisis mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie de las bacterias lisadas crecidas a 37°C en RPMI1640. La proteína YadA se indica con una flecha. (B) Análisis gráfico de la adhesión a colágeno humano de la cepa YeO8 y GHY102 a 37°C. Resultados expresados en % de bacterias adheridas. Los datos expuestos representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. \*, indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ , *t* Student de dos colas) con respecto a la cepa silvestre crecida a la misma temperatura.

Todos estos datos sugieren que el sistema Cpx actúa de sensor de las alteraciones en el LPS y la membrana externa. Como respuesta regula la expresión de los genes relacionados con las modificaciones del LPS y de los factores de virulencia codificados tanto en el plásmido pYV como en el cromosoma.



## **DISCUSIÓN**



## 1. Estudio de la relación entre la longitud de la cadena O del lipopolisacárido y la función de los sistemas tipo III de secreción.

Las bacterias gram negativas poseen en sus membranas externas diversas estructuras adaptadas a sus funciones como pueden ser el LPS, las adhesinas y los sistemas de secreción, entre otros. Todos ellos están regulados y coordinados para su correcta función tanto defensiva como ofensiva/virulencia. En el caso de las especies del género *Yersinia* existe una fuerte regulación por la temperatura que afecta a estas estructuras externas y a la virulencia. Algunos de los factores de virulencia se activan a 21°C, temperatura óptima de crecimiento, mientras que otros son activados a 37°C, temperatura del huésped (Cornelis et al., 1997). El SSTT Ysc requiere el contacto íntimo entre la bacteria y una célula eucariota a 37°C, además de un contexto con bajo  $Ca^{2+}$ , es condición imprescindible para la secreción y translocación de las proteínas Yops a través del inyectiosoma (Cornelis et al., 2002B., Cornelis et al., 2006). La longitud de la aguja del inyectiosoma varía entre diferentes especies bacterianas, incluso entre distintas cepas de la misma especie y esta regulada específicamente por la proteína YscP (Journet et al., 2003; Wagner et al., 2010). El control de la longitud de la aguja ha sido estudiado por diferentes grupos, proponiendo que una longitud de aguja específica es necesaria para interaccionar directamente con la membrana de la célula diana y que esta longitud se correlaciona con otras estructuras de la membrana como LPS y las adhesinas (Journet et al., 2003; Minamino et al., 2005; Mota et al., 2005; West et al., 2005).

En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que existe una relación entre la longitud de la cadena O y la funcionalidad del SSTT Ysc. Nuestros resultados demuestran que la longitud de la cadena O está optimizada para la virulencia. El LPS de *Yersinia enterocolitica* O:8 está regulado por la temperatura, presentando mayor expresión de cadena O a 21°C que a 37°C. Además, la longitud de la cadena O es mayor a 21°C que a 37°C (Bengoechea et al., 2002A). Para demostrar nuestra hipótesis, construimos cepas de diferentes longitudes de cadena O en las que se pierde la regulación típica por la temperatura al ser inducida su expresión con arabinosa, es decir, que la longitud de la cadena O a 21°C es la misma que a 37°C. Con todos los experimentos demostramos que al expresar cadenas O largas el SSTT es menos

eficiente. Probablemente porque una mayor longitud de la cadena O del LPS crea un impedimento estérico que impide que la aguja del inyectiosoma pueda interactuar eficientemente con la célula diana, lo que conlleva a una menor translocación de los efectores al citosol de la célula y la respectiva pérdida de citotoxicidad observada en el epitelio. Lo mismo ocurre en los macrófagos, el impedimento de las cadenas largas hace que la bacteria no pueda translocar eficientemente las proteínas antifagocíticas y citotóxicas, provocando un aumento en la cantidad de bacterias internalizadas y una disminución de la citotoxicidad en los macrófagos. Sin embargo, la longitud de la cadena O no afecta a la adhesión mediada por YadA y por Invasin. Tampoco observamos que la secreción de Yops *in vitro* estuviera afectada por la longitud de la cadena O, probablemente porque la secreción en este caso no depende de la interacción con una diana y por tanto la longitud de la cadena O no afecta al proceso. Los datos de expresión de *virF* y *yopE* refuerzan nuestra hipótesis de que la longitud de la cadena O sólo afecta de manera estérica a la interacción con su diana, porque que la expresión del regulador transcripcional VirF no este afectada significa que el SSTT Ysc se forma de manera correcta así como la expresión de la proteína YopE que indica que los efectores se están expresando de manera correcta, por tanto, en conjunto, el SSTT es totalmente funcional independientemente de la longitud de la cadena O.

Para reforzar nuestra hipótesis creamos cepas con inyectiosoma más largo al de *Y. enterocolitica* O:8. La aguja de *Yersinia enterocolitica* mide 65 nm de longitud (**Wagner et al., 2010**). Construimos mutantes *yscP* complementados con el plásmido pLM21 que codifica la proteína YscP<sub>686</sub> de gran tamaño, dando lugar a cepas de *Y. enterocolitica* O:8 con longitud de aguja más larga que la cepa silvestre, de aproximadamente  $100 \pm 12$  nm de longitud (**Wagner et al., 2010**). Al estudiar en éstas cepas el efecto de la longitud de la cadena O obtuvimos un aumento en la citotoxicidad en las cepas con cadenas O largas debido a un aumento en la translocación de efectores al citosol del epitelio, respecto a los resultados anteriores. Obtuvimos también, una disminución en la cantidad de bacterias internalizadas por los macrófagos. Estos resultados reforzaron los anteriores sugiriendo que las cadenas O largas impedían de manera menos notable la interacción del inyectiosoma con la célula diana debido a que éste era más largo y por tanto el impedimento era menor. Un dato sorprendente, fue que éstas cepas tenían reducida la secreción de proteínas



Yop *in vitro*, una posible explicación sería que al ser mutantes dobles todo el sistema funcionara un poco peor o que la secreción al medio estuviera ralentizada.

Nuestra hipótesis sugiere que la longitud de la cadena O influye en la funcionalidad del STT. Una longitud corta de cadena O es la que mejor funciona en todos los casos. La longitud óptima de *Y. enterocolitica* O:8 es aquella en la que se encuentra en la cepa silvestre a 37°C, mientras que para *Y. pseudotuberculosis* O:1B su longitud óptima de cadena O es menor a la de su cepa silvestre a 37°C.

## **2. Papel del sistema de estrés de membrana Cpx en la regulación de los factores de virulencia de *Y. enterocolitica* O:8.**

Las bacterias poseen diversos sistemas de estrés de membrana que detectan alteraciones externas que afectan a la estructura de su envoltura, dando lugar a una desestabilización de las membranas y la pérdida de la homeostasis de la bacteria. Estos sistemas se activan en respuesta a determinadas señales y dan lugar a respuestas específicas para reparar el daño de las membranas. En el cromosoma de *Y. enterocolitica* están codificados los sistemas de estrés extracitoplasmático Psp (“phage-shock-protein”), Cpx, y RpoE (sigma E). El sistema Psp responde específicamente a la deslocalización de secretinas de la membrana externa que tienen como efecto la disipación del gradiente electroquímico de la membrana (**Darwin y Miller, 2001; Lloyd et al., 2004; Maxson y Darwin, 2004**). Estas secretinas son componentes estructurales de los STT. En *Y. enterocolitica*, el sistema Psp es esencial cuando el STT Ysc-Yop está formado, su función es aliviar /prevenir el estrés causado por el STT Ysc-Yop (**Flores-Kim et al., 2012**). Además, se ha demostrado que el sistema Psp es esencial para la virulencia de *Y. enterocolitica* en el modelo de infección oral de ratón (**Darwin y Miller, 1999; Darwin y Miller, 2001**). El sistema Cpx responde específicamente a la desnaturalización de proteínas de las estructuras de la envoltura como pueden ser el flagelo, las porinas, los sistemas de secreción y las adhesinas (**Silhavy et al., 2010**). Estas complejas estructuras están formadas por subunidades de proteínas que requieren un control adecuado de los procesos de síntesis, exportación, plegamiento y ensamblaje para garantizar la funcionalidad de cada estructura (**Ruiz y Silhavy, 2005**). Las alteraciones que interfieren en estos procesos activan el sistema Cpx que responde no sólo regulando la expresión de los

factores de plegamiento y proteasas, sino que también actúa regulando la expresión de las estructuras de superficie (Dorel et al., 2006., Vogt et al., 2010). Distintos estudios sugieren que el sistema Cpx podría estar implicado en la regulación de los sistemas de virulencia. En *E.coli* enteropatógena, el sistema Cpx está relacionado con la biogénesis y expresión del pili, siendo un factor importante para su virulencia (Roberts et al., 1994). En *Y. pseudotuberculosis*, se ha relacionado el sistema Cpx con la correcta funcionalidad del SSTT Ysc-Yop y la expresión de invasin (Carlsson et al., 2007A y B). En nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios que sugieren que los cambios en el lípido A de *Y. enterocolitica* podrían activar los sistemas de estrés de membrana sigma E y Cpx (Pérez-Gutiérrez et al., 2010; Reinés et al., 2012B). Por último, el sistema sigma E se encarga del correcto ensamblaje de las proteínas de la membrana externa. En presencia de estrés, sigma E actúa controlando la expresión de los genes involucrados en el plegamiento y degradación de las proteínas de la membrana externa (Raivio et al., 2001). El gen *rpoE* codifica el factor sigma E en *Y. enterocolitica*. Como en *E. coli*, este gen es esencial para el crecimiento y su expresión está autoregulada (Heusipp et al., 2003).

El sistema Cpx es un sensor que detecta cambios en el estado de la envoltura, en esta tesis doctoral hemos estudiado las alteraciones en el LPS y en la envoltura que activan este sensor. Las alteraciones en la estructura del lípido A en los mutantes en los genes *msbB*, *htrB* y *lpxP* de las aciltransferasas activan el sistema Cpx. Éstos genes son aciltransferasas responsables de añadir un C12, C14 y C16:1 en los últimos pasos de la síntesis del lípido A (Pérez-Gutiérrez et al., 2010). Los mutantes en los genes responsables de las modificaciones del lípido A con aminoarabina y palmitato (Reinés et al., 2012A) también activan el sistema Cpx a 21°C, así como un mutante *lpxR* que carece de la deacilasa responsable de la estructura tetraacilada del lípido A a 37°C (Reinés et al., 2012B) y el mutante *manC* que no expresa cadena O. La activación del sistema Cpx se incrementa en los mutantes dobles y triples de los genes anteriores, la activación se produce tanto a 21°C como a 37°C. Estas modificaciones del lípido A están reguladas por los sistemas reguladores PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB (Reinés et al., 2012A), los mutantes de estos genes activan el sistema Cpx a 21°C y el mutante *phoPQ* también a 37°C. Este sensor también es sensible a alteraciones en el flagelo, de este modo un mutante *flhDC* activa el sistema Cpx tanto a 21°C como a 37°C. También es sensible a un mutante del regulador *rovA* a 37°C, así como a un

mutante de la proteasa ClpX encargada de regular los niveles de YmoA y necesaria para la correcta expresión del SSTT (**Butler et al., 2006**).

Los PAs suelen ser moléculas con carga positiva (catiónicas) de carácter anfipático (**Brogden et al., 2005, Nicolas et al., 1995**) que interaccionan de forma electrostática con las cargas negativas del LPS presentes en el núcleo y lípido A del LPS. Esto produce un desplazamiento de los cationes divalentes asociados al LPS lo que causa una desestabilización de la membrana externa. Nuestros datos sugieren que el sistema Cpx podría estar implicado en la resistencia a PAs protegiendo a la bacteria de los daños estructurales causados por los PAs.

También se han intentado esclarecer los cambios transcripcionales regulados por el sistema Cpx. Hemos visto que el sistema Cpx es sensible a alteraciones que afectan a la envoltura de la membrana, el sistema Cpx responde a estos daños regulando la expresión génica. Nuestros datos sugieren que el sistema Cpx regula la expresión de los genes implicados en las modificaciones del lípido A del LPS, así como la expresión de los sistemas que regulan estas modificaciones. También está relacionado con la expresión del regulador del flagelo y del regulador global RovA. El sistema Cpx también regula la expresión de la proteasa ClpX y del transportador de magnesio Mgta (**Korth y Sigel, 2012**).

El sistema Cpx también podría estar implicado en la regulación de la expresión de los factores de virulencia como apuntan distintos estudios. En la presente tesis doctoral hemos demostrado la implicación del sistema Cpx en la expresión de los factores de virulencia de *Y. enterocolitica*. Los resultados obtenidos demuestran que los factores de virulencia están regulados por el sistema Cpx, de este modo, un mutante *cpxR* tiene aumentada la producción de proteínas Yop, así como una disminución de la adhesina invasin que se traduce en una disminución de la invasión al epitelio y un aumento en la producción de la proteína YadA que produce un aumento en la adhesión. Por último, el mutante también tiene aumentada la producción de flagelina y por tanto produce un aumento en la movilidad de la bacteria.



## **CONCLUSIONES**



1. Mediante Wzz heterólogas creamos cepas con cadenas O de longitud variable, perdiendo la regulación por la temperatura típica de la cepa silvestre al ser inducidas con arabinosa.
2. A mayor longitud de la cadena O menor es el efecto citotóxico
3. La longitud de la cadena O no afecta a la secreción de proteínas Yop *in vitro*.
4. La longitud de la cadena O no afecta a la adhesión e invasión del epitelio.
5. La longitud de la cadena O no afecta a la adhesión a colágeno humano.
6. La cantidad de proteína YopE translocada al citosol de las células epiteliales se ve reducida en cadenas O largas.
7. La cantidad de bacterias internalizadas en los macrófagos se ve aumentada en las cepas de cadenas O largas.
8. La citotoxicidad en macrófagos se ve disminuida en cadenas O largas.
9. La longitud de la cadena O no afecta a la expresión de *virF* y *yopE*.
10. Mediante YscP heterólogas creamos cepas con inyectiosoma más largo al de *Y. enterocolitica* O:8. Estudiamos en éstas el efecto de la longitud de la cadena O.
11. Al expresar inyectiosoma largo, hay un aumento de la citotoxicidad en cadenas O largas.
12. Al expresar inyectiosoma largo, hay una reducción en la secreción de proteínas Yop *in vitro*.
13. Al expresar inyectiosoma largo y la longitud de la cadena O no afectan a la adhesión e invasión del epitelio.

14. Al expresar inyectiosoma largo, hay un aumento de la cantidad de proteína YopE translocada al citosol de las células epiteliales en cadenas O largas.
15. Al expresar inyectiosoma largo, la cantidad de bacterias internalizadas en los macrófagos se ve reducida en cadenas O largas.
16. Mediante YscP procedente de *Y. enterocolitica* O:8 creamos cepas con su propio inyectiosoma (*Y. enterocolitica* O:8) y cadenas O de longitud variable. En éstas cepas el efecto de la longitud de la cadena O es igual al del mutante simple *wzz* complementado con Wzz heterólogas.
17. El sistema Cpx es sensible a las modificaciones en el lípido A, de la cadena O y del flagelo. También es sensible a alteraciones en los sistemas reguladores PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB y RovA.
18. CpxR actúa como de represor o activador de la expresión de los genes relacionados con las modificaciones del lípido A.
19. CpxR actúa como regulador negativo a 37°C para el gen *flhDC*, lo que se traduce en un aumento de la cantidad de flagelina producida por la bacteria y en un aumento de la movilidad de la bacteria.
20. CpxR actúa como regulador positivo para los genes *clpXP*, *rovA* y *inv*. Lo que se traduce en una reducción en la invasión a las células epiteliales A549 en el mutante *cpxR*.
21. CpxR juega un papel en la resistencia frente a los péptidos antimicrobianos.
22. El sistema Cpx tiene un papel en la virulencia de *Y. enterocolitica* O:8. Un mutante *cpxR* tiene aumentada la secreción de Yops *in vitro*, también la cantidad de proteína YadA en su membrana, lo que se traduce en un aumento de la adhesión a colágeno.



## **REFERENCIAS**



**Abeyrathne,P.D. & Lam,J.S.** Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. *Can J Microbiol.* **53**, 526-532 (2007).

**Abramovitch,H. & Butas,C.A.** Septicemia due to *Yersinia enterocolitica*. *Can Med Assoc J.* **1**;109(11):1112 passim (1973).

**Achtman,M. et al.** *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci.* **96**,14043-8 (1999).

**Adams,H., Teertstra,W., Demmers,J., Boesten,R. & Tommassen J.** Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **185**, 1174-80 (2003).

**Agrain,C., Callebaut,I., Journet,L., Sorg,I., Paroz,C., Mota,L.J. & Cornelis,G.R.** Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol.* **56**, 54-67 (2005).

**Agrain,C., Sorg,I., Paroz,C. & Cornelis,G.R.** Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol Microbiol.* **57**, 1415-27 (2005).

**Aguirre,A., Cabeza,M.L., Spinelli,S.V., McClelland,M., García Vescovi,E. & Soncini,F.C.** PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol.* **188**, 6889-98 (2006).

**Al-Hendy,A., Toivanen,P. & Skurnik,M.** The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolitica* O:3 lipopolysaccharide: temperature regulates the transcription of the *rfb* but not of the *rfa* region. *Microb Pathog.* **10**, 81-6 (1991).

**Al-Hendy,A., Toivanen,P. & Skurnik M.** Lipopolysaccharide O side chain of *Yersinia enterocolitica* O:3 is an essential virulence factor in an orally infected murine model. *Infect Immun.* **60**, 870-5 (1992).

**Aldridge,P. & Hughes,K.T.** Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol.* **5**, 160-5 (2002).

**Allaoui,A., Woestyn,S., Sluiter,C. & Cornelis,G.R.** YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J. Bacteriol.* **176**, 4534 (1994).

**Andersson,K., Magnusson,K.E., Majeed,M., Stendahl,O. & Fällman,M.** *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect Immun.* **67**, 2567-74(1999).

**Anisimov,A.P., Dentovskaya,S.V., Titareva,G.M., Bakhteeva,I.V., Shaikhutdinova,R.Z., Balakhonov,S.V., Lindner,B., Kocharova,N.A., Senchenkova,S.N., Holst,O., Pier,G.B. & Knirel,Y.A.** Intraspecies and temperature-dependent variations in susceptibility of *Yersinia pestis* to the bactericidal action of serum and to polymyxin B. *Infect Immun.* **73**, 7324-31 (2005).

**Anonymous.** Rejection of the Name *Yersinia pseudotuberculosis* subsp. *pestis* (van Loghem) Bercovier et al. 1981 and Conservation of the Name *Yersinia pestis* (Lehmann and Neumann) van

Loghem 1944 for the Plague Bacillus. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **35**, 540 (1985).

**Appleyard, R.K.** Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from Escherichia Coli K12. *Genetics*. **39**, 440-52 (1954).

**Augustin, D.K., Song, Y., Baek, M.S., Sawa, Y., Singh, G., Taylor, B., Rubio-Mills, A., Flanagan, J.L., Wiener-Kronish, J.P. & Lynch, S.V.** Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*. **189**, 2203-9(2007).

**Aussel, L., Thérisod, H., Karibian, D., Perry, M.B., Bruneteau, M. & Caroff, M.** Novel variation of lipid A structures in strains of different Yersinia species. *FEBS Lett*. **465**, 87-92 (2000).

**Axler-Diperte, G.L., Miller, V.L. & Darwin, A.J.** YtxR, a conserved LysR-like regulator that induces expression of genes encoding a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue in Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol*. **188**, 8033-43 (2006).

**Axler-DiPerte, G.L., Hinchliffe, S.J., Wren, B.W. & Darwin, A.J.** YtxR acts as an overriding transcriptional off switch for the Yersinia enterocolitica Ysc-Yop type 3 secretion system. *J Bacteriol*. **191**, 514-24 (2009).

**Bach, S., de Almeida, A. & Carniel, E.** The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett*. **183**, 289-94 (2000).

**Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., & Lee, C.A.** Co-ordinate regulation of Salmonella typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. *Mol Microbiol*. **22**, 703-14 (1996).

**Balligand, G., Laroche, Y. & Cornelis, G.** Genetic analysis of 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**, 782-6 (1985).

**Bartra, S.S., Styer, K.L., O'Bryant, D.M., Nilles, M.L., Hinnebusch, B.J., Aballay, A. & Plano, G.V.** Resistance of Yersinia pestis to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein. *Infect Immun*. **76**, 612-22 (2008).

**Bartra, S.S., Gong, X., Lorica, C.D., Jain, C., Nair, M.K., Schifferli, D., Qian, L., Li, Z., Plano, G.V. & Schesser, K.** The outer membrane protein A (OmpA) of Yersinia pestis promotes intracellular survival and virulence in mice. *Microb Pathog*. **52**, 41-6 (2012).

**Batzilla, J., Höper, D., Antonenka, U., Heesemann, J. & Rakin, A.** Complete genome sequence of Yersinia enterocolitica subsp. palearctica serogroup O:3. *J Bacteriol*. **193**, 2067 (2011).

**Bearden, S.W., Fetherston, J.D., & Perry, R.D.** Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in Yersinia pestis. *Infect Immun*. **65**, 1659-68 (1997).

**Beesley, E.D., Brubaker, R.R., Janssen, W.A. & Surgalla, M.J.** Pesticins. 3. Expression of coagulase

and mechanism of fibrinolysis. *J Bacteriol.* **94**, 19-26 (1967).

**Belden,W.J. & Miller,S.I.** Further characterization of the PhoP regulon: identification of new PhoP-activated virulence loci. *Infect Immun.* **62**, 5095-101 (1994).

**Belunis,C.J., Clementz,T., Carty,S.M. & Raetz,C.R.** Inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis and cell growth following inactivation of the *kdtA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **270**, 27646-52 (1995).

**Bengoechea,J.A., Díaz,R. & Moriyón,I.** Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* biogroups probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides. *Infect Immun.* **64**, 4891-9 (1996).

**Bengoechea,J.A. & Skurnik,M.** Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol Microbiol.* **37**, 67-80 (2000).

**Bengoechea,J.A., Pinta,E., Salminen,T., Oertelt,C., Holst,O., Radziejewska-Lebrecht,J., Piotrowska-Seget,Z., Venho,R. & Skurnik,M.** 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**, 4277-87 (2002A).

**Bengoechea,J.A., Zhang,L., Toivanen,P. & Skurnik,M.** Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* includes cell envelope-dependent signals. *Mol Microbiol.* **44**, 1045-62 (2002B).

**Bengoechea,J.A., Brandenburg,K., Arraiza,M.D., Seydel,U., Skurnik,M. & Moriyón,I.** Pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains increase the outer membrane permeability in response to environmental stimuli by modulating lipopolysaccharide fluidity and lipid A structure. *Infect Immun.* **71**, 2014-21 (2003).

**Bengoechea,J.A., Najdenski,H. & Skurnik,M.** Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Mol Microbiol.* **52**, 451-69 (2004).

**Bercovier,H. et al.** Characterization of *Yersinia enterocolitica sensu stricto*. *Curr Microbiol.* **4**, 201-206 (1980A).

**Bercovier,H. et al.** *Yersinia Kristensenii*: A new species of Enterobacteriaceae composed of sucrose-negative strains (formerly called Atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica-Like*). *Curr Microbiol.* **4**, 219-224 (1980B).

**Bercovier,H. et al.** Intra- And interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr Microbiol.* **4**, 225-229 (1980C).

**Bercovier,H. et al.** *Yersinia aldovae* (formerly *Yersinia enterocolitica*-like group X2): a new species of Enterobacteriaceae isolated from aquatic ecosystems. *Int J Syst Bacteriol.* **34**, 166-172 (1984).

**Bergler,H., Abraham,D., Aschauer,H. & Turnowsky,F.** Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the *pspA* gene. *Microbiology*. **140**, 1937-44 (1994).

**Bergman,T., Erickson,K., Galyov,E., Persson,C. & Wolf-Watz,H.** The *lcrB* (*yscN/U*) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the *spa* gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. **176**, 2619-26 (1994).

**Berring,E. et al.** Destabilization of phospholipid model membranes by YplA, a phospholipase A2 secreted by *Yersinia enterocolitica*. *Chem Phys Lipids*. **131**, 135-49 (2004).

**Beuken,E., Vink,C. & Bruggeman,C.A.** One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques*. **24**, 748-50 (1998).

**Bhat,U.R., Mayer,H., Yokota,A., Hollingsworth,R.I. & Carlson,R.W.** Occurrence of lipid A variants with 27-hydroxyoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family Rhizobiaceae. *J Bacteriol*. **173**, 2155-9 (1991).

**Biedzka-Sarek,M., Venho,R. & Skurnik,M.** Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun*. **73**, 2232-44 (2005).

**Biedzka-Sarek,M., Jarva,H., Hyttiäinen,H., Meri,S. & Skurnik,M.** Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun*. **76**, 4100-9 (2008A).

**Biedzka-Sarek,M., Salmenlinna,S., Gruber,M., Lupas,A.N., Meri,S. & Skurnik,M.** Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun*. **76**, 5016-27 (2008B).

**Birtalan,S.C., Phillips,R.M. & Ghosh,P.** Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell*. **9**, 971-80 (2002).

**Bishop,R.E., Gibbons,H.S., Guina,T., Trent,M.S., Miller,S.I. & Raetz,C.R.** Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J*. **19**, 5071-80 (2000).

**Black,R.E., Jackson,R.J., Tsai,T., Medvesky,M., Shayegani,M., Feeley,J.C., MacLeod,K.I. & Wakelee,A.M.** Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N Engl J Med*. **298**, 76-9 (1978).

**Black,D.S. & Bliska,J.B.** The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol*. **37**, 515-27 (2000).

**Blaylock,B., Riordan,K.E., Missiakas,D.M. & Schneewind,O.** Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol*. **188**, 3525-34 (2006).

**Bleves,S., & Cornelis,G.R.** How to survive in the host: the Yersinia lesson. *Microbes Infect.* **2**, 1451-60 (2000).

**Bleves,S., Marenne,M.N., Detry,G. & Cornelis,G.R.** Up-regulation of the Yersinia enterocolitica yop regulon by deletion of the flagellum master operon flhDC. *J Bacteriol.* **184**, 3214-23 (2002).

**Bliska,J.B. & Falkow,S.** Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of Yersinia enterocolitica. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 3561-5 (1992).

**Buelow,D.R. & Raivio,T.L.** Cpx signal transduction is influenced by a conserved N-terminal domain in the novel inhibitor CpxP and the periplasmic protease DegP. *J Bacteriol.* **187**, 6622-30 (2005).

**Buelow,D.R. & Raivio,T.L.** Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol.* **75**, 547-66 (2010).

**Boland,A. & Cornelis,G.R.** Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect Immun.* **66**, 1878-84 (1998).

**Boland,A., Sory,M.P., Iriarte,M., Kerbouch,C., Wattiau,P. & Cornelis,G.R.** 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 J.* **15**, 5191-201 (1996).

**Bölin,I., Norlander,L. & Wolf-Watz,H.** Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun.* **37**, 506-12 (1982).

**Bottone,E.J.** Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev Microbiol.* **5**, 211-41 (1977).

**Bottone,E.J.** Yersinia enterocolitica: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev.* **10**, 257-76 (1997).

**Boyd,A.P., Lambermont,I. & Cornelis,G.R.** Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol.* **182**, 4811-21 (2000).

**Brandenburg,K., Mayer,H., Koch,M.H., Weckesser,J., Rietschel,E.T. & Seydel,U.** Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur J Biochem.* **218**, 555-63 (1993).

**Brem,D., Pelludat,C., Rakin,A., Jacobi,C.A. & Heesemann,J.** Functional analysis of yersiniabactin transport genes of Yersinia enterocolitica. *Microbiology.* **147**, 1115-27 (2001).

**Brenner,D.J. et al.** *Yersinia intermedia*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive, elibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica-like*). *Curr Microbiol.* **4**, 207-212 (1980).

**Brissette,J.L., Russel,M., Weiner,L. & Model.P.** Phage shock protein, a stress protein of Escherichia

coli. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. **87**,862-866(1990).

**Brogden, K.A.** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* **3**, 238-50 (2005).

**Broz, P., Mueller, C.A., Müller, S.A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A. & Cornelis, G.R.** Function and molecular architecture of the *Yersinia injectisome* tip complex. *Mol Microbiol.* **65**, 1311-20 (2007).

**Brozek, K.A., Bulawa, C.E. & Raetz, C.R.** Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A membrane-bound enzyme that transfers a palmitoyl residue from a glycerophospholipid to lipid X. *J Biol Chem.* **262**, 5170-9 (1987).

**Brozek, K.A., Hosaka, K., Robertson, A.D. & Raetz, C.R.** Biosynthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid to lipid A. *Biol Chem.* **264**, 6956-66 (1989).

**Brozek, K.A. & Raetz, C.R.** Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acyl carrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate. *J Biol Chem.* **265**, 15410-7 (1990).

**Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiyoule, A. & Carniel, E.** The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol Microbiol.* **30**, 965-78 (1998).

**Buchrieser, C., Rusniok, C., Frangeul, L., Couve, E., Billault, A., Kunst, F., Carniel, E. & Glaser, P.** 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**, 4851-61 (1999).

**Buelow, D.R. & Raivio, T.L.** Cpx signal transduction is influenced by a conserved N-terminal domain in the novel inhibitor CpxP and the periplasmic protease DegP. *J Bacteriol.* **187**, 6622-30 (2005).

**Butler, T.** *Yersinia* infections: centennial of the discovery of the plague bacillus. *Clin Infect Dis.* **19**, 655-61 (1994).

**Butler, S.M., Festa, R.A., Pearce, M.J. & Darwin, K.H.** Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol Microbiol.* **60**, 553-62 (2006).

**Butt, H.L., Gordon, D.L., Lee-Archer, T., Moritz, A. & Merrell, W.H.** Relationship between clinical and milk isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Pathology.* **23**, 153-7 (1991).

**Capodici, C., Chen, S., Sidoreczyk, Z., Elsbach, P. & Weiss, J.** Effect of lipopolysaccharide (LPS) chain length on interactions of bactericidal/permeability-increasing protein and its bioactive 23-kilodalton NH<sub>2</sub>-terminal fragment with isolated LPS and intact *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **62**, 259-65 (1994).



- Carlsson,K.E., Liu,J., Edqvist,P.J. & Francis,M.S.** Influence of the Cpx extracytoplasmic-stress-responsive pathway on *Yersinia* sp.-eukaryotic cell contact. *Infect Immun.* **75**, 4386-99 (2007A).
- Carlsson,K.E., Liu,J., Edqvist,P.J. & Francis,M.S.** Extracytoplasmic-stress-responsive pathways modulate type III secretion in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun.* **75**, 3913-24 (2007B).
- Carniel,E., Guiyole,A., Guilvout,I. & Mercereau-Puijalon,O.** Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol Microbiol.* **6**, 379-88 (1992).
- Carniel,E., Guilvout,I. & Prentice,M.** Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* **178**, 6743-51 (1996).
- Caroff,M., Bundle,D.R. & Perry,M.B.** Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur J Biochem.* **139**, 195-200 (1984).
- Carter,P.B.** Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for Mice. *Infect Immun.* **11**, 164-170 (1975).
- Carty,S.M., Sreekumar,K.R. & Raetz,C.R.** Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J Biol Chem.* **274**, 9677-85 (1999).
- Casutt-Meyer,S., Renzi,F., Schmalzer,M., Jann,N.J., Amstutz,M. & Cornelis,G.R.** Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PLoS One.* **5**, 15159 (2010).
- Cathelyn,J.S., Crosby,S.D., Lathem,W.W., Goldman,W.E. & Miller,V.L.** RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 13514-9 (2006).
- Chaba,R., Alba,B.M., Guo,M.S., Sohn,J., Ahuja,N., Sauer,R.T. & Gross,C.A.** Signal integration by DegS and RseB governs the E-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 2106-11 (2011).
- Chadsey,M.S., Karlinsey,J.E. & Hughes,K.T.** The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma28 RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev.* **12**, 3123-36 (1998).
- Chakravorty,D., Rohde,M., Jäger,L., Deiwick,J. & Hensel,M.** Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *EMBO J.* **24**, 2043-52 (2005).
- Chart,H., Cheasty,T. & Rowe,B.** Differentiation of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* by SDS-PAGE analysis of lipopolysaccharide. *Lett Appl Microbiol.* **20**, 369-70 (1995).

**Chaveroche,M.K., Ghigo,J.M. & d'Enfert,C.** A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**, E97 (2000).

**Cheng,L.W., Kay,O. & Schneewind,O.** Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* **183**, 5293-301 (2001).

**Chilcott,G.S. & Hughes,K.T.** Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**, 694-708 (2000).

**China,B., N'Guyen,B.T., de Bruyere,M. & Cornelis,G.R.** Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* **62**, 1275-81 (1994).

**Choi,K.H. & Schweizer,H.P.** mini-Tn7 insertion in bacteria with secondary, non-glmS-linked attTn7 sites: example *Proteus mirabilis* HI4320. *Nat Protoc.* **1**, 170-8 (2006).

**Clark,M.A., Hirst,B.H. & Jepson,M.A.** M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun.* **66**, 1237-43 (1998).

**Clementz,T., Bednarski,J.J. & Raetz,C.R.** Function of the htrB high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A: HtrB catalyzed incorporation of laurate. *J Biol Chem.* **271**, 12095-102 (1996).

**Clementz,T., Zhou,Z. & Raetz,C.R.** 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**, 10353-60 (1997).

**Cornelis,G.R., Biot,T., Lambert de Rouvroit,C., Michiels,T., Mulder,B., Sluiter,C., Sory,M.P., Van Bouchaute,M. & Vanooteghem,J.C.** The *Yersinia* yop regulon. *Mol Microbiol.* **3**, 1455-9 (1989).

**Cornelis,G.R., Sluiter,C., Delor,I., Geib,D., Kaniga,K., Lambert de Rouvroit,C., Sory,M.P., Vanooteghem,J.C. & Michiels,T.** ymoA, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol Microbiol.* **5**, 1023-34 (1991).

**Cornelis,G.R. & Wolf-Watz,H.** The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol.* **23**, 861-7 (1997).

**Cornelis,G.R.** The *Yersinia* deadly kiss. *J Bacteriol.* **180**, 5495-504 (1998A).

**Cornelis,G.R., Boland,A., Boyd,A.P., Geuijen,C., Iriarte,M., Neyt,C., Sory,M.P. & Stainier,I.** The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 1315-52 (1998B).

- Cornelis,G.R.** The Yersinia Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol.* **291**, 455-62 (2002A).
- Cornelis,G.R.** Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol.* **158**, 401-8 (2002B).
- Cornelis,G.R.** The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* **4**, 811-25 (2006).
- Cover,T.L. & Aber,R.C.** Yersinia enterocolitica. *N Engl J Med.* **321**, 16-24 (1989).
- Dame,R.T., Wyman,C. & Goosen,N.** Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA. *Biochimie.* **83**, 231-4 (2001).
- Darveau,R.P.** Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr Opin Microbiol.* **1**, 36-42 (1998).
- Darwin,A.J. & Miller,V.L.** Identification of Yersinia enterocolitica genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol.* **32**, 51-62 (1999).
- Darwin,A.J. & Miller,V.L.** The psp locus of Yersinia enterocolitica is required for virulence and for growth in vitro when the Ysc type III secretion system is produced. *Mol Microbiol.* **39**, 429-44 (2001).
- Darwin,A.J.** The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol.* **57**, 621-8 (2005).
- Day,J.B. & Plano,G.V.** The Yersinia pestis YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. *J Bacteriol.* **182**, 1834-43 (2000).
- De Koning-Ward,T.F. & Robins-Browne,R.M.** Contribution of urease to acid tolerance in Yersinia enterocolitica. *Infect Immun.* **63**, 3790-5 (1995).
- De Koning-Ward,T.F. & Robins-Browne,R.M.** A novel mechanism of urease regulation in Yersinia enterocolitica. *FEMS Microbiol Lett.* **147**, 221-6 (1997).
- De Koning-Ward, T.F., Ward,A.C., Hartland,E.L. & Robins-Browne,M.** Yersinioses: Present and Future. *Ravagnan,G. & Chiesa,C. (eds.)*, pp. 262-263 (Karger, Postfach/CH-4009 Basel/Switzerland, 1995).
- Deiwick,J. & Hensel,M.** Regulation of virulence genes by environmental signals in Salmonella typhimurium. *Electrophoresis.* **20**, 813-7 (1999).
- Delor,I. & Cornelis,G.R.** Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young

rabbits. *Infect Immun.* **60**, 4269-77 (1992).

**Delor,I., Kaeckenbeeck,A., Wauters,G. & Cornelis,G.R.** Nucleotide sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect Immun.* **58**, 2983-8 (1990).

**Denecker,G., Declercq,W., Geuijen,C.A., Boland,A., Benabdillah,R., van Gurp,M., Sory,M.P., Vandenabeele,P. & Cornelis,G.R.** *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J Biol Chem.* **276**, 19706-14 (2001).

**Dennis,J.J. & Zylstra,G.J.** Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol.* **64**, 2710-5 (1998).

**Dentovskaya,S.V., Anisimov,A.P., Kondakova,A.N., Lindner,B., Bystrova,O.V., Svetoch,T.E., Shaikhutdinova,R.Z., Ivanov,S.A., Bakhteeva,I.V., Titareva,G.M. & Knirel,A.Y.** Functional characterization and biological significance of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide biosynthesis genes. *Biochemistry (Mosc).* **76**, 808-22 (2011).

**Derbise,A., Lesic,B., Dacheux,D., Ghigo,J.M. & Carniel,E.** A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **38**, 113-6 (2003).

**Dersch,P. & Isberg,R.R.** A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J.* **18**, 1199-213 (1999).

**Dewoody,R.S., Merritt,P.M. & Marketon,M.M.** Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front Cell Infect Microbiol.* **3**, 4 (2013).

**Diepold,A., Amstutz,M., Abel,S., Sorg,I., Jenal,U. & Cornelis,G.R.** Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J.* **29**, 1928-40 (2010).

**Diepold,A., Wiesand,U. & Cornelis,G.R.** The assembly of the export apparatus (YscR,S,T,U,V) of the *Yersinia* type III secretion apparatus occurs independently of other structural components and involves the formation of an YscV oligomer. *Mol Microbiol.* **82**, 502-14 (2011).

**Diepold,A., Wiesand,U., Amstutz,M. & Cornelis,G.R.** Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Mol Microbiol.* **85**, 878-92 (2012).

**DiGiuseppe,P.A. & Silhavy,T.J.** Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. *J Bacteriol.* **185**, 2432-40 (2003).

**Dorel,C., Lejeune,P. & Rodrigue,A.** The Cpx system of Escherichia coli, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol.* **157**, 306-14 (2006).

**Dorman,C.J.** H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol.* **2**, 391-400 (2004).

**Dube,P.H., Handley,S.A., Revell,P.A. & Miller,V.L.** The rovA mutant of Yersinia enterocolitica displays differential degrees of virulence depending on the route of infection. *Infect Immun.* **71**, 3512-20 (2003).

**Dukuzumuremyi,J.M., Rosqvist,R., Hallberg,B., Akerström,B., Wolf-Watz,H. & Schesser,K.** The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem.* **275**, 35281-90 (2000).

**Dworkin,J., Jovanovic,G. & Model,P.** The PspA protein of Escherichia coli is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. *J Bacteriol.* **182**, 311-9 (2000).

**Egger,L.A. & Inouye,M.** Purification and characterization of the periplasmic domain of EnvZ osmosensor in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun.* **231**, 68-72 (1997).

**Eitel,J. & Dersch,P.** The YadA protein of Yersinia pseudotuberculosis mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect Immun.* **70**, 4880-91 (2002).

**El Qouqa,I.A., El Jarou,M.A., Samaha,A.S., Al Afifi,A.S. & Al Jarousha,A.M.** Yersinia enterocolitica infection among children aged less than 12 years: a case-control study. *Int J Infect Dis.* **15**, 48-53 (2011).

**El Tahir,Y. & Skurnik,M.** YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. *Int J Med Microbiol.* **291**, 209-18 (2001).

**Elderkin,S., Bordes,P., Jones,S., Rappas,M. & Buck,M.** Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. *J Bacteriol.* **187**, 3238-48 (2005).

**Ellison,D.W. & Miller,V.L.** H-NS represses inv transcription in Yersinia enterocolitica through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol.* **188**, 5101-12 (2006).

**Ellison,D.W., Young,B., Nelson,K. & Miller,V.L.** YmoA negatively regulates expression of invasin from Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol.* **185**, 7153-9 (2003).

**Emödy,L., Heesemann,J., Wolf-Watz,H., Skurnik,M., Kapperud,G., O'Toole,P. & Wadström,T.** Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-

mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol.* **171**, 6674-9 (1989).

**Erhardt,M., Namba,K. & Hughes,K.T.** Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**(11):a000299 (2010).

**Evans,L.D. & Hughes,C.** Selective binding of virulence type III export chaperones by FliJ escort orthologues InvI and YscO. *FEMS Microbiol Lett.* **293**, 292-7 (2009).

**Fass,E. & Groisman,E.A.** Control of Salmonella pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol.* **12**, 199-204 (2009).

**Fauconnier,A., Allaoui,A., Campos,A., Van Elsen,A., Cornelis,G.R. & Bollen,A.** Flagellar flhA, flhB and flhE genes, organized in an operon, cluster upstream from the inv locus in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology.* **143**, 3461-71 (1997).

**Felek,S. & Krukonis,E.S.** The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence. *Infect Immun.* **77**, 825-36 (2009).

**Felek,S., Tsang,T.M. & Krukonis,E.S.** Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. *Infect Immun.* **78**, 4134-50 (2010).

**Ferber,D.M. & Brubaker,R.R.** Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* **31**, 839-41 (1981).

**Fernández,C., Hilty,C., Bonjour,S., Adeishvili,K., Pervushin,K. & Wüthrich,K.** Solution NMR studies of the integral membrane proteins OmpX and OmpA from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **504**, 173-8 (2001).

**Ferracci,F., Schubot,F.D., Waugh,D.S. & Plano,G.V.** Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Mol Microbiol.* **57**, 970-87 (2005).

**Fetherston,J.D., Bearden,S.W. & Perry,R.D.** YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol.* **22**, 315-25 (1996).

**Fetherston,J.D., Bertolino,V.J. & Perry,R.D.** YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol.* **32**, 289-99 (1999).

**Fields,K.A., Plano,G.V. & Straley,S.C.** A low-Ca<sup>2+</sup> response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* **176**, 569-79 (1994).

**Flores-Kim,J. & Darwin,A.J.** Links between type III secretion and extracytoplasmic stress responses in *Yersinia*. *Front Cell Infect Microbiol.* **2**:125 (2012).

**Flügel,A., Schulze-Koops,H., Heesemann,J., Kühn,K., Sorokin,L., Burkhardt,H., von der Mark,K. & Emmrich,F.** 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**, 29732-8 (1994).

**Foultier,B., Troisfontaines,P., Müller,S., Opperdoes,F.R. & Cornelis,G.R.** Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J Mol Evol.* **55**, 37-51 (2002).

**Foultier,B., Troisfontaines,P., Vertommen,D., Marenne,M.N., Rider,M., Parsot,C. & Cornelis,G.R.** Identification of substrates and chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B *Ysa* type III secretion system. *Infect Immun.* **71**, 242-53 (2003).

**Funahara,Y. & Nikaido,H.** Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **141**, 1463-5 (1980).

**Galloway,S.M. & Raetz,C.R.** A mutant of *Escherichia coli* defective in the first step of endotoxin biosynthesis. *J Biol Chem.* **265**, 6394-402 (1990).

**Galván,E.M., Chen,H. & Schifferli,D.M.** The *Psa* fimbriae of *Yersinia pestis* interact with phosphatidylcholine on alveolar epithelial cells and pulmonary surfactant. *Infect Immun.* **75**, 1272-9 (2007).

**Gao,R. & Stock,A.M.** Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol.* **63**, 133-54 (2009).

**Genin,S. & Boucher,C.A.** A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol Gen Genet.* **243**, 112-8 (1994).

**Ghosh,P.** Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**, 771-95 (2004).

**Gibbons,H.S., Kalb,S.R., Cotter,R.J. & Raetz,C.R.** Role of Mg<sup>2+</sup> and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol Microbiol.* **55**, 425-40 (2005).

**Gong,S., Bearden,S.W., Geoffroy,V.A., Fetherston,J.D. & Perry,R.D.** Characterization of the *Yersinia pestis* *Yfu* ABC inorganic iron transport system. *Infect Immun.* **69**, 2829-37 (2001).

**Gort,A.S. & Miller,V.L.** Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infect Immun.* **68**, 6633-42 (2000).

**Grassl,G.A., Bohn,E., Müller,Y., Bühler,O.T. & Autenrieth,I.B.** Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol.* **293**, 41-54 (2003).

**Green,R.C. & Darwin,A.J.** PspG, a new member of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein regulon. *J Bacteriol.* **186**, 4910-20 (2004).

**Greenwood,M.H. & Hooper,W.L.** Excretion of *Yersinia* spp. associated with consumption of pasteurized milk. *Epidemiol Infect.* **104**, 345-50 (1990).

**Greenwood,M.H., Hooper,W.L. & Rodhouse,J.C.** The source of *Yersinia* spp. in pasteurized milk: an investigation at a dairy. *Epidemiol Infect.* **104**, 351-60 (1990).

**Gripenberg-Lerche,C., Zhang,L., Ahtonen,P., Toivanen,P. & Skurnik,M.** Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and o:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. *Infect Immun.* **68**, 942-7 (2000).

**Groisman,E.A.** The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol.* **183**, 1835-42 (2001).

**Grosdent,N., Maridonneau-Parini,I., Sory,M.P. & Cornelis,G.R.** Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun.* **70**, 4165-76 (2002).

**Grützkau,A., Hanski,C., Hahn,H. & Riecken,E.O.** Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut.* **31**, 1011-5 (1990).

**Gunn,J.S. & Miller,S.I.** PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol.* **178**, 6857-64 (1996).

**Gunn,J.S., Lim,K.B., Krueger,J., Kim,K., Guo,L., Hackett,M. & Miller,S.I.** PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol.* **27**, 1171-82 (1998).

**Gunn,J.S., Ryan,S.S., Van Velkinburgh,J.C., Ernst,R.K. & Miller,S.I.** Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun.* **68**, 6139-46 (2000).

**Gunn,J.S. & Miller,S.I.** PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol.* **178**, 6857-64 (1996).



**Guo,L., Lim,K.B., Gunn,J.S., Bainbridge,B., Darveau,R.P., Hackett,M. & Miller,S.I.** Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science*. **276**, 250-3 (1997).

**Guo,L., Lim,K.B., Poduje,C.M., Daniel,M., Gunn,J.S., Hackett,M. & Miller,S.I.** Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*. **95**, 189-98 (1998).

**Haag,H., Hantke,K., Drechsel,H., Stojiljkovic,I., Jung,G. & Zähler,H.** Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol*. **139**, 2159-65 (1993).

**Hackam,D.J., Rotstein,O.D., Schreiber,A., Zhang,Wj. & Grinstein,S.** Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J Exp Med*. **186**, 955-66 (1997).

**Haiko,J., Suomalainen,M., Ojala,T., Lähteenmäki,K. & Korhonen,T.K.** Invited review: Breaking barriers--attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun.* **15**, 67-80 (2009).

**Håkansson,S., Schesser,K., Persson,C., Galyov,E.E., Rosqvist,R., Homblé,F. & Wolf-Watz,H.** The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J*. **15**, 5812-23 (1996).

**Haller,J.C., Carlson,S., Pederson,K.J. & Pierson,D.E.** A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol Microbiol*. **36**, 1436-46 (2000).

**Hamburger,Z.A., Brown,M.S., Isberg,R.R. & Bjorkman,P.J.** Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science*. **286**, 291-5 (1999).

**Hanahan,D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **166**, 557-80 (1983).

**Hardie,K.R., Lory,S. & Pugsley,A.P.** Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J*. **15**, 978-88 (1996).

**Heesemann,J. & Laufs,R.** Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *Bacteriol*. **155**, 761-7 (1983).

**Heesemann,J., Algermissen,B. & Laufs,R.** Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*. **46**, 105-10 (1984).

**Heesemann,J., Gross,U., Schmidt,N. & Laufs,R.** Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun.* **54**, 561-7 (1986).

**Heesemann,J., Gross,U. & Grüter,L.** Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol.* **9**, 312-6 (1987).

**Heesemann,J., Hantke,K., Vocke,T., Saken,E., Rakin,A., Stojiljkovic,I. & Berner,R.** Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol.* **8**, 397-408 (1993).

**Heise,T. & Dersch,P.** Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 3375-80 (2006).

**Herbst,K., Bujara,M., Heroven,A.K., Opitz,W., Weichert,M., Zimmermann,A. & Dersch,P.** Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog.* **5**, e1000435 (2009).

**Heroven,A.K., Nagel,G., Tran,H.J., Parr,S. & Dersch,P.** RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol.* **53**, 871-88 (2004).

**Heroven,A.K. & Dersch,P.** RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol.* **62**, 1469-83 (2006).

**Heroven,A.K., Böhme,K., Rohde,M. & Dersch,P.** A Csr-type regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of *Yersinia pseudotuberculosis* through RovM. *Mol Microbiol.* **68**, 1179-95 (2008).

**Heroven,A.K., Böhme,K., Tran-Winkler,H. & Dersch,P.** Regulatory elements implicated in the environmental control of invasin expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol.* **603**, 156-66 (2007).

**Heusipp,G., Schmidt,M.A. & Miller,V.L.** Identification of *rpoE* and *nadB* as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett.* **226**, 291-8 (2003).

**Heusipp,G., Nelson,K.M., Schmidt,M.A. & Miller,V.L.** Regulation of *htrA* expression in *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett.* **231**, 227-35 (2004).

**Hoiczky,E., Roggenkamp,A., Reichenbecher,M., Lupas,A. & Heesemann,J.** Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*

19, 5989-99 (2000).

**Holmström,A., Olsson,J., Cherepanov,P., Maier,E., Nordfelth,R., Pettersson,J., Benz,R., Wolf-Watz,H. & Forsberg,A.** LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol.* **39**, 620-32 (2001).

**Hölzer,S.U., Schlumberger,M.C., Jäckel,D. & Hensel,M.** Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infect Immun.* **77**, 5458-70 (2009).

**Horne,S.M. & Prüss,B.M.** Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Arch Microbiol.* **185**, 115-26 (2006).

**Hsia,R.C., Pannekoek,Y., Ingerowski,E. & Bavoil,P.M.** Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*. *Mol Microbiol.* **25**, 351-9 (1997).

**Huang,X.Z. & Lindler,L.E.** The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. *Infect Immun.* **72**, 7212-9 (2004).

**Hueck,C.J.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 379-433 (1998).

**Hughes,K.T., Gillen,K.L., Semon,M.J. & Karlinsey,J.E.** Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science.* **262**, 1277-80 (1993).

**Hunke,S., Keller,R. & Müller,V.S.** Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett.* **326**, 12-22 (2012).

**Hurst,M.R., Becher,S.A., Young,S.D., Nelson,T.L. & Glare,T.R.** *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **61**, 844-9 (2011).

**Inoue,T., Okamoto,K., Moriyama,T., Takahashi,T., Shimizu,K. & Miyama,A.** Effect of *Yersinia enterocolitica* ST on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. *Microbiol Immunol.* **27**, 159-66 (1983).

**Iriarte,M. & Cornelis,G.R.** MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* **177**, 738-44 (1995).

**Iriarte,M. & Cornelis,G.R.** YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol.* **29**, 915-29 (1998).

**Iriarte,M., Stainier,I., Mikulskis,A.V. & Cornelis,G.R.** The *fliA* gene encoding sigma 28 in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* **177**, 2299-304 (1995).

**Isaac,D.D., Pinkner,J.S., Hultgren,S.J. & Silhavy,T.J.** The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 17775-9 (2005).

**Isberg,R.R., Voorhis,D.L. & Falkow,S.** Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell.* **50**, 769-78 (1987).

**Isberg,R.R.** Determinants for thermoinducible cell binding and plasmid-encoded cellular penetration detected in the absence of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *Infect Immun.* **57**, 1998-2005 (1989).

**Isberg,R.R., Hamburger,Z. & Dersch,P.** Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.* **2**, 793-801 (2000).

**Iwobi,A., Heesemann,J., Garcia,E., Igwe,E., Noelting,C. & Rakin,A.** Novel Virulence-Associated Type II Secretion System Unique to High-Pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **71**, 1872-1879 (2003).

**Jepson,M.A. & Clark,M.A.** Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol.* **6**, 359-65 (1998).

**Jimenez,N., Canals,R., Saló,M.T., Vilches,S., Merino,S. & Tomás,J.M.** The *Aeromonas hydrophila* *wb\**<sub>Ω34</sub> Gene Cluster: Genetics and Temperature Regulation. *J. Bacteriol.* **190**, 4198-4209 (2008).

**Jones,C.J. & Aizawa,S.** The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv Microb Physiol.* **32**, 109-72 (1991).

**Jones,S.E., Lloyd,L.J., Tan,K.K. & Buck,M.** Secretion Defects That Activate the Phage Shock Response of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 6707-6711 (2008).

**Journet,L., Agrain,C., Broz,P. & Cornelis,G.R.** The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science.* **302**, 1757-60 (2003).

**Jovanovic,G., Weiner,L. & Model,P.** Identification, Nucleotide Sequence, and Characterization of PspF, the Transcriptional Activator of the *Escherichia coli* Stress-Induced *psp* Operon. *J. Bacteriol.* **178**, 1936-1945 (1996).

**Juris,S.J., Rudolph,A.E., Huddler,D., Orth,K. & Dixon,J.E.** A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 9431-6 (2000).

**Kaniga,K., Delor,I. & Cornelis,G.R.** A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. *Gene*. **109**, 137-41 (1991).

**Kapatral,V. & Minnich,S.A.** Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three Yersinia enterocolitica flagellin genes. *Mol Microbiol*. **17**, 49-56 (1995).

**Kapatral,V., Olson,J.W., Pepe,J.C., Miller,V.L. & Minnich,S.A.** Temperature-dependent regulation of Yersinia enterocolitica Class III flagellar genes. *Mol Microbiol*. **19**, 1061-71 (1996).

**Kapatral,V., Campbell,J.W., Minnich,S.A., Thomson,N.R., Matsumura,P. & Prüss,B.M.** Gene array analysis of Yersinia enterocolitica FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate. *Microbiology*. **150**, 2289-300 (2004).

**Kapperud,G., Namork,E. & Skarpeid,H.J.** Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun*. **47**, 561-6 (1985).

**Kapperud,G., Namork,E., Skurnik,M. & Nesbakken,T.** Plasmid-mediated surface fibrillae of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun*. **55**, 2247-54 (1987).

**Kato,A., Tanabe,H. & Utsumi,R.** Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in Escherichia coli K-12: identification of extracellular Mg<sup>2+</sup>-responsive promoters. *J Bacteriol*. **181**, 5516-20 (1999).

**Kawahara,K., Tsukano,H., Watanabe,H., Lindner,B. & Matsuura,M.** Modification of the structure and activity of lipid A in Yersinia pestis lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect Immun*. **70**, 4092-8 (2002).

**Keet,E.E.** Yersinia enterocolitica septicemia. Source of infection and incubation period identified. *NY State J Med*. **74**, 2226-30 (1974).

**Kim,T.J., Young,B.M. & Young,G.M.** Effect of flagellar mutations on Yersinia enterocolitica biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. **74**, 5466-74 (2008).

**Kimbrough,T.G. & Miller,S.I.** Contribution of Salmonella typhimurium type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 11008-13 (2000).

**Kirjavainen,V., Jarva,H., Biedzka-Sarek,M., Blom,A.M., Skurnik,M. & Meri,S.** Yersinia enterocolitica serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog*. **4**, e1000140 (2008).

**Kita,H. & Nikaido,H.** Structure of cell wall lipopolysaccharide from Salmonella typhimurium. IV. Anomeric configuration of L-rhamnose residues and its taxonomic implications. *J Bacteriol.* **113**, 672-9 (1973).

**Kleerebezem,M., Crielaard,W. & Tommassen,J.** Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of Escherichia coli in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *EMBO J.* **15**, 162-71 (1996).

**Korth,M.M. & Sigel,R.K.** Unusually high-affinity Mg(2+) binding at the AU-rich sequence within the antiterminator hairpin of a Mg(2+) riboswitch. *Chem Biodivers.* **9**, 2035-49 (2012).

**Kox,L.F., Wösten,M.M. & Groisman,E.A.** A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J.* **19**, 1861-72 (2000).

**Krell,T., Lacal,J., Busch,A., Silva-Jiménez,H., Guazzaroni,M.E. & Ramos,J.L.** Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol.* **64**, 539-59 (2010).

**Kubori,T., Matsushima,Y., Nakamura,D., Uralil,J., Lara-Tejero,M., Sukhan,A., Galán,J.E. & Aizawa,S.I.** Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science.* **280**, 602-5 (1998).

**Kulp,A. & Kuehn,M.J.** Recognition of  $\beta$ -strand motifs by RseB is required for  $\sigma(E)$  activity in Escherichia coli. *J Bacteriol.* **193**, 6179-86 (2011).

**Kutsukake,K., Ohya,Y. & Iino,T.** Transcriptional analysis of the flagellar regulon of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol.* **172**, 741-7 (1990).

**Laird,W.J. & Cavanaugh,D.C.** Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. *J Clin Microbiol.* **11**, 430-2 (1980).

**Lambert de Rouvroit,C., Sluiter,C. & Cornelis,G.R.** Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of Yersinia enterocolitica. *Mol Microbiol.* **6**, 395-409 (1992).

**Lambris,J.D., Ricklin,D. & Geisbrecht,B.V.** Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 132-42 (2008).

**Lawrenz,M.B. & Miller,V.L.** Comparative analysis of the regulation of rovA from the pathogenic yersiniae. *J Bacteriol.* **189**, 5963-75 (2007).

**Lebbar,S., Karibian,D., Deprun,C. & Caroff,M.** Distribution of lipid A species between long and short chain lipopolysaccharides isolated from Salmonella, Yersinia, and Escherichia as seen by 252Cf

plasma desorption mass spectrometry. *J Biol Chem.* **269**, 31881-4 (1994).

**Lee,H., Hsu,F.F., Turk,J. & Groisman,E.A.** The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* **186**, 4124-33 (2004).

**Lehrer,R.I., Rosenman,M., Harwig,S.S., Jackson,R. & Eisenhauer,P.** Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods.* **137**, 167-73 (1991).

**Leung,K.Y., Reisner,B.S. & Straley,S.C.** YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun.* **58**, 3262-71 (1990).

**Friedrich,E. & Whitfield,C.** Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J Endotoxin Res.* **11**, 133-44 (2005).

**Liu,X. & Matsumura,P.** The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol.* **176**, 7345-51 (1994).

**Liu,X. & Matsumura,P.** An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene.* **164**, 81-4 (1995).

**Liu,J., Thanikkal,E.J., Obi,I.R. & Francis,M.S.** Elevated CpxR~P levels repress the Ysc-Yop type III secretion system of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Res Microbiol.* **163**, 518-30 (2012).

**Llobet,E., Campos,M.A., Giménez,P., Moranta,D. & Bengoechea,J.A.** Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun.* **79**, 3718-32 (2011).

**Lloyd,L.J., Jones,S.E., Jovanovic,G., Gyaneshwar,P., Rolfe,M.D., Thompson,A., Hinton,J.C. & Buck,M.** Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG). *J Biol Chem.* **279**, 55707-14 (2004).

**Lugtenberg,B. & Van Alphen,L.** Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **737**, 51-115 (1983).

**Lukaszewski,R.A., Kenny,D.J., Taylor,R., Rees,D.G., Hartley,M.G. & Oyston,P.C.** Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect Immun.* **73**, 7142-50 (2005).

**Macnab,R.M.** *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt,F.C. *et al.* (eds.), pp. 123-142 (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1996).

**Macnab,R.M.** The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J Bacteriol.* **181**, 7149-53 (1999).

**MacRitchie,D.M., Buelow,D.R., Price,N.L. & Raivio,T.L.** Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems. *Adv Exp Med Biol.* **631**, 80-110 (2008A).

**Macritchie,D.M., Ward,J.D., Nevesinjac,A.Z. & Raivio,T.L.** Activation of the Cpx envelope stress response down-regulates expression of several locus of enterocyte effacement-encoded genes in enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun.* **76**, 1465-75 (2008B).

**Madrid,C., Balsalobre,C., García,J. & Juárez,A.** 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 (2007).

**Mantle,M., Basaraba,L., Peacock,S.C. & Gall,D.G.** Binding of Yersinia enterocolitica to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect Immun.* **57**, 3292-9 (1989).

**Marenne,M.N., Journet,L., Mota,L.J. & Cornelis,G.R.** Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by Yersinia enterocolitica: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog.* **35**, 243-58 (2003).

**Marlovits,T.C., Kubori,T., Sukhan,A., Thomas,D.R., Galán,J.E. & Unger,V.M.** Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science.* **306**, 1040-1042 (2004).

**Matsumoto,H. & Young,G.M.** Proteomic and functional analysis of the suite of Ysp proteins exported by the Ysa type III secretion system of Yersinia enterocolitica Biovar 1B. *Mol Microbiol.* **59**, 689-706 (2006).

**Matsumoto,H. & Young,G.M.** Essential role of the SycP chaperone in type III secretion of the YspP effector. *J Bacteriol.* **191**, 1703-15 (2009A).

**Matsumoto,H. & Young,G.M.** Translocated effectors of Yersinia. *Curr Opin Microbiol.* **12**, 94-100 (2009B).

**Maxson,M.E. & Darwin,A.J.** Identification of inducers of the Yersinia enterocolitica phage shock protein system and comparison to the regulation of the RpoE and Cpx extracytoplasmic stress responses. *J Bacteriol.* **186**, 4199-208 (2004).

**Maxson,M.E. & Darwin,A.J.** PspB and PspC of Yersinia enterocolitica are dual function proteins: regulators and effectors of the phage-shock-protein response. *Mol Microbiol.* **59**, 1610-23 (2006).



**McDermott,P.F., Ciacci-Woolwine,F., Snipes,J.A. & Mizel,S.B.** High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect Immun.* **68**, 5525-9 (2000).

**Mecsas,J., Bilis,I. & Falkow,S.** Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun.* **69**, 2779-87 (2001).

**Mejía,E., Bliska,J.B. & Viboud,G.I.** *Yersinia* controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS Pathog.* **4**, e3 (2008).

**Merhej,V., Adékambi,T., Pagnier,I., Raoult,D. & Drancourt,M.** *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**, 779-84 (2008).

**Mertz,A.K., Batsford,S.R., Curschellas,E., Kist,M.J. & Gondolf,K.B.** Cationic *Yersinia* antigen-induced chronic allergic arthritis in rats. A model for reactive arthritis in humans. *J Clin Invest.* **88**, 632-42 (1991).

**Michiels,T. & Cornelis,G.R.** Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J Bacteriol.* **173**, 1677-85 (1991).

**Mikula,K.M., Kolodziejczyk,R. & Goldman,A.** *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol.* **2**:169 (2012).

**Mikulskis,A.V., Delor,I., Thi,V.H. & Cornelis,G.R.** Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol Microbiol.* **14**, 905-15 (1994).

**Miller,S.I. & Mekalanos,J.J.** Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J Bacteriol.* **172**, 2485-90 (1990).

**Miller,V.L. & Falkow,S.** Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* **56**, 1242-8 (1988).

**Miller,V.L., Farmer,J.J.3rd., Hill,W.E. & Falkow,S.** The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun.* **57**, 121-31 (1989).

**Miller,S.I., Kukral,A.M. & Mekalanos,J.J.** A two-component regulatory system (*phoP* *phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **86**, 5054-8 (1989).

**Miller,V.L., Bliska,J.B. & Falkow,S.** Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* *ail* gene and characterization of the Ail protein product. *J Bacteriol.* **172**, 1062-9 (1990).

**Miller,V.L., Beer,K.B., Heusipp,G., Young,B.M. & Wachtel,M.R.** Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol.* **41**, 1053-62 (2001).

**Miller,S.I., Ernst,R.K. & Bader,M.W.** LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* **3**, 36-46 (2005).

**Miller,W.G., Leveau,J.H. & Lindow,S.E.** Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**, 1243-50 (2000).

**Minamino,T., Doi,H. & Kutsukake,K.** Substrate specificity switching of the flagellum-specific export apparatus during flagellar morphogenesis in Salmonella typhimurium. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63**, 1301-3 (1999).

**Minamino,T. & Pugsley,A.P.** Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length. *Mol Microbiol.* **56**, 303-8 (2005).

**Minnich,S & Rohde,H.** Advance in Experimental Medicine and Biology. Perry,R.D. & Fetherston,J.D. (eds.), pp. 298-311 (Springer New York, 2007).

**Mobley,H.L., Island,M.D. & Hausinger,R.P.** Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* **59**, 451-80 (1995).

**Model,P., Jovanovic,G. & Dworkin,J.** The Escherichia coli phage-shock-protein (psp) operon. *Mol Microbiol.* **24**, 255-61 (1997).

**Montagner,C., Arquint,C. & Cornelis,G.R.** Translocators YopB and YopD from Yersinia enterocolitica form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic cell membranes. *J Bacteriol.* **193**, 6923-8 (2011).

**Mota,L.J., Journet,L., Sorg,I., Agrain,C. & Cornelis,G.R.** Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science.* **307**, 1278 (2005).

**Mueller,C.A., Broz,P., Müller,S.A., Ringler,P., Erne-Brand,F., Sorg,I., Kuhn,M., Engel,A. & Cornelis,G.R.** The V-antigen of Yersinia forms a distinct structure at the tip of injectosome needles. *Science.* **310**, 674-6 (2005).

**Mueller,C.A., Broz,P. & Cornelis,G.R.** The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol.* **68**, 1085-95 (2008).

**Mulder,B., Michiels,T., Simonet,M., Sory,M.P. & Cornelis,G.** Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of Yersinia enterocolitica W227. *Infect Immun.* **57**, 2534-41 (1989).

**Müller-Loennies,S., Rund,S., Ervelä,E., Skurnik,M. & Holst,O.** The structure of the carbohydrate backbone of the core-lipid A region of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of Yersinia enterocolitica O:9. *Eur J Biochem.* **261**, 19-24 (1999).

**Murray,G.L., Attridge,S.R. & Morona,R.** Regulation of Salmonella typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol.* **47**, 1395-406 (2003).

**Murray,G.L., Attridge,S.R. & Morona,R.** Inducible serum resistance in Salmonella typhimurium is dependent on wzz(fepE)-regulated very long O antigen chains. *Microbes Infect.* **7**, 1296-304 (2005).

**Murray,G.L., Attridge,S.R. & Morona,R.** Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of Salmonella enterica serovar Typhimurium with macrophages and complement. *J Bacteriol.* **188**, 2735-9 (2006).

**Murros-Konttiainen,A., Johansson,P., Niskanen,T., Fredriksson-Ahomaa,M., Korkeala,H. & Björkroth,J.** Yersinia pekkanenii sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **61**, 2363-7 (2011A).

**Murros-Konttiainen,A., Fredriksson-Ahomaa,M., Korkeala,H., Johansson,P., Rahkila,R. & Björkroth,J.** Yersinia nurmii sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **61**, 2368-72 (2011B).

**Nagel,G., Lahrz,A. & Dersch,P.** Environmental control of invasin expression in Yersinia pseudotuberculosis is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol.* **41**, 1249-69 (2001).

**Najdenski,H., Golkocheva,E., Kussovski,V., Ivanova,E., Manov,V., Iliev,M., Vesselinova,A., Bengoechea,J.A. & Skurnik,M.** Experimental pig yersiniosis to assess attenuation of Yersinia enterocolitica O:8 mutant strains. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **47**, 425-35 (2006).

**Najdenski,H., Golkocheva,E., Vesselinova,A., Bengoechea,J.A. & Skurnik,M.** Proper expression of the O-antigen of lipopolysaccharide is essential for the virulence of Yersinia enterocolitica O:8 in experimental oral infection of rabbits. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **38**, 97-106 (2003).

**Nakka,S., Qi,M. & Zhao,Y.** The Erwinia amylovora PhoPQ system is involved in resistance to antimicrobial peptide and suppresses gene expression of two novel type III secretion systems. *Microbiol Res.* **165**, 665-73 (2010).

**Navarre,W.W., McClelland,M., Libby,S.J. & Fang,F.C.** Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev.* **21**, 1456-71 (2007).

**Navarro,L., Koller,A., Nordfelth,R., Wolf-Watz,H., Taylor,S. & Dixon,J.E.** Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Mol Cell.* **26**, 465-77 (2007).

**Neyt,C. & Cornelis,G.R.** Role of SycD, the chaperone of the Yersinia Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol.* **31**, 143-56 (1999).

**Nicolas,P. & Mor,A.** Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol.* **49**, 277-304 (1995).

**Nieto,J.M., Madrid,C., Prenafeta,A., Miquelay,E., Balsalobre,C., Carrascal,M. & Juárez,A.** 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**, 349-58 (2000).

**Nieto,J.M., Madrid,C., Miquelay,E., Parra,J.L., Rodríguez,S. & Juárez,A.** Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J Bacteriol.* **184**, 629-35 (2002).

**Nikaido,H.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**, 593-656 (2003).

**Niléhn,B.** Studies on *Yersinia enterocolitica* growth on various solid media at 37 degrees C and 25 degrees C. *Acta Pathol Microbiol Scand.* **77**, 685-97 (1969).

**Nizet,V.** Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol.* **8**, 11-26 (2006).

**Nummelin,H., Merckel,M.C., Leo,J.C., Lankinen,H., Skurnik,M. & Goldman,A.** The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.* **23**, 701-11 (2004).

**Nummila,K., Kilpeläinen,I., Zähringer,U., Vaara,M. & Helander,I.M.** Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol Microbiol.* **16**, 271-8 (1995).

**Ohnishi,K., Kutsukake,K., Suzuki,H. & Iino,T.** Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet.* **221**, 139-47 (1990).

**Otto,K. & Silhavy,T.J.** Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 2287-92 (2002).

**Pai,C.H. & Mors,V.** Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **19**, 908-11 (1978).

**Pai,C.H., Mors,V. & Toma,S.** Prevalence of enterotoxigenicity in human and nonhuman isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **22**, 334-8 (1978).

**Pai,C.H. & DeStephano,L.** Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **35**, 605-11 (1982).

**Palmer,L.E., Hobbie,S., Galán,J.E. & Bliska,J.B.** YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol.* **27**, 953-65 (1998).

**Payne,P.L. & Straley,S.C.** YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J Bacteriol.* **180**, 3882-90 (1998).

- Payne,P.L. & Straley,S.C.** YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. *J Bacteriol.* **181**, 2852-62 (1999).
- Pederson,K.J. & Pierson,D.E.** Ail expression in *Yersinia enterocolitica* is affected by oxygen tension. *Infect Immun.* **63**, 4199-201 (1995).
- Pelludat,C., Rakin,A., Jacobi,C.A., Schubert,S. & Heesemann,J.** The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol.* **180**, 538-46 (1998).
- Pepe,J.C. & Miller,V.L.** *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 6473-7 (1993).
- Pepe,J.C., Wachtel,M.R., Wagar,E. & Miller,V.L.** Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun.* **63**, 4837-48 (1995).
- Pérez-Gutiérrez,C., Llompарт,C.M., Skurnik,M. & Bengoechea,J.A.** Expression of the *Yersinia enterocolitica* pYV-encoded type III secretion system is modulated by lipopolysaccharide O-antigen status. *Infect Immun.* **75**, 1512-6 (2007).
- Pérez-Gutiérrez,C., Llobet,E., Llompарт,C.M., Reinés,M. & Bengoechea,J.A.** Role of lipid A acylation in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect Immun.* **78**, 2768-81 (2010).
- Persson,C., Nordfelth,R., Andersson,K., Forsberg,A., Wolf-Watz,H. & Fällman,M.** Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol Microbiol.* **33**, 828-38 (1999).
- Peterson,A.A., Haug,A. & McGroarty,E.J.** Physical properties of short- and long-O-antigen-containing fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111:B4. *J Bacteriol.* **165**, 116-22 (1986).
- Pettersson,J., Nordfelth,R., Dubinina,E., Bergman,T., Gustafsson,M., Magnusson,K.E. & Wolf-Watz,H.** Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science.* **273**, 1231-3 (1996).
- Pierson,D.E. & Falkow,S.** The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect Immun.* **61**, 1846-52 (1993).
- Pierson,D.E.** Mutations affecting lipopolysaccharide enhance ail-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. *J Bacteriol.* **176**, 4043-51 (1994).
- Pilz,D., Vocke,T., Heesemann,J. & Brade,V.** Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect Immun.* **60**, 189-95 (1992).
- Plano,G.V., Day,J.B. & Ferracci,F.** Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol.* **40**, 284-93 (2001).

- Plesniak,L.A., Mahalakshmi,R., Rypien,C., Yang,Y., Racic,J. & Marassi,F.M.** Expression, refolding, and initial structural characterization of the *Y. pestis* Ail outer membrane protein in lipids. *Biochim Biophys Acta.* **1808**, 482-9 (2011).
- Portnoy,D.A., Moseley,S.L. & Falkow,S.** Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect Immun.* **31**, 775-82 (1981).
- Prentice,M.B., James,K.D., Parkhill,J., Baker,S.G., Stevens,K., Simmonds,M.N., Mungall,K.L., Churcher,C., Oyston,P.C., Titball,R.W., Wren,B.W., Wain,J., Pickard,D., Hien,T.T., Farrar,J.J. & Dougan,G.** *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid. *J Bacteriol.* **183**, 2586-94 (2001).
- Prior,J.L., Hitchen,P.G., Williamson,D.E., Reason,A.J., Morris,H.R., Dell,A., Wren,B.W. & Titball,R.W.** Characterization of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Microb Pathog.* **30**, 49-57 (2001A).
- Prior,J.L., Parkhill,J., Hitchen,P.G., Mungall,K.L., Stevens,K., Morris,H.R., Reason,A.J., Oyston,P.C., Dell,A., Wren,B.W. & Titball,R.W.** The failure of different strains of *Yersinia pestis* to produce lipopolysaccharide O-antigen under different growth conditions is due to mutations in the O-antigen gene cluster. *FEMS Microbiol Lett.* **197**, 229-33 (2001B).
- Pujol,C. & Bliska,J.B.** Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol.* **114**, 216-26 (2005).
- Raczkowska,A., Skorek,K., Bielecki,J. & Brzostek,K.** OmpR controls *Yersinia enterocolitica* motility by positive regulation of flhDC expression. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **99**, 381-94 (2011).
- Raetz,C.R.H.** Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, p. 1035–1063 (1996). 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 (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Raetz,C.R. & Whitfield,C.** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* **71**, 635-700 (2002).
- Raetz,C.R., Reynolds,C.M., Trent,M.S. & Bishop,R.E.** Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem.* **76**, 295-329 (2007).
- Raffa,R.G. & Raivio,T.L.** A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **45**, 1599-611 (2002).
- Raivio,T.L. & Silhavy,T.J.** Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J Bacteriol.* **179**, 7724-33 (1997).
- Raivio,T.L., Popkin,D.L. & Silhavy,T.J.** The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol.* **181**, 5263-72 (1999).

**Raivio,T.L. & Silhavy,T.J.** Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol.* **55**, 591-624 (2001).

**Rakin,A., Urbitsch,P. & Heesemann,J.** Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *J Bacteriol.* **177**, 2292-8 (1995).

**Rakin,A., Noelting,C., Schubert,S. & Heesemann,J.** Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **67**, 5265-74 (1999).

**Ramos,H.C., Rumbo,M. & Sirard,J.C.** Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* **12**, 509-17 (2004).

**Rao,M.C., Guandalini,S., Laird,W.J. & Field,M.** Effects of heat-stable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum. *Infect Immun.* **26**, 875-8 (1979).

**Rebeil,R., Ernst,R.K., Gowen,B.B., Miller,S.I. & Hinnebusch,B.J.** Variation in lipid A structure in the pathogenic *yersiniae*. *Mol Microbiol.* **52**, 1363-73 (2004).

**Rebeil,R., Ernst,R.K., Jarrett,C.O., Adams,K.N., Miller,S.I. & Hinnebusch,B.J.** Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. *J Bacteriol.* **188**, 1381-8 (2006).

**Reeves,P.R., Hobbs,M., Valvano,M.A., Skurnik,M., Whitfield,C., Coplin,D., Kido,N., Klena,J., Maskell,D., Raetz,C.R. & Rick,P.D.** Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**, 495-503 (1996).

**Reinés,M., Llobet,E., Llupart,C.M., Moranta,D., Pérez-Gutiérrez,C. & Bengoechea,J.A.** Molecular basis of *Yersinia enterocolitica* temperature-dependent resistance to antimicrobial peptides. *J Bacteriol.* **194**, 3173-88 (2012A).

**Reinés,M., Llobet,E., Dahlström,K.M., Pérez-Gutiérrez,C., Llupart,C.M., Torrecabota,N., Salminen,T.A. & Bengoechea,J.A.** Deciphering the acylation pattern of *Yersinia enterocolitica* lipid A. *PLoS Pathog.* **8**, e1002978 (2012B).

**Revell,P.A. & Miller,V.L.** A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol.* **35**, 677-85 (2000).

**Riot,B., Berche,P. & Simonet,M.** Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun.* **65**, 1985-90 (1997).

**Roberts,J.A., Marklund,B.I., Ilver,D., Haslam,D., Kaack,M.B., Baskin,G., Louis,M., Möllby,R., Winberg,J. & Normark,S.** The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 11889-93 (1994).

**Roggenkamp,A., Neuberger,H.R., Flügel,A., Schmoll,T. & Heesemann,J.** Substitution of two

histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol.* **16**, 1207-19 (1995).

**Roggenkamp,A., Ruckdeschel,K., Leitritz,L., Schmitt,R. & Heesemann,J.** Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun.* **64**, 2506-14 (1996).

**Roggenkamp,A., Ackermann,N., Jacobi,C.A., Truelzsch,K., Hoffmann,H. & Heesemann,J.** Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol.* **185**, 3735-44 (2003).

**Rohde,J.R., Luan,X.S., Rohde,H., Fox,J.M. & Minnich,S.A.** The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol.* **181**, 4198-204 (1999).

**Rosner,B.M., Stark,K. & Werber,D.** Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health.* **10**, 337 (2010).

**Rosqvist,R., Forsberg,A. & Wolf-Watz,H.** Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun.* **59**, 4562-9 (1991).

**Rosqvist,R. & Wolf-Watz,H.** Virulence plasmid-associated HeLa cell induced cytotoxicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb Pathog.* **1**, 229-40 (1986).

**Ross,J.A. & Plano,G.V.** A C-terminal region of *Yersinia pestis* YscD binds the outer membrane secretin YscC. *J Bacteriol.* **193**, 2276-89 (2011).

**Ruiz,N. & Silhavy,T.J.** Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol.* **8**, 122-6 (2005).

**Russo,F.D. & Silhavy,T.J.** EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J Mol Biol.* **222**, 567-80 (1991).

**Saha,S., Chowdhury,P., Mazumdar,A., Pal,A., Das,P. & Chakrabarti,M.K.** Role of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin (Y-STa) on differential regulation of nuclear and cytosolic calcium signaling in rat intestinal epithelial cells. *Cell Biol Toxicol.* **25**, 297-308 (2009).

**Saha,S., Gupta,D.D. & Chakrabarti,M.K.** Involvement of phospholipase C in *Yersinia enterocolitica* heat stable enterotoxin (Y-STa) mediated rise in intracellular calcium level in rat intestinal epithelial cells. *Toxicon.* **45**, 361-7 (2005).

**Sal-Man,N., Deng,W. & Finlay,B.B.** EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Biochem J.* **442**, 119-25 (2012).

**Samuel,G. & Reeves,P.** Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr Res.* **338**, 2503-19 (2003).



**Samuelsson,K., Lindberg,B. & Brubaker,R.R.** Structure of O-specific side chains of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol.* **117**, 1010-6 (1974).

**Sansonetti,P.J.** War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol.* **4**, 953-64 (2004).

**Sauvonnnet,N., Lambermont,I., van der Bruggen,P. & Cornelis,G.R.** YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol.* **45**, 805-15 (2002).

**Schmiel,D.H., Wagar,E., Karamanou,L., Weeks,D. & Miller,V.L.** Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect Immun.* **66**, 3941-51 (1998).

**Schmiel,D.H., Young,G.M. & Miller,V.L.** The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol.* **182**, 2314-20 (2000).

**Schraidt,O., Lefebvre,M.D., Brunner,M.J., Schmied,W.H., Schmidt,A., Radics,J., Mechtler,K., Galán,J.E. & Marlovits,T.C.** Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog.* **6**, e1000824 (2010).

**Schubert,S., Rakin,A., Karch,H., Carniel,E. & Heesemann,J.** Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* **66**, 480-5 (1998).

**Schubert,S., Rakin,A. & Heesemann,J.** The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol.* **294**, 83-94 (2004).

**Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., von der Mark,K., & Emmrich,F.** Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect Immun.* **60**, 2153-9 (1992).

**Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., Kirsch,T., Swoboda,B., Bull,C., Goodman,S. & Emmrich,F.** Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun.* **61**, 2513-9 (1993).

**Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., von der Mark,K. & Emmrich,F.** Characterization of the binding region for the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA on types I and II collagen. *Arthritis Rheum.* **38**, 1283-9 (1995).

**Schütz,M., Weiss,E.M., Schindler,M., Hallström,T., Zipfel,P.F., Linke,D. & Autenrieth,I.B.** Trimer stability of YadA is critical for virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **78**, 2677-90 (2010).

**Sebbane,F., Devalckenaere,A., Foulon,J., Carniel,E. & Simonet,M.** Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the *ureD* gene. *Infect Immun.* **69**, 170-6 (2001).

**Shao,J., Prince,T., Hartson,S.D. & Matts,R.L.** Phosphorylation of serine 13 is required for the

proper function of the Hsp90 co-chaperone, Cdc37. *J Biol Chem.* **278**, 38117-20 (2003).

**Silhavy,T.J., Kahne,D. & Walker,S.** The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**, a000414 (2010).

**Simonet,M., Riot,B., Fortineau,N. & Berche,P.** Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun.* **64**, 375-9 (1996).

**Simonet,M., Richard,S. & Berche,P.** Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun.* **58**, 841-5 (1990).

**Sing,A., Roggenkamp,A., Geiger,A.M. & Heesemann,J.** *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol.* **168**, 1315-21 (2002).

**Singh,I. & Viridi,J.S.** Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *J Med Microbiol.* **53**, 1065-8 (2004).

**Skurnik,M. & Toivanen,P.** *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide: genetics and virulence. *Trends Microbiol.* **1**, 148-52 (1993).

**Skurnik,M. & Wolf-Watz,H.** Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol.* **3**, 517-29 (1989).

**Skurnik,M., Bölin,I., Heikkinen,H., Piha,S. & Wolf-Watz,H.** Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol.* **158**, 1033-6 (1984).

**Skurnik,M.** Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect Immun.* **47**, 183-90 (1985).

**Skurnik,M. & Toivanen,P.** LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol.* **174**, 2047-51 (1992).

**Skurnik,M., Batsford,S., Mertz,A., Schiltz,E. & Toivanen,P.** The putative arthritogenic cationic 19-kilodalton antigen of *Yersinia enterocolitica* is a urease beta-subunit. *Infect Immun.* **61**, 2498-504 (1993).

**Skurnik,M., el Tahir,Y., Saarinen,M., Jalkanen,S. & Toivanen,P.** YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect Immun.* **62**, 1252-61 (1994).

**Skurnik,M., Venho,R., Toivanen,P. & al-Hendy,A.** A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. *Mol Microbiol.* **17**, 575-94 (1995).

**Skurnik,M.** Genetics of Bacterial polysaccharides. Goldberg,J. (ed.), pp. 23-51 (CRC Press, Boca Raton, FL, 1999A).

**Skurnik,M., Venho,R., Bengoechea,J.A. & Moriyón,I.** The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Mol Microbiol.* **31**, 1443-62 (1999).

**Skurnik,M., Peippo,A. & Ervelä,E.** Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol.* **37**, 316-30 (2000).

**Skurnik,M., Biedzka-Sarek,M., Lübeck,P.S., Blom,T., Bengoechea,J.A., Pérez-Gutiérrez,C., Ahrens,P. & Hoorfar,J.** Characterization and biological role of the O-polysaccharide gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *J Bacteriol.* **189**, 7244-53 (2007).

**Sodeinde,O.A., Subrahmanyam,Y.V., Stark,K., Quan,T., Bao,Y. & Goguen,J.D.** A surface protease and the invasive character of plague. *Science.* **258**, 1004-7 (1992).

**Soncini,F.C. & Groisman,E.A.** Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol.* **178**, 6796-801 (1996).

**Soncini,F.C., García Vescovi,E., Solomon,F. & Groisman,E.A.** Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol.* **178**, 5092-9 (1996).

**Sory,M.P., Boland,A., Lambermont,I. & Cornelis,G.R.** Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 11998-2002 (1995).

**Sprague,L.D. & Neubauer,H.** *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 831-5 (2005).

**Sprague,L.D., Scholz,H.C., Amann,S., Busse,H.J. & Neubauer,H.** *Yersinia similis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**, 952-8 (2008).

**Spreter,T., Yip,C.K., Sanowar,S., André,I., Kimbrough,T.G., Vuckovic,M., Pfuetzner,R.A., Deng,W., Yu,A.C., Finlay,B.B., Baker,D., Miller,S.I. & Strynadka,N.C.** A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol.* **16**, 468-76 (2009).

**Staggs,T.M., Fetherston,J.D. & Perry,R.D.** Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis* *fur* mutation. *J Bacteriol.* **176**, 7614-24 (1994).

**Stainier,I., Bleves,S., Josenhans,C., Karmani,L., Kerbouch,C., Lambermont,I., Töttemeyer,S., Boyd,A. & Cornelis,G.R.** YscP, a *Yersinia* protein required for Yop secretion that is surface exposed, and released in low Ca<sup>2+</sup>. *Mol Microbiol.* **37**, 1005-18 (2000).

**Stebbins,C.E. & Galán,J.E.** Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature.* **414**, 77-81 (2001).

- Stenhouse, M.A. & Milner, L.V.** Yersinia enterocolitica. A hazard in blood transfusion. *Transfusion*. **22**, 396-8 (1982).
- Stock, A.M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N.** Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*. **69**, 183-215 (2000).
- Stoebel, D.M., Free, A. & Dorman, C.J.** Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology*. **154**, 2533-45 (2008).
- Straley, S.C. & Perry, R.D.** Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in Yersinia. *Trends Microbiol*. **3**, 310-7 (1995).
- Sukhan, A., Kubori, T. & Galán, J.E.** Synthesis and localization of the Salmonella SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ. *J Bacteriol*. **185**, 3480-3 (2003).
- Sulakvelidze, A.** Yersiniae other than Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, and Y. pestis: the ignored species. *Microbes Infect*. **2**, 497-513 (2000).
- Tam, C. & Missiakas, D.** Changes in lipopolysaccharide structure induce the sigma(E)-dependent response of Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **55**, 1403-12 (2005).
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. & Sasakawa, C.** Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J*. **19**, 3876-87 (2000).
- Tamm, A., Tarkkanen, A.M., Korhonen, T.K., Kuusela, P., Toivanen, P. & Skurnik, M.** Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of Yersinia enterocolitica. *Mol Microbiol*. **10**, 995-1011 (1993).
- Tampakaki, A.P., Fadouloglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J. & Kokkinidis, M.** Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*. **6**, 805-16 (2004).
- Terashima, H., Kojima, S & Homma, M.** International Review of Cell and Molecular Biology. Kwang, W.J. (ed.), pp. 39-85 (Academic Press, 2008)
- Terti, R., Skurnik, M., Vartio, T. & Kuusela, P.** Adhesion protein YadA of Yersinia species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun*. **60**, 3021-4 (1992).
- Thomson, N.R., Howard, S., Wren, B.W., Holden, M.T., Crossman, L., Challis, G.L., Churcher, C., Mungall, K., Brooks, K., Chillingworth, T., Feltwell, T., Abdellah, Z., Hauser, H., Jagels, K., Maddison, M., Moule, S., Sanders, M., Whitehead, S., Quail, M.A., Dougan, G., Parkhill, J. & Prentice, M.B.** The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity Yersinia enterocolitica strain 8081. *PLoS Genet*. **2**, e206 (2006).
- Tran, H.J., Heroven, A.K., Winkler, L., Spreter, T., Beatrix, B. & Dersch, P.** Analysis of RovA, a

transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation. *J Biol Chem.* **280**, 42423-32 (2005).

**Trent,M.S., Ribeiro,A.A., Lin,S., Cotter,R.J. & Raetz,C.R.** An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem.* **276**, 43122-31 (2001).

**Trosky,J.E., Liverman,A.D. & Orth,K.** *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol.* **10**, 557-65 (2008).

**Trülsch,K., Sporleder,T., Igwe,E.I., Rüssmann,H. & Heesemann,J.** Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun.* **72**, 5227-34 (2004).

**Uliczka,F., Pisano,F., Schaake,J., Stolz,T., Rohde,M., Fruth,A., Strauch,E., Skurnik,M., Batzilla,J., Rakin,A., Heesemann,J. & Dersch,P.** Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. *PLoS Pathog.* **7**, e1002117 (2011).

**Uzzau,S., Figueroa-Bossi,N., Rubino,S. & Bossi,L.** Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 15264-9 (2001).

**Vaara,M.** Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev.* **56**, 395-411 (1992).

**Van Gijsegem,F., Gough,C., Zischek,C., Niqueux,E., Arlat,M., Genin,S., Barberis,P., German,S., Castello,P. & Boucher,C.** The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol.* **15**, 1095-114 (1995).

**Venecia,K. & Young,G.M.** Environmental regulation and virulence attributes of the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *Infect Immun.* **73**, 5961-77 (2005).

**Viboud,G.I. & Bliska,J.B.** *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* **59**, 69-89 (2005).

**Visser,L.G., Annema,A. & van Furth,R.** Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect Immun.* **63**, 2570-5 (1995).

**Vogt,S.L. & Raivio,T.L.** Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol Lett.* **326**, 2-11 (2012).

**Vogt,S.L., Nevesinjac,A.Z., Humphries,R.M., Donnenberg,M.S., Armstrong,G.D. & Raivio,T.L.** The Cpx envelope stress response both facilitates and inhibits elaboration of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus. *Mol Microbiol.* **76**, 1095-110 (2010).

**Von Pawel-Rammingen,U., Telepnev,M.V., Schmidt,G., Aktories,K., Wolf-Watz,H. &**

**Rosqvist,R.** GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol.* **36**, 737-48 (2000).

**Wachtel,M.R. & Miller,V.L.** In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of Yersinia enterocolitica. *Infect Immun.* **63**, 2541-8 (1995).

**Wagner,S., Sorg,I., Degiacomi,M., Journet,L., Dal Peraro,M. & Cornelis,G.R.** The helical content of the YscP molecular ruler determines the length of the Yersinia injectisome. *Mol Microbiol.* **71**, 692-701 (2009).

**Wagner,S., Stenta,M., Metzger,L.C., Dal Peraro,M. & Cornelis,G.R.** Length control of the injectisome needle requires only one molecule of Yop secretion protein P (YscP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 13860-5 (2010).

**Walker,K.A. & Miller,V.L.** Regulation of the Ysa type III secretion system of Yersinia enterocolitica by YsaE/SycB and YsrS/YsrR. *J Bacteriol.* **186**, 4056-66 (2004).

**Walker,K.A., Obrist,M.W., Mildiner-Earley,S. & Miller,V.L.** Identification of YsrT and evidence that YsrRST constitute a unique phosphorelay system in Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol.* **192**, 5887-97 (2010).

**Wang,X et al.** Complete Genome Sequence of a Yersinia enterocolitica “Old World” (3/O:9) Strain and Comparison with the “New World” (1B/O:8) Strain 14. *J Clin Microbiol* **49**, 1251-1259 (2011).

**Wattiau,P., Bernier,B., Deslée,P., Michiels,T. & Cornelis,G.R.** Individual chaperones required for Yop secretion by Yersinia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 10493-7 (1994).

**Wauters,G., Kandolo,K. & Janssens,M.** Revised biogrouping scheme of Yersinia enterocolitica. *Contrib Microbiol Immunol.* **9**, 14-21 (1987).

**Wauters,G., Janssens,M., Steigerwalt,A.G. & Brenner,D.J.** Yersinia mollaretii sp. nov. and Yersinia bercovieri sp. nov., Formerly Called Yersinia enterocolitica Biogroups 3A and 3B. *Int J Syst Bacteriol.* **38**, 424-429 (1988).

**Weiner,L. & Model,P.** Role of an Escherichia coli stress-response operon in stationary-phase survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 2191-5 (1994).

**Weiner,L., Brissette,J.L. & Model,P.** Stress-induced expression of the Escherichia coli phage shock protein operon is dependent on sigma 54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes Dev.* **5**, 1912-23 (1991).

**West,N.P., Sansonetti,P., Mounier,J., Exley,R.M., Parsot,C., Guadagnini,S., Prévost,M.C., Prochnicka-Chalufour,A., Delepierre,M., Tanguy,M. & Tang,C.M.** Optimization of virulence functions through glucosylation of Shigella LPS. *Science.* **307**, 1313-7 (2005).

**Witowski,S.E., Walker,K.A. & Miller,V.L.** YspM, a newly identified Ysa type III secreted protein of Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol.* **190**, 7315-25 (2008).

**Woestyn,S., Allaoui,A., Wattiau,P. & Cornelis,G.R.** YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. *J Bacteriol.* **176**, 1561-9 (1994).

**Wolfe,A.J., Parikh,N., Lima,B.P. & Zemaitaitis,B.** Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR. *J Bacteriol.* **190**, 2314-22 (2008).

**Wösten,M.M. & Groisman,E.A.** Molecular characterization of the PmrA regulon. *J Biol Chem.* **274**, 27185-90 (1999).

**Wösten,M.M., Kox,L.F., Chamnongpol,S., Soncini,F.C. & Groisman,E.A.** A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell.* **103**, 113-25 (2000).

**Wulff-Strobel,C.R., Williams,A.W. & Straley,S.C.** LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in Yersinia pestis to impose a hierarchy of secretion. *Mol Microbiol.* **43**, 411-23 (2002).

**Wyborn,N.R., Stapleton,M.R., Norte,V.A., Roberts,R.E., Grafton,J. & Green,J.** Regulation of Escherichia coli hemolysin E expression by H-NS and Salmonella SlyA. *J Bacteriol.* **186**, 1620-8 (2004).

**Yamashita,S., Lukacik,P., Barnard,T.J., Noinaj,N., Felek,S., Tsang,T.M., Krukonis,E.S., Hinnebusch,B.J. & Buchanan,S.K.** Structural insights into Ail-mediated adhesion in Yersinia pestis. *Structure.* **19**, 1672-82 (2011).

**Yang,Y. & Isberg,R.R.** Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the Yersinia pseudotuberculosis yadA product. *Infect Immun.* **61**, 3907-13 (1993).

**Young,B.M. & Young,G.M.** YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol.* **184**, 1324-34 (2002).

**Young,G.M., Amid,D. & Miller,V.L.** A bifunctional urease enhances survival of pathogenic Yersinia enterocolitica and Morganella morganii at low pH. *J Bacteriol.* **178**, 6487-95 (1996).

**Young,G.M., Schmiel,D.H. & Miller,V.L.** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 6456-61 (1999A).

**Young,G.M., Smith,M.J., Minnich,S.A. & Miller,V.L.** The Yersinia enterocolitica motility master regulatory operon, flhDC, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J Bacteriol.* **181**, 2823-33 (1999B).

**Young,G.M., Badger,J.L. & Miller,V.L.** Motility is required to initiate host cell invasion by Yersinia enterocolitica. *Infect Immun.* **68**, 4323-6 (2000).

**Yuk,M.H., Harvill,E.T. & Miller,J.F.** The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in Bordetella bronchiseptica. *Mol Microbiol.* **28**, 945-59 (1998).

**Zhang,L., al-Hendy,A., Toivanen,P. & Skurnik,M.** Genetic organization and sequence of the rfb gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. *Mol Microbiol.* **9**, 309-21 (1993).

**Zhang,L., Toivanen,P. & Skurnik,M.** 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**, 277-88 (1996).

**Zhang,Y., Murtha,J., Roberts,M.A., Siegel,R.M. & Bliska,J.B.** Type III secretion decreases bacterial and host survival following phagocytosis of *Yersinia pseudotuberculosis* by macrophages. *Infect Immun.* **76**, 4299-310 (2008).

**Zhang,L. & Skurnik,M.** Isolation of an R- M+ mutant of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 and its application in construction of rough mutants utilizing mini-Tn5 derivatives and lipopolysaccharide-specific phage. *J Bacteriol.* **176**, 1756-60 (1994).

**Zhang,L., Radziejewska-Lebrecht,J., Krajewska-Pietrasik,D., Toivanen,P. & Skurnik,M.** Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Mol Microbiol.* **23**, 63-76 (1997).

**Zhou,Z., Ribeiro,A.A., Lin,S., Cotter,R.J., Miller,S.I. & Raetz,C.R.** Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem.* **276**, 43111-21 (2001).

**Zhou,X., Keller,R., Volkmer,R., Krauss,N., Scheerer,P. & Hunke,S.** Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein. *J Biol Chem.* **286**, 9805-14 (2011).



## **ANEXO I**



**Tabla 5. Cebadores utilizados en el estudio.**

<b>Cebadores</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Uso</b>
IntWzzpstbF	AATCACAAATCTGACC GTGCTTG	Construcción del mutante <i>wzz</i> en Ypstb O1B
IntWzzpstbF	TCACTAATGGCTGAGC CATTGC	Construcción del mutante <i>wzz</i> en Ypstb O1B
YeO8YscPUPF1	ACC CAA TGA GCC GCC TG	Construcción del mutante <i>yscP</i> en YeO8
YeO8YscPUPR1	CGG ATC CGT TGG TAG ACA CTT CGG CAA G	Construcción del mutante <i>yscP</i> en YeO8
YeO8YscPDPoWNF1	CGG ATC AGC TGC ATG TAG AAC TGA TCG CCA G	Construcción del mutante <i>yscP</i> en YeO8
YeO8YscPDONWR1	AAG ATT TGC CGC CCC ACT TC	Construcción del mutante <i>yscP</i> en YeO8
PcpxPF	GGAATTCCCAGACCCA GAACCCGATCC	Amplificar la región promotora del gen <i>cpxP</i> para construir cepas indicadoras.
PcpxPR	GGGTACCCGGTCTTAT CAGCGGCGAAG	Amplificar la región promotora del gen <i>cpxP</i> para construir cepas indicadoras.
ProYemgtAF	GGAATTCCCATTGTTT AATACCCGTGAAACG	Amplificar la región promotora del gen <i>mgtA</i> para construir cepas indicadoras.
ProYemgtAR	GCCACTATTCAGGCGA ATAGC	Amplificar la región promotora del gen <i>mgtA</i> para construir cepas indicadoras.
ProInvF	ACTTCCTGATTTGCCG CGTC	Amplificar la región promotora del gen <i>inv</i> para construir cepas indicadoras.
ProInvR	GGAATTCCCCTGTAT GTCTC	Amplificar la región promotora del gen <i>inv</i> para construir cepas indicadoras.
ProClpPF	CCAGAAACAGCATTG CGCTG	Amplificar la región promotora del operón <i>clpXP</i> para construir cepas indicadoras.
ProClpPR	GGAATTCCAAAAGCCC GTAGCCCTATGG	Amplificar la región promotora del operón <i>clpXP</i> para construir cepas indicadoras.

virfPf	CGGATCCCCCTCTCT TTCCAGAGCGAG	Amplificar la región promotora del gen <i>virF</i> para construir cepas indicadoras.
virfPr	CCCAAGCTTGGCAAAA GAATATATAGGCCATC TTG	Amplificar la región promotora del gen <i>virF</i> para construir cepas indicadoras.
YopEPf	CGGATCCGGGTAAAC ATTAATATTTGCCCGA C	Amplificar la región promotora del gen <i>yopE</i> para construir cepas indicadoras.
YopEPr	CCCAAGCTTGGCTGTG AGACTGAGCGCCCAG	Amplificar la región promotora del gen <i>yopE</i> para construir cepas indicadoras.
virFFLAGfw	TCGGATGCACTCCCAG CCAAGCCCGT	Amplificar el gen <i>virF</i> con el epitopo FLAG.
virFFLAGrw	AACCCCGCATTTTACT TTATAGTCCAA	Amplificar el gen <i>virF</i> con el epitopo FLAG.
VirFcheckF1	CGCCTGGATAAGCGA GCGAC	Amplificar el gen <i>virF</i> con el epitopo FLAG.
VirFcheckR1	TTGCTCTATTTGATGG CGCTC	Amplificar el gen <i>virF</i> con el epitopo FLAG.
YscPOF1	GGAATTCCATATGAAT AAAATC	Amplificar la región promotora del gen <i>yscP</i> para complementar las cepas mutantes para el gen <i>yscP</i> .
YscPOR1	CCGCTCGAGTAACAAA CTCAT	Amplificar la región promotora del gen <i>yscP</i> para complementar las cepas mutantes para el gen <i>yscP</i> .

Tabla 6. Cepas de *Yersinia* utilizadas en el estudio.

Cepa o plásmido	Características	Referencia
YeO8c	8081 Cepa restricción negativa. pYV-.	<b>Zhang et al., 1994.</b>
8081 (YeO8)	Derivado R <sup>M+</sup> de la cepa silvestre 8081, serotipo O:8. Patógena, cepa Silvestre.	<b>Zhang et al., 1997.</b>
YeO8Δwzz	Mutante en el gen <i>wzz</i> .	<b>Bengoechea et al., 2002</b>
YeO8ΔyopE	Mutante en el gen <i>yopE</i> por doble recombinación	<b>Reinés et al., 2012B</b>

	del plásmido pKNG101Δ <i>YopE</i> .	
O1B	IP32777 Cepa silvestre.	<b>Sebbane et al., 2001</b>
YpstbO1bc	Cepa sin plásmido de virulencia pYV-. A partir de pases en medio CR-MOX.	Este trabajo
YpstbΔ <i>wzz</i>	Mutante en el gen <i>wzz</i> por recombinación en un punto del plásmido pKNOCK-Int <i>Wzzpstb</i> .	Este trabajo
YeO8Δ <i>YscP</i>	Mutante en el gen <i>yscP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>YscP</i>	Este trabajo
YeO8Δ <i>wzz</i> -Δ <i>YscP</i>	Mutante de YeO8Δ <i>wzz</i> en el gen <i>yscP</i> por doble recombinación del plásmido pKNG101Δ <i>YscP</i> .	Este trabajo
GHY102	Mutante de JB580v en el gen <i>cpxR</i>	<b>Heusipp et al., 2004</b>
YeO8Δ <i>manC</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>manC</i> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8Δ <i>lpxRKm</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>lpxR</i> .	<b>Reinés et al., 2012B</b>
YeO8Δ <i>pagPGB</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>pagP</i> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8Δ <i>pmrF</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>pmrF</i> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8Δ <i>pmrF</i> -Δ <i>pagPGB</i>	Mutante de YeO8Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>pagP</i> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8Δ <i>clpX</i>		<b>Llompart et al.,</b>
YeO8Δ <i>manC</i> -Δ <i>pmrF</i>	Mutante de YeO8Δ <i>manC</i> en el gen <i>pmrF</i>	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8Δ <i>manC</i> -Δ <i>pagPGB</i>	Mutante de YeO8Δ <i>manC</i> en el gen <i>pagP</i>	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8Δ <i>manC</i> -Δ <i>pmrF</i> -Δ <i>pagPGB</i>	Mutante de YeO8Δ <i>manC</i> -Δ <i>pmrF</i> en el gen <i>pagP</i>	<b>Reinés et al., 2012A</b>
Yvm927	Mutante de JB580v en el gen <i>rovA</i> .	Virginia Miller
YeO8Δ <i>MsbGB2</i>	Mutante de YeO8 en el gen de la acetiltransferasa <i>msbB</i> .	<b>Pérez-Gutiérrez et al., 2010</b>
YeO8Δ <i>lpxPGB</i>	Mutante de YeO8 en el gen de la acetiltransferasa <i>lpxP</i> .	<b>Pérez-Gutiérrez et al., 2010</b>
YeO8Δ <i>pmrAB</i>	Mutante de YeO8 en el operón <i>pmrAB</i> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>

YeO8 $\Delta$ <i>phoPQ</i>	Mutante de YeO8 en el operón <i>phoPQ</i>	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8 $\Delta$ <i>phoPQ</i> - $\Delta$ <i>pmrAB</i>	Mutante de YeO8 $\Delta$ <i>phoPQ</i> en el gen <i>pmrAB</i> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
YeO8 $\Delta$ <i>htrBGB</i>	Mutante en el gen de la acetiltransferasa <i>htrB</i> .	<b>Pérez-Gutiérrez et al., 2010</b>
YeO8 $\Delta$ <i>flhDC</i>	Mutante de YeO8 en el gen <i>flhDC</i> .	<b>Miller et al., 2010</b>
GHY102 $\Delta$ <i>flhDC</i>	Mutante de GHY102 en el gen <i>flhDC</i> . Obtenido por conjugación con el vector suicida pKNOCK-FlhDC.	Este trabajo

**Tabla 7. Cepas de *E.coli* utilizadas en el estudio.**

C600	<i>thi thr leuB tonA lacY supE</i>	<b>Appleyard et al., 1954.</b>
DH5 $\alpha$	F'/ <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi</i> <sup>-1</sup> <i>recA1 gyrA</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>relA1</i> $\Delta$ ( <i>lacIZYAargF</i> ) U169 <i>deoR</i> (F80 <i>dlac</i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15)	<b>Hanahan et al., 1983</b>
HB101	<i>Pro leu thi lasY endoI</i> <i>recA</i> <sup>-</sup> . Sm <sup>R</sup>	<b>Ditta et al., 1985</b>

**Tabla 8. Plásmidos utilizados en el estudio.**

pBAD <sub>wzz</sub> Ye	Plásmido pBAD33 inducible con arabinosa con wzz de YeO8	Cepa amablemente cedida por Mikael Skurnik (Finlandia)
pBAD <sub>wzz</sub> Yp	Plásmido pBAD33 inducible con arabinosa con wzz de O1B.	Cepa amablemente cedida por Mikael Skurnik (Finlandia)
pBAD33-wzzAH3	Plásmido pBAD33 inducible con arabinosa con wzz de <i>Aeromonas</i> .	<b>Jiménez et al., 2008</b>
pLM21	Plásmido inducible del promotor T7 con YscP que codifica aguja larga. Str <sup>R</sup>	<b>Wagner et al., 2010</b>
pLM21O8	Plásmido inducible del promotor T7 con YscP que codifica aguja de YeO8. Str <sup>R</sup>	Este trabajo
pGPL01	Plásmido de medio	<b>Gunn et al., 1996</b>

	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> <sup>+</sup> . Ap <sup>R</sup>	
P34S-Tp	Plásmido con un casete de resistencia a Tp flanqueado por múltiples dianas de restricción. Tp <sup>R</sup>	<b>Dennis et al., 1998.</b>
pGPL01Tp	Derivado del plásmido pGPL01 con un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>Pst</i> I. Ap <sup>S</sup> , Tp <sup>R</sup>	<b>Reinés et al., 2012B</b>
pGPL01TpPro <i>cpxP</i>	Región promotora del operón <i>cpxP</i> de YeO8 amplificado por PCR (600 pb) y clonado en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I del plásmido pGPLTp. Tp <sup>R</sup>	Este trabajo
pKNOCK-Cm	Vector suicida. Clm <sup>R</sup>	<b>Alexeyev et al., 1999</b>
pKNOCK- <i>FlhDC</i>	Región promotora del operón <i>flhDC</i> . De YeO8 amplificada por PCR (900 pb) digerida con <i>Bam</i> HI y clonado en el vector suicida pKNOCK-Cm. Para la construcción del mutante <i>FlhDC</i> en YeO8. Clm <sup>R</sup>	<b>Bengoechea et al., 2004</b>
pKNG101	Vector suicida. Str <sup>R</sup>	<b>Kaniga et al., 1991</b>
pKNG101 <i>YscP</i>	Región promotora del gen <i>YscP</i> de YeO8 amplificada por PCR (1719 pb) digerida con <i>Pvu</i> II y clonado en el vector suicida pKNG101. Para la construcción del mutante <i>YscP</i> en YeO8 y YeO8Δ <i>wzz</i> . Str <sup>R</sup>	Este trabajo
pGPL01Tp <i>prodacB</i>	Región promotora del operón <i>daBpmrAB</i> de YeO8 amplificada por PCR (416 pb), digerida con <i>Eco</i> RI y clonado en el	<b>Reinés et al., 2012A</b>

	sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp <sup>R</sup>	
pGPL01YePhtrB	Región promotora del gen <i>htrB</i> de YeO8 amplificada por PCR (1000 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01.. Amp <sup>R</sup>	<b>Pérez-Gutiérrez et al., 2002</b>
pGPLYePhtrBTp	Plásmido pGPLPYehtrB digerido con <i>PstI</i> en el que se ha clonado un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>PstI</i> . Amp <sup>R</sup> , Tp <sup>R</sup> .	<b>Pérez-Gutiérrez et al., 2002</b>
pGPLProIpxP	Región promotora del gen <i>lpxP</i> de Yeo8 amplificada por PCR (1100 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01. Amp <sup>R</sup>	<b>Pérez-Gutiérrez et al., 2002</b>
pGPL01TpPIpxP	Plásmido pGPLProIpxP digerido con <i>PstI</i> en el que se ha clonado un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>PstI</i> . Amp <sup>R</sup> , Tp <sup>R</sup>	<i>Tesis Mar</i>
pGPL01TpYeIpxR	Región promotora del gen <i>lpxR</i> de Yeo8 amplificada por PCR (1336 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp.. Tp <sup>R</sup>	<b>Reinés et al., 2012B</b>
pGPL01TpProYemgta	Región promotora del operón <i>mgtA</i> de YeO8 amplificado por PCR (840 pb) y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPLTp. Tp <sup>R</sup>	Este trabajo
pGPL01TpprophoPQ	Región promotora del operón <i>phoPQ</i> de Yeo8 amplificada por PCR (509 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp <sup>R</sup>	<b>Reinés et al., 2012A</b>
pRV1	Plásmido suicida derivado de pJM703.1. Cm <sup>R</sup>	<b>Skurnik et al., 1995</b>
pRVProvAlucFF	Fragmento <i>ProvAlucFF</i> amplificado por PCR	<b>Pérez-Gutiérrez et al., 2002</b>



	(2.7Kb) 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 <sup>R</sup> .	
pSRFlhDCO8luc	Plásmido pRV1 con la fusión transcripcional <i>flhDC::lucFF</i> . Usado para construir cepas indicadoras para el promotor <i>flhDC</i> de YeO8. Cm <sup>R</sup>	<b>Bengoechea et al., 2004</b>
pGPL01Tprougd	Región promotora del gen <i>ugd</i> de YeO8 amplificada por PCR (889 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp <sup>R</sup> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
pGPL01TppropmrH	Región promotora del operón <i>pmrHFIJKL</i> de YeO8 amplificada por PCR (667 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp <sup>R</sup> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
pGPL01TppropagP	Región promotora del gen <i>pagP</i> de YeO8 amplificada por PCR (1096 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp <sup>R</sup> .	<b>Reinés et al., 2012A</b>
pGPL01TpYeO8inv	Región promotora del gen <i>inv</i> de YeO8 amplificada por PCR (923 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido pGPL01Tp. Tp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGPL01TpproclpXP	Región promotora del operón <i>clpXP</i> de YeO8 amplificada por PCR (603 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>EcoRI-SmaI</i> del plásmido	Este trabajo

	pGPL01Tp. Tp <sup>R</sup> .	
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 <sup>R</sup>	<b>Miller et al., 2010</b>
pPROBE-gfp[LVA]Tp	Derivado del plásmido pPROBE-gfp[LVA] con un casete de Tp (p34S-Tp) clonado en el sitio <i>SmaI</i> . Tp <sup>R</sup>	<b>Anna Tomàs</b>
pPROBEgfpTp <i>virF</i>	Región promotora del gen <i>virF</i> de YeO8 amplificada por PCR (342 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pPROBE-gfp[LVA]Tp. Tp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pPROBEgfpTp <i>YopE</i>	Región promotora del gen <i>yopE</i> de YeO8 amplificada por PCR (442 pb), digerida con <i>EcoRI</i> y clonado en el sitio <i>SmaI</i> del plásmido pPROBE-gfp[LVA]Tp. Tp <sup>R</sup> .	Este trabajo
pTM100	Plásmido movilizable (mob <sup>+</sup> ) de medio número de copia, derivado de pACYC184. Usado en estudios de complementación o sobreexpresión. Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> .	<b>Michiels et al., 1991</b>
pTMYe <i>flhDC</i> -Flag	Fragmento <i>flhDC</i> de YeO8 amplificado por PCR con una cola FLAG y clonado en el sitio <i>ScaI</i> de pTM100. Tet <sup>R</sup>	<b>Catalina M. Llompart</b>
pSUB11	Plásmido que añade el epitopo 3xFLAG y el casete de km cassette flanqueado por los sitios FRT. km <sup>R</sup>	<b>Uzzau et al., 2001</b>
pKOBEG	Plásmido que contiene el	<b>Chaverroche et al., 2000</b>

	operon $red\gamma\beta\alpha$ del fago $\lambda$ . Termosensible e inducible con arabinosa. $Cm^R$	
pKOBEG- <i>sacB</i>	Plásmido que contiene el operon $red\gamma\beta\alpha$ del fago $\lambda$ y el gen <i>sacB</i> . Termosensible, inducible con arabinosa y se elimina con sacarosa. $Cm^R$	<b>Derbise et al., 2003</b>
pRK2013	$mob^+$ , $tra^+$ , plásmido autotransmisible. Usado para la movilización de plásmidos que no son autotransmisibles (plásmido facilitados en conjugaciones triparentales). $Km^R$	<b>Ditta et al., 1985</b>



## **ANEXO II**



# Deciphering the Acylation Pattern of *Yersinia enterocolitica* Lipid A

Mar Reinés<sup>1,2</sup>, Enrique Llobet<sup>1</sup>, Käthe M. Dahlström<sup>3</sup>, Camino Pérez-Gutiérrez<sup>1</sup>, Catalina M. Llompарт<sup>1</sup>, Nuria Torrecabota<sup>1</sup>, Tiina A. Salminen<sup>3</sup>, José A. Bengoechea<sup>1,2\*</sup>

**1** Laboratory Microbial Pathogenesis, Fundació d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (FISIB), Recinto Hospital Joan March, Bunyola, Spain, **2** Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain, **3** Structural Bioinformatics Laboratory, Department of Biosciences, Åbo Akademi University, Turku, Finland

## Abstract

Pathogenic bacteria may modify their surface to evade the host innate immune response. *Yersinia enterocolitica* modulates its lipopolysaccharide (LPS) lipid A structure, and the key regulatory signal is temperature. At 21°C, lipid A is hexa-acylated and may be modified with aminoarabinose or palmitate. At 37°C, *Y. enterocolitica* expresses a tetra-acylated lipid A consistent with the 3'-O-deacylation of the molecule. In this work, by combining genetic and mass spectrometric analysis, we establish that *Y. enterocolitica* encodes a lipid A deacylase, LpxR, responsible for the lipid A structure observed at 37°C. Western blot analyses indicate that LpxR exhibits latency at 21°C, deacylation of lipid A is not observed despite the expression of LpxR in the membrane. Aminoarabinose-modified lipid A is involved in the latency. 3-D modelling, docking and site-directed mutagenesis experiments showed that LpxR D31 reduces the active site cavity volume so that aminoarabinose containing Kdo<sub>2</sub>-lipid A cannot be accommodated and, therefore, not deacylated. Our data revealed that the expression of *lpxR* is negatively controlled by RovA and PhoPQ which are necessary for the lipid A modification with aminoarabinose. Next, we investigated the role of lipid A structural plasticity conferred by LpxR on the expression/function of *Y. enterocolitica* virulence factors. We present evidence that motility and invasion of eukaryotic cells were reduced in the *lpxR* mutant grown at 21°C. Mechanistically, our data revealed that the expressions of *flhDC* and *rovA*, regulators controlling the flagellar regulon and invasin respectively, were down-regulated in the mutant. In contrast, the levels of the virulence plasmid (pYV)-encoded virulence factors Yops and YadA were not affected in the *lpxR* mutant. Finally, we establish that the low inflammatory response associated to *Y. enterocolitica* infections is the sum of the anti-inflammatory action exerted by pYV-encoded YopP and the reduced activation of the LPS receptor by a LpxR-dependent deacylated LPS.

**Citation:** Reinés M, Llobet E, Dahlström KM, Pérez-Gutiérrez C, Llompарт CM, et al. (2012) Deciphering the Acylation Pattern of *Yersinia enterocolitica* Lipid A. *PLoS Pathog* 8(10): e1002978. doi:10.1371/journal.ppat.1002978

**Editor:** Ralph R. Isberg, Tufts University School of Medicine, United States of America

**Received:** May 15, 2012; **Accepted:** September 5, 2012; **Published:** October 25, 2012

**Copyright:** © 2012 Reinés et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Fellowship support to C.M.L. from Govern Illes Balears is gratefully acknowledged. M.R. is the recipient of a JAE PreDOC fellowship (JAEPre\_07\_00250). This work has been funded by the Sigrid Juselius Foundation, and the Tor, Joe and Pentti Borgs Foundation to T.A.S. and by a grant from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spain) (Intramural Program 2008201174) to J.A.B.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: bengoechea@caubet-cimera.es

## Introduction

Lipopolysaccharide (LPS) is one of the major surface components of Gram-negative bacteria. The molecular structure of LPS is rather unique: an amphiphile with a hydrophobic region, the so-called lipid A, adjacent to a densely negatively charged polysaccharide. In *Escherichia coli* K-12, the lipid A is a  $\beta(1\text{'-}6)$ -linked disaccharide of glucosamine phosphorylated at the 1 and 4' positions with positions 2, 3, 2', and 3' acylated with *R*-3-hydroxymyristoyl groups, the so-called lipid IV<sub>A</sub>. The 2' and 3'*R*-3-hydroxymyristoyl groups are further acylated with laureate (C<sub>12</sub>) and myristate (C<sub>14</sub>), respectively, by the action of the so-called late acyltransferases LpxL (HtrB) and LpxM (MsbB), respectively [1]. When *E. coli* is grown at 12°C, LpxP, the cold-temperature-specific late acyltransferase, acts instead of LpxL adding palmitoleate (C<sub>16:1</sub>) [1]. Although the enzymes required to synthesize the lipid A are conserved throughout all Gram-negative bacteria there is heterogeneity on lipid A structure among Gram-negative bacteria compared to the *E. coli* K-12. This is due to differences in the type and length of fatty acids, in the presence of

decorations such as aminoarabinose or phosphoethanolamine and even in the removal of groups such as phosphates or fatty acids from lipid A [2].

LPS plays a crucial role during recognition of microbial infection by the host immune system. In fact, the lipid A moiety is a ligand of the Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 2 complex [3]. The stimulation of this receptor complex triggers the activation of signalling cascades resulting in the induction of antimicrobial genes and release of cytokines, thereby initiating inflammatory and immune defence responses. Perusal of the literature demonstrates that changes in the number of acyl chains and in the phosphorylation status of the headgroup greatly affect the biological activity of lipid A. It is not surprising that some pathogens modulate their lipid A structure to alter their detection by the host; being these regulated changes important virulence traits (for a review see [4]). Furthermore, given the importance of the LPS structure to the homeostasis of the outer membrane, it is possible that the aforementioned changes may also affect the physiology of the outer membrane as was recently demonstrated for *Salmonella* [5].

## Author Summary

Lipopolysaccharide (LPS) is one of the major surface components of Gram-negative bacteria. The LPS contains a molecular pattern recognized by the innate immune system. Not surprisingly, the modification of the LPS pattern is a virulence strategy of several pathogens to evade the innate immune system. *Yersinia enterocolitica* causes food-borne infections in animals and humans (yersiniosis). Temperature regulates most, if not all, virulence factors of yersiniae including the structure of the LPS lipid A. At 21°C, lipid A is mainly hexa-acylated and may be modified with aminoarabinose or palmitate. In contrast, at 37°C, *Y. enterocolitica* expresses a unique tetra-acylated lipid A. In this work, we establish that *Y. enterocolitica* encodes a lipid A deacylase, LpxR, responsible for the lipid A structure expressed by the pathogen at 37°C, the host temperature. Our findings also revealed that the low inflammatory response associated to *Y. enterocolitica* infections is the sum of the anti-inflammatory action exerted by a *Yersinia* protein translocated into the cytosol of macrophages and the reduced activation of the LPS receptor complex due to the expression of a LpxR-dependent deacylated LPS.

The genus *Yersinia* includes three human pathogens: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*. The latter can cause food-borne infections in animals and humans (yersiniosis), with symptoms such as enteritis and mesenteric lymphadenitis [6]. *Y. enterocolitica* is endowed with a repertoire of virulence factors that help bacteria to colonize the intestinal tract and to resist host defence mechanisms [7,8]. Temperature regulates most, if not all, virulence factors of yersiniae [7,8]. Recent studies have shown that temperature also regulates the structure of yersiniae lipid A [9–14]. Thus the number and type of the lipid A fatty acids and the substitutions of the 1- and 4'-positions in the glucosamine disaccharide can vary. Rebeil and co-workers [12] elegantly demonstrated that a shift in temperature induces a change in the number and type of acyl groups on the lipid A of the three *Yersinia* species. At 21°C, lipid As are mainly hexa-acylated whereas at 37°C they are tetra-acylated [12]. The temperature-dependent regulation of the lipid A acyltransferases underlines the shift in lipid A acylation both in *Y. pestis* and in *Y. enterocolitica* [12,14]. Pathogenic yersiniae also express hepta-acylated lipid A due to the addition of C<sub>10</sub>, in *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis*, or C<sub>16</sub> (palmitate), in *Y. enterocolitica* [12,14,15]. PagP is the acyltransferase responsible for the addition of palmitate to the lipid A in *Y. enterocolitica* [15]. Other lipid A species are consistent with the substitution of the phosphate at the 4' end of the glucosamine disaccharide with aminoarabinose [15]. The aminoarabinose content is temperature-regulated in *Y. pestis* and in *Y. enterocolitica* [12,15,16]; being higher in bacteria grown at 21°C than at 37°C. Similar to other Gram-negative bacteria, the products of *ugd* and *pmrHFIJKLM* (*arnBCADTEF*) (hereafter *pmrF* operon) are required for the synthesis and addition of aminoarabinose to lipid A in *Y. enterocolitica* [15]. Finally, we and others [9–14,17] have reported a unique tetra-acyl lipid A species (*m/z* 1388) found only in *Y. enterocolitica* grown at 37°C. Evidence support the notion that this species lacks the ester-linked *R*-3-hydroxymyristoyl group further acylated with laureate (C<sub>12</sub>) [12,14,17]. Indeed, mass spectrometry analysis did confirm that the nonreducing glucosamine of the lipid A is substituted with only one (amide-linked) *R*-3-hydroxymyristoyl group further acylated with myristate (C<sub>14</sub>) [17]. Altogether, these findings strongly suggest that the tetra-acyl lipid A species (*m/z*

1388) may be caused by a deacylase removing the 3'-acyloxyacyl residue of the lipid A. The work described in this article gives experimental support to this hypothesis and explores the impact of the lipid A structure on *Y. enterocolitica* virulence traits.

## Results

### Identification of the *Y. enterocolitica* 3'-O-deacylase of lipid A

Further confirming previous findings [14,15], lipid A isolated from *Y. enterocolitica* 8081 serotype O:8 (hereafter YeO8; Table 1) grown at 37°C appeared to be identical to those reported by Rebeil *et al.* and Oertelt *et al.* [12,17]. The main species were a 3'-O-deacylated form (*m/z* 1388) containing two glucosamines, two phosphates, three 3-OH-C<sub>14</sub>, and one C<sub>14</sub>; and a hexa-acylated form (*m/z* 1797) (Figure 1A). In bacteria grown at 21°C, a minor species (*m/z* 1414) was detected and may represent a 3'-O-deacylated form containing three 3-OH-C<sub>14</sub> and one C<sub>16:1</sub> [12]. *S. enterica* serovar *typhimurium* and *Helicobacter pylori* also express 3'-O-deacylated lipid A species [18,19]. A membrane located hydrolase, named LpxR, removes the 3'-acyloxyacyl residue of lipid A in both organisms [18,19]. *In silico* analysis of the YeO8 genome (accession number AM286415; [20]) revealed that this pathogen may encode an LpxR orthologue (locus tag YE3039). The predicted YeO8 LpxR (YeLpxR) has 73% and 20% amino acid identities to *S. enterica* and *H. pylori* LpxR proteins, respectively. Furthermore, YeLpxR has 100% amino acid identity to *Y. enterocolitica* Y11 serotype O:3 (locus tag Y11\_05741; accession number FR729477) and Y105 serotype O:9 (locus tag YE105\_C2442; accession number CP002246) LpxR homologs. Analysis of the available *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* genomes revealed that they do not encode any gene similar to *lpxR*.

YeO8 *lpxR* was mutated to determine whether this gene is indeed responsible for removing the 3'-acyloxyacyl residue of lipid A. MALDI-TOF mass spectrometry studies showed that, at 37°C, the *lpxR* mutant (YeO8-Δ*lpxR*Km) produced a lipid A which lacked the unique tetra-acyl lipid A species (*m/z* 1388) found in YeO8 and only contained the hexa-acylated species (*m/z* 1797; four 3-OH-C<sub>14</sub>, one C<sub>12</sub> and one C<sub>14</sub>) (Figure 1B). At 21°C, lipid A isolated from YeO8-Δ*lpxR*Km was similar to that of YeO8 although without the minor species *m/z* 1414 (Figure 1B). Complementation of the mutant with pTMLpxR restored the presence of the tetra-acyl species (Figure 1C).

In summary, our results confirmed the predicted function of *Y. enterocolitica* O:8 *lpxR* homolog as the lipid A 3'-O-deacylase.

### Expression of *lpxR*

The LpxR-dependent lipid A deacylation was more evident on bacteria grown at 37°C than at 21°C, hence suggesting that the expression and/or function of the deacylase might be temperature-regulated, being higher at 37°C than at 21°C. To monitor transcription of *lpxR* quantitatively, a transcriptional fusion was constructed in which a promoterless *lucFF* gene was under the control of the *lpxR* promoter region (see Material and Methods); thereafter *lpxR::lucFF* was introduced into YeO8 and the luciferase activity was determined. The expression of the fusion was higher at 21°C than at 37°C (Figure 2A). Real time (RT) quantitative PCR (RT-qPCR) experiments showed that *lpxR* mRNA levels were also higher at 21°C than at 37°C (Figure 2B).

To assess LpxR levels, the C-terminus of the protein was tagged with a FLAG epitope and the construct was cloned into the medium-copy plasmid pTM100 to obtain pTMLpxRFLAG (see Materials and Methods). This plasmid restored the presence of the tetra-acyl species (*m/z* 1414 and *m/z* 1388) in the lipid A of YeO8-



**Table 1.** Strains and plasmids used in this study.

Bacterial strains and plasmids	Genotype or comments	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
C600	<i>thi thr leuB tonA lacY supE</i>	[80]
CC118- $\lambda$ pir	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>araD139 <math>\Delta</math>lacX74 galE galK <math>\Delta</math>phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1</i>	
DH5 $\alpha$ - $\lambda$ pir	<i>DlacU169 (F80lacZDM15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1, <math>\lambda</math>pir</i> phage lysogen.	
MG1655	<i>F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
8081-R <sup>-</sup> M <sup>+</sup> (YeO8)	Derivative of wild type strain 8081; pYV <sup>+</sup>	[81]
8081-c R <sup>-</sup> M <sup>+</sup> (YeO8c)	R <sup>-</sup> M <sup>+</sup> derivative of 8081-c the pYV-cured derivative of 8081	[81]
YeO8- $\Delta$ <i>pmrF</i>	YeO8, $\Delta$ <i>pmrF</i> , <i>pmrF</i> internal fragment deleted by double crossover	[15]
YeO8- $\Delta$ <i>pagPGB</i>	YeO8, $\Delta$ <i>pagP::Km-GenBlock</i> , Km <sup>R</sup> , <i>pagP</i> gene is inactivated	[15]
YeO8- $\Delta$ <i>lpxR</i> Km	YeO8, $\Delta$ <i>lpxR::Km</i> , Km <sup>R</sup> , <i>lpxR</i> gene is inactivated	This study
YeO8- $\Delta$ <i>lpxR</i>	YeO8- $\Delta$ <i>lpxR</i> Km, $\Delta$ <i>lpxR</i> , Km cassette removed by Flp-mediated recombination, <i>lpxR</i> internal fragment deleted.	This study
YeO8- $\Delta$ <i>pmrF</i> - $\Delta$ <i>lpxR</i> KM	YeO8- $\Delta$ <i>pmrF</i> , $\Delta$ <i>lpxR::Km</i> , Km <sup>R</sup> , <i>lpxR</i> gene is inactivated	This study
YeO8- $\Delta$ <i>pmrAB</i>	YeO8, $\Delta$ <i>pmrAB</i> , internal fragment deleted by double crossover	[15]
YeO8- $\Delta$ <i>phoPQ</i>	YeO8, $\Delta$ <i>phoPQ</i> , internal fragment deleted by double crossover	[15]
Yvm927	<i>rovA</i> deletion mutant in JB580v	[23]
YeO8- $\Delta$ <i>phoPQ</i> - $\Delta$ <i>pmrAB</i>	YeO8- $\Delta$ <i>phoPQ</i> , $\Delta$ <i>pmrAB</i> ; internal fragment deleted by double crossover	[15]
Yvm927- $\Delta$ <i>phoPQ</i>	Yvm927, $\Delta$ <i>phoPQ</i> internal fragment deleted by double crossover	[15]
Yvm927- $\Delta$ <i>phoPQ</i> - $\Delta$ <i>pmrAB</i>	Yvm927- $\Delta$ <i>phoPQ</i> , $\Delta$ <i>pmrAB</i> ; internal fragment deleted by double crossover	[15]
YeO8- $\Delta$ <i>yopE</i>	YeO8, $\Delta$ <i>yopE</i> , <i>yopE</i> internal fragment deleted by double crossover.	This study
YeO8- $\Delta$ <i>yopPKm</i>	YeO8, $\Delta$ <i>yopP::Km</i> , Km <sup>R</sup> , <i>yopP</i> gene inactivated	This study
YeO8- $\Delta$ <i>yopP</i>	YeO8- $\Delta$ <i>yopPKm</i> , $\Delta$ <i>yopP</i> , Km cassette removed by Flp-mediated recombination, <i>yopP</i> internal fragment deleted.	This study
YeO8- $\Delta$ <i>yopP</i> - $\Delta$ <i>lpxR</i> Km	YeO8- $\Delta$ <i>yopP</i> , $\Delta$ <i>lpxR::Km</i> , Km <sup>R</sup> , <i>lpxR</i> gene is inactivated	This study
<b>Plasmids</b>		
pGEM-T Easy	Cloning plasmid, Amp <sup>R</sup>	Promega
p34S-Tp	Source of Tp cassette, Amp <sup>R</sup> , Tp <sup>R</sup>	[64]
pGPL01Tp	Firefly luciferase transcriptional fusion suicide vector, Tp <sup>R</sup>	[15]
pGEMTFRTKm	Km cassette source for mutagenesis flanked by BamHI-FRT sites, Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	[82]
pFLP2	Plasmid encoding FLP to remove cassettes between FRT sites. Mobilizable. <i>sacB</i> for counterselection, Amp <sup>R</sup>	[63]
pFLP2Tp	Trimethoprim resistance cassette cloned into Scal site of pFLP2, Tp <sup>R</sup>	This study
pKNG101	<i>oriR6K Mob<sup>+</sup>, sacB</i> for counterselection, Str <sup>R</sup>	[62]
pTM100	<i>Mob<sup>+</sup></i> , derived of pACYC184, Cm <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup>	[40]
pTMLpxR	1.5 kb wild-type <i>lpxR</i> locus cloned into pTM100, Tet <sup>R</sup>	This study
pTMLpxRFLAG	1.4 kb wild-type locus with a <i>flag</i> sequence cloned into pTM100, Tet <sup>R</sup>	This study
pTMLpxR(N9A)FLAG	1.4 kb <i>lpxR</i> allele with a <i>flag</i> sequence cloned into pTM100, Tet <sup>R</sup>	This study
pTMLpxR(S34A)FLAG	1.4 kb <i>lpxR</i> allele with a <i>flag</i> sequence cloned into pTM100, Tet <sup>R</sup>	This study
pGEMT $\Delta$ <i>lpxR</i>	pGEM-T Easy containing $\Delta$ <i>lpxR</i> deleted gene, Amp <sup>R</sup>	This study
pGEMT $\Delta$ <i>lpxR</i> Km	pGEM-T Easy containing $\Delta$ <i>lpxR::Km</i> , Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	This study
pGEMT $\Delta$ <i>yopE</i>	pGEM-T Easy containing $\Delta$ <i>yopE</i> deleted gene, Amp <sup>R</sup>	This study
pGEMT $\Delta$ <i>yopP</i>	pGEM-T Easy containing $\Delta$ <i>yopP</i> deleted gene, Amp <sup>R</sup>	This study
pGEMT $\Delta$ <i>yopPKm</i>	pGEM-T Easy containing $\Delta$ <i>yopP::Km</i> , Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	This study
pKNG $\Delta$ <i>lpxR</i> Km	pKNG101 containing $\Delta$ <i>lpxR::Km</i> , Km <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This study
pKNG $\Delta$ <i>yopPKm</i>	pKNG101 containing $\Delta$ <i>yopP::Km</i> , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	This study
pKNG $\Delta$ <i>yopE</i>	pKNG101 containing $\Delta$ <i>yopE</i> , Str <sup>R</sup>	This study
pRVProrovAlucFF	pRV1 containig <i>rovA::lucFF</i> ; Cm <sup>R</sup>	[14]

Table 1. Cont.

Bacterial strains and plasmids	Genotype or comments	Source or reference
pGPL01TpYelpxR	pGPL01Tp containing a 443-bp DNA fragment corresponding to the <i>lpxR</i> promoter region, T <sub>p</sub> <sup>R</sup>	This study
pDHS45	pFUSE containing <i>yplXA'::lacZYA</i> , Cm <sup>R</sup>	[29]
pRSFlhDC08	pRV1 containing <i>flhDC::lucFF</i> , Cm <sup>R</sup>	[26]
pRVProrovAlucFF	pRV1 containing <i>rovA::lucFF</i> , Cm <sup>R</sup>	[14]
pINP41	pEP184 containing <i>invA412::phoA</i> , Clm <sup>R</sup>	[32]

doi:10.1371/journal.ppat.1002978.t001

$\Delta$ *lpxR*Km (data not shown). Western blot analysis of purified membranes from YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km containing pTMLpxRFLAG showed that LpxR levels were higher in membranes from bacteria grown at 21°C than at 37°C (Figure 2C). Altogether, it can be concluded that the expression of *lpxR* is indeed temperature-regulated but, in contrast to our initial hypothesis, its expression is higher at 21°C than at 37°C.

The apparent contradiction between the mass spectrometry analysis, more deacylation at 37°C, and the Western blot data, higher levels of LpxR at 21°C than at 37°C, led us to explore whether low temperature may affect the function of the enzyme. Since *E. coli* has been used as surrogate host to characterize *Salmonella* LpxR (StLpxR) function [18], we mobilized pTMLpxR into *E. coli* MG1655 to analyze lipid A species by mass spectrometry in bacteria grown at 21°C and 37°C. Results shown in figure 3 demonstrate that LpxR did deacylate the *E. coli* lipid A from bacteria grown either at 21 or 37°C as detected by the presence of species *m/z* 1360 (Figure 3C–D). This species was found previously in *E. coli* expressing StLpxR [18]. Of note, the species *m/z* 1414, which is consistent with the deacylation of the species *m/z* 1850 containing palmitoleate (C<sub>16:1</sub>) instead of laureate (C<sub>12</sub>), was observed only in *E. coli* grown at 21°C. LpxP is the cold-temperature-specific late acyltransferase responsible for the addition of palmitoleate [1]. Altogether, our results indicate that the reduced LpxR-dependent deacylation found in YeO8 grown at 21°C cannot be attributed to a general lack of function of the enzyme at this temperature.

### Lipid A modification with aminoarabinose affects LpxR-dependent deacylation

We sought to determine why LpxR activity was not observed in YeO8 grown at 21°C despite the detection of the enzyme in the membrane. Among other possibilities, we speculated that specific features of YeO8 lipid A found only at 21°C might be responsible for the reduced LpxR activity. Furthermore, these features should be absent in *E. coli* grown at 21°C since LpxR-dependent activity was observed here. A conspicuous difference between YeO8 and *E. coli* lipid As is the presence of aminoarabinose and palmitate (*m/z* 1954 and 2063, respectively) only in the former [14,15]. Therefore, we explored whether any of these modifications could account for the reduced LpxR activity. In YeO8, similarly to other Gram-negative pathogens, the products of the *pmrF* operon are required for the synthesis and addition of aminoarabinose to lipid A whereas the acyltransferase PagP is required for the addition of palmitate to lipid A [15]. The lipid A from the *pagP* mutant, YeO8- $\Delta$ *pagP*GB, grown at 21°C resembled that of the wild-type strain, except that the species containing palmitate (*m/z* 2063) was not detected (Figure 4A). In contrast, the tetra-acylated species (*m/z* 1414) was clearly observed in the lipid A from YeO8- $\Delta$ *pmrF*

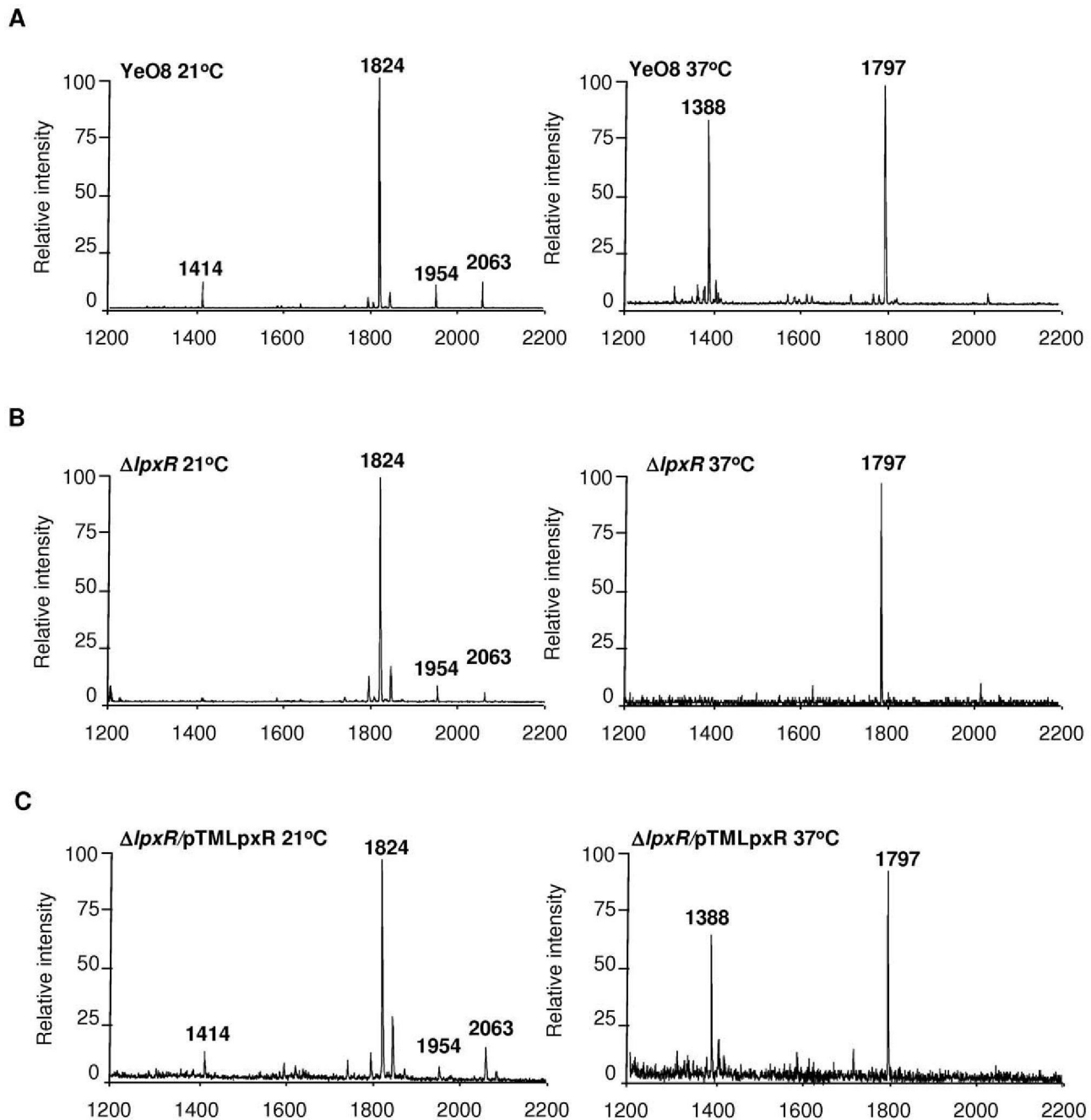
grown at 21°C (Figure 4C). This was dependent on LpxR activity since the peak was absent in the double mutant YeO8- $\Delta$ *pmrF*- $\Delta$ *lpxR*Km (Figure 4E). LpxR-dependent deacylation of lipid A (*m/z* 1388) observed in bacteria grown at 37°C was not affected in either *pmrF* or *pagP* single mutants (Figure 4B, D). Control experiments revealed that *lpxR* expression was not affected in YeO8- $\Delta$ *pmrF* since the expression of the *lpxR::lucFF* fusion was not significantly different between YeO8 and the *pmrF* mutant either grown at 21°C or at 37°C (Figure 4G).

On the whole, these results are consistent with the notion that the reduced LpxR activity observed in YeO8 at 21°C is associated with the lipid A modification with aminoarabinose.

### LpxR 3-D modelling

Our findings might suggest that aminoarabinose-containing LPS may directly inactivate the lipid A deacylase activity of YeLpxR. Alternatively, modification of lipid A with aminoarabinose could inhibit the physical interaction of LPS with YeLpxR. To explore this, the 3-D structure of YeLpxR was modeled (Figure 5A). The amino acids 1–296 (following the putative signal sequence) could be modeled based on the crystal structure of StLpxR (PDB code 3FID; [21]) and the sequence alignment between StLpxR and YeLpxR (Figure S1). The fold of the resulting model is likely to be of good quality, since YeLpxR has such a high sequence identity to StLpxR (75%). Additionally, the important StLpxR amino acids identified by Rutten and co-workers [21] are conserved in YeLpxR. Six amino acids differ between the YeLpxR and the StLpxR active sites (Figure S1). Major differences are D31 and Q35 in YeLpxR, of which D31 is closer to the active site (Figure 5B). The corresponding amino acids are much smaller in StLpxR, glycine and an alanine, respectively, which cause StLpxR to have a bigger cavity. StLpxR has a protruding cavity close to K67, which cannot be found in YeLpxR (Figure 6A). The difference is induced by D31 in YeLpxR, which occupies more space than G31 in StLpxR. As a consequence, the conserved K67 adopts a different conformation in the YeLpxR model. Due to D31, the cavity in YeLpxR is divided into two parts with a narrow connection, and this amino acid also prevents YeLpxR from forming an inward protruding cavity similar to the one found near G31 in StLpxR (Figure 6A).

Docking of a modified Kdo<sub>2</sub>-lipid A molecule (see Materials and methods) to the model of YeLpxR showed that the phosphate group, which attaches aminoarabinose to Kdo<sub>2</sub>-lipid A, binds into the cavity in the vicinity of K67 and D31 (Figure 6B). Docking of the same molecule to the crystal structure of StLpxR yielded a result where the phosphate group was located in the protruding cavity close to K67 (Figure 6C). As expected, docking of the modified Kdo<sub>2</sub>-lipid A molecule with aminoarabinose to the



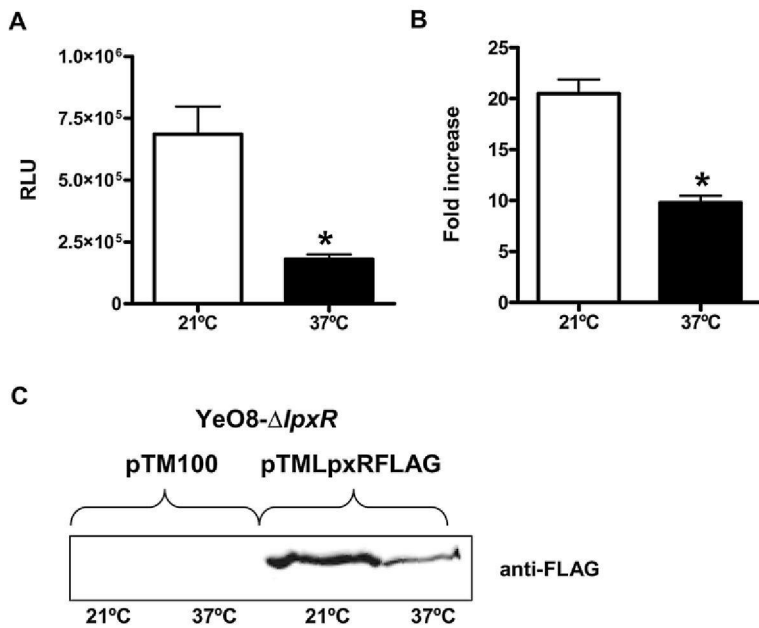
**Figure 1. Lipid A analysis from *Y. enterocolitica* *lpxR* mutant.** (A) Negative ion MALDI-TOF mass spectrometry spectra of lipid A isolated from YeO8 grown at 21°C and 37°C. (B) Negative ion MALDI-TOF mass spectrometry spectra of lipid A isolated from YeO8- $\Delta lpxR$ Km ( $\Delta lpxR$ ) grown at 21°C and 37°C. (C) Negative ion MALDI-TOF mass spectrometry spectra of lipid A isolated from YeO8- $\Delta lpxR$ Km carrying pTMLpxR grown at 21°C and 37°C. The results in all panels are representative of three independent lipid A extractions. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g001

YeLpxR model did not give any valuable result. On the other hand, when the same molecule was docked to the StLpxR crystal structure, aminoarabinose was bound close to G31. It occupies the space corresponding to the narrow connection of the two larger cavities in YeLpxR (Figure 6D)

As a result from the modeling and docking studies, we suggest that Kdo<sub>2</sub>-lipid A with aminoarabinose cannot fit into the active site of YeLpxR due to D31, hence leading to the inability of YeLpxR to deacylate Kdo<sub>2</sub>-lipid A with aminoarabinose.

#### *lpxR* site-directed mutagenesis

To confirm our predictions, we constructed LpxR mutants by site-directed mutagenesis (see Material and Methods). In addition to the amino acids corresponding to the active site amino acids in StLpxR, we wanted to study the effect of the D31G mutation for YeLpxR as the modelling and docking studies suggested that D31 has an important role in the YeLpxR specificity for the Kdo<sub>2</sub>-lipid A species. The constructs were introduced into *E. coli* MG1655 and the lipid A from the transformants grown at 37°C was



**Figure 2. Temperature regulates the expression of *Y. enterocolitica* *lpxR*.** (A) Analysis of the expression of *lpxR* by measuring luciferase activity of YeO8 carrying *lpxR::lucFF* transcriptional fusion, which was grown at 21°C (white bars) or 37°C (black bars). Data are presented as mean ± SD (n = 3). \*, results are significantly different (p < 0.05; two-tailed t test) from the results for bacteria grown at 21°C. (B) Analysis of *lpxR* mRNA levels by RT-qPCR. Total RNA was extracted from bacteria grown at 21°C (white bar) or 37°C (black bar). Data are presented as mean ± SD (n = 3). \*, results are significantly different (p < 0.05; two-tailed t test) from the results for bacteria grown at 21°C. (C) Western blot analysis of LpxR FLAG tagged levels. Cell envelopes were purified from YeO8-Δ*lpxR*Km mutant carrying pTM100 or pTMLpxRFLAG plasmids. 80 μg of proteins were run in SDS-12% polyacrylamide gel, electrotransferred onto a nitrocellulose membrane, and developed by using anti-Flag antibodies. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g002

analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Most of the constructs containing LpxR mutants did trigger the deacylation of *E. coli* lipid A, detected by the presence of species *m/z* 1360, (Table 2). In contrast, constructs containing LpxR mutants, LpxR(N9A), LpxR(D10A), LpxR(S34A), and LpxR(H122A) did not deacylate *E. coli* lipid A. These results were expected since Rutten and co-workers have reported that these residues are located in the StLpxR active site and all of them are conserved in LpxR homologues [21]. Next, only those constructs triggering deacylation of *E. coli* lipid A were introduced into YeO8. When the YeO8 strains were grown at 37°C, all LpxR mutants restored the presence of the tetra-acyl species (*m/z* 1388) in the lipid A of YeO8-Δ*lpxR*Km (Table 2). Additionally, the mass spectrometry analysis revealed that LpxR(D31G) mutant did trigger the deacylation of lipid A in bacteria grown at 21°C as it was detected the presence of lipid A species *m/z* 1414 and *m/z* 1545 (Figure 7B). The latter is consistent with the deacylation of the lipid A species modified with aminoarabinose (*m/z* 1954).

In summary, our results further confirmed the amino acids important for the catalytic activity of YeLpxR. Moreover, our results confirmed the molecular modelling predictions, thereby demonstrating that the presence of D31 in the active site pocket of YeLpxR causes steric hindrance for the binding and deacylation of lipid A species modified with aminoarabinose.

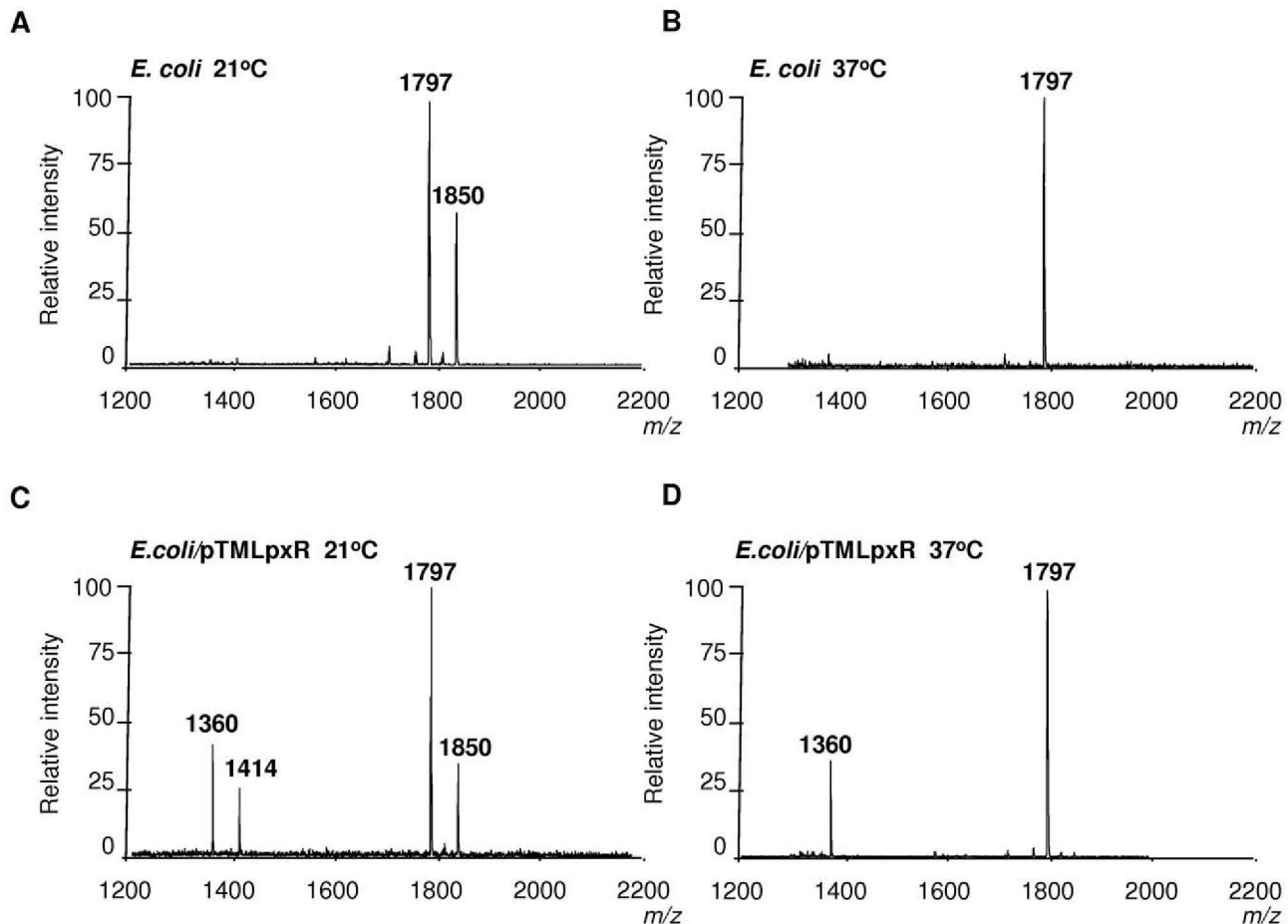
### Regulation of *lpxR* expression

In YeO8 the expression of the loci responsible for the lipid A modification with aminoarabinose, *ugd* and *pmrF* operon, is temperature regulated, being higher at 21°C than at 37°C [15]. Mechanistically, this is so because the expression of the positive regulators *phoPQ* and *pmrAB*, which control the expression of *ugd* and the *pmrF* operon, is also higher at 21°C than at 37°C [15]. In

turn, the temperature-dependent regulation of *phoPQ* and *pmrAB* is explained by H-NS-dependent negative regulation alleviated by RovA, another major regulator of *Yersinia* [22,23], at 21°C [15]. Moreover, there is cross-talk between the regulators in such way that PhoPQ and PmrAB regulate positively the expression of *rovA* and the effect of PhoPQ is more important [15].

The inverse correlation between the substitution of the lipid A with aminoarabinose and lipid A deacylation, prompted us to evaluate whether *phoPQ* and *pmrAB* might negatively regulate *lpxR*. Results shown in figure 8 revealed that the expression of *lpxR::lucFF* was significantly up-regulated in the *phoPQ* and *pmrAB* mutants at 21°C and 37°C (Figure 8A). However, the expression of *lpxR* reached wild-type levels in the double *phoPQ-pmrAB* mutant regardless the bacteria growth temperature (Figure 8A). RT-qPCR experiments showed that the levels of *lpxR* mRNA were higher in the *phoPQ* and *pmrAB* mutants than in the wild type and double *phoPQ-pmrAB* mutants, which were not significantly different (Figure S2).

Recently, we have shown that *rovA* expression is downregulated in the *phoPQ* and *pmrAB* single mutants, being the lowest in the *phoPQ* mutant, whereas in the *phoPQ-pmrAB* double mutant *rovA* expression is not significantly different to that in the wild type [15]. Therefore, the fact that *lpxR* expression follows the opposite trend in these mutants led us to analyze whether *rovA* negatively regulates the expression of *lpxR*. Indeed, luciferase activity was higher in the *rovA* mutant than in the wild type and the levels were not significantly different that those observed in the *phoPQ* mutant when bacteria were grown either at 21°C or 37°C (Figure 8A). Similar results were obtained when the *lpxR* mRNA levels were analyzed by RT-qPCR (Figure S2). The increased *lpxR* expression observed in *rovA* and *phoPQ* single mutants at 21°C was no longer found in the double mutant *rovA-phoPQ* (Figure 8A and Figure S2).



**Figure 3. Lipid A analysis from *E. coli* expressing *Y. enterocolitica* *lpxR*.** Negative ion MALDI-TOF mass spectrometry spectra of lipid A isolated from: (A) *E. coli* MG1655 (*E. coli*) grown at 21°C. (B) *E. coli* MG1655 (*E. coli*) grown at 37°C. (C) *E. coli* MG1655 (*E. coli*) carrying pTMLpxR grown at 21°C. (D) *E. coli* MG1655 (*E. coli*) carrying pTMLpxR grown at 37°C. The results in all panels are representative of three independent lipid A extractions. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g003

When bacteria were grown at 37°C, *lpxR* expression in the *rovA-phoPQ* mutant was significantly lower than those observed in the *rovA* and *phoPQ* single mutants ( $p < 0.05$  for each comparison versus *rovA-phoPQ* mutant) although still higher than that in the wild type (Figure 8A and Figure S2). Of note, the expression of *lpxR* was no longer temperature regulated in the *rovA-phoPQ* mutant (Figure 8B). The fact that the expression of *lpxR::lucFF* in the triple mutant *rovA-phoPQ-pmrAB* at 21°C was less than in the wild-type strain may support the notion that, in the absence of the negative regulator RovA, PmrAB and/or a PmrAB-modulated regulator positively regulates *lpxR*. At 37°C, *lpxR* expression in the triple mutant was not significantly different than those found in the double mutant *phoPQ-pmrAB* and the wild type (Figure 8A and Figure S2).

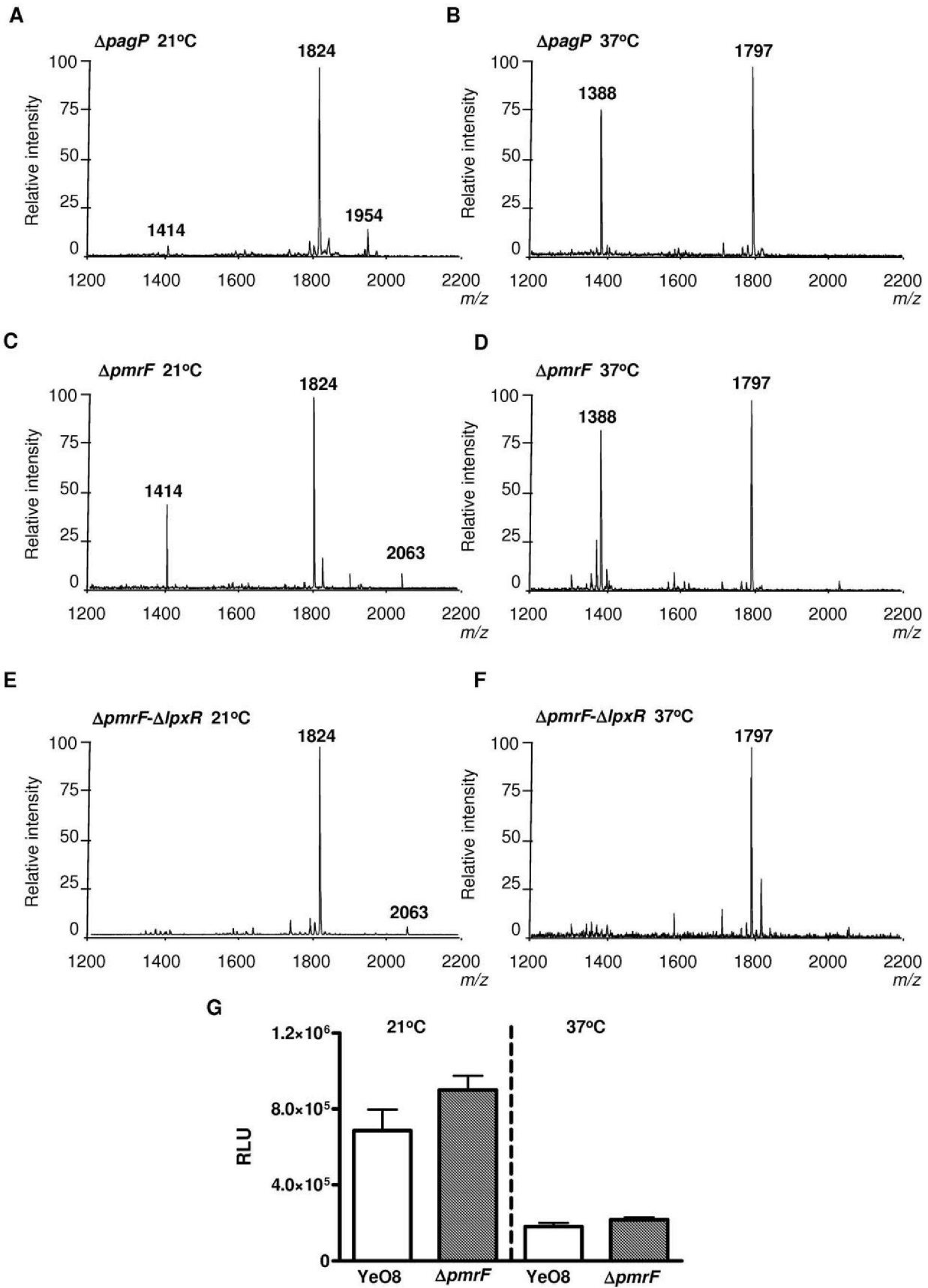
Collectively, our data revealed that the expression of *lpxR* is negatively controlled by the same regulators that activate the loci necessary for the substitution of the phosphate at the 4' end of the glucosamine disaccharide with aminoarabinose.

### Flagellar regulon and lipid A acylation

In a previous study, we observed the down regulation of YeO8 virulence factors in mutants lacking the lipid A late acyltransferases LpxM, LpxL or LpxP [14]. These results raised the possibility that lipid A acylation may act as a regulatory signal by acting on a transduction pathway(s) [14]. In this context, we

sought to determine the impact of LpxR to the expression/function of YeO8 virulence factors.

Virulence genes can be regulated as part of the flagellar regulon, indicating that this regulon contributes to *Y. enterocolitica* pathogenesis [24]. YeO8 is motile when grown at 21°C but not at 37°C [25] and previously we showed that LpxM and LpxP mutants are less motile than the wild type [14]. We examined the influence of LpxR on the flagellar regulon. We quantified the migration of the wild type and YeO8- $\Delta$ *lpxRKm* in motility medium (1% tryptone-0.3% agar plates). Figure 9 shows that YeO8- $\Delta$ *lpxRKm* was less motile than the wild type. *Yersinia* motility is related to the levels of flagellins which, in turn, are regulated by the expression of *flhDC*, the flagellum master regulatory operon [25,26]. We hypothesized that the expression of *flhDC* could be lower in the *lpxR* mutant than in the wild type. To address this, the *flhDC::lucFF* transcriptional fusion [26] was introduced into the chromosome of the strains and the luciferase activity was determined. At 21°C, luminescence was lower in the *lpxR* mutant than in the wild type (Figure 9B). Complementation of the *lpxR* mutant with pTMYeLpxR restored *flhDC::lucFF* expression to wild-type levels (Figure 9B). Notably, the catalytic inactive LpxR mutants LpxR(N9A) and LpxR(S34A), encoded by pTMLpxR(N9A) and pTMLpxR(S34A) respectively, also complemented the *lpxR* mutant (Figure 9B). Western blot analysis of purified membranes from YeO8- $\Delta$ *lpxRKm* containing pTMLpxR(N9A)FLAG or pTMLpxR(S34A)FLAG showed that



**Figure 4. Lipid A analysis from *Y. enterocolitica* lipid A mutants.** Negative ion MALDI-TOF mass spectrometry spectra of lipid A isolated from the indicated *Y. enterocolitica* strains grown at 21°C (A,C,E) and 37°C (B,D,F). The results in all panels are representative of three independent lipid A extractions. (G) Analysis of the expression of *lpxR* by measuring luciferase activity of YeO8 (white bars) and YeO8- $\Delta$ *lpxR* (gray bars) carrying *lpxR::lucFF* transcriptional fusion, which were grown at 21°C or 37°C. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n=3). doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g004

the mutant proteins were expressed (Figure S3). When the strains were grown at 37°C, YeO8 and YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km produced the same luminescence (Figure 9B).

One virulence gene that is regulated as part of the flagellar regulon is *yplA* and hence its expression is regulated by *flhDC* [24,27,28]. Considering that *flhDC* expression was downregulated in the *lpxR* mutant, we speculated that *yplA* expression could be affected in this mutant. The transcriptional fusion *yplA::lacZ*YA [29] was introduced into the chromosome of the wild type and the *lpxR* mutant and their  $\beta$ -galactosidase activities were measured. Indeed, the  $\beta$ -galactosidase activity was lower in YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km than in the wild type (Figure 9C). Plasmids pTMYeLpxR, pTMLpxR(N9A) and pTMLpxR(S34A) complemented the phenotype (Figure 9C).

In summary, these results indicate that the flagellar regulon is downregulated in the *lpxR* mutant with a concomitant decrease in motility and downregulation of *yplA* expression.

### Invasin and lipid A acylation

Inv is an outer membrane protein of *Y. enterocolitica* responsible for invasion of the host [30,31]. Since YeO8 lipid A mutations affect *inv* expression [14], we asked whether *inv* expression is altered in the *lpxR* mutant. An *inv::phoA* translational fusion [32] was introduced into the genome of YeO8 and YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km and *inv* expression was monitored as alkaline phosphatase (AP) activity (Figure 10A). AP activity was significantly lower in the *lpxR* mutant than in the wild type. Plasmids pTMYeLpxR, pTMLpxR(N9A) and pTMLpxR(S34A) restored AP activity to wild-type levels. These differences in *inv* expression prompted us to

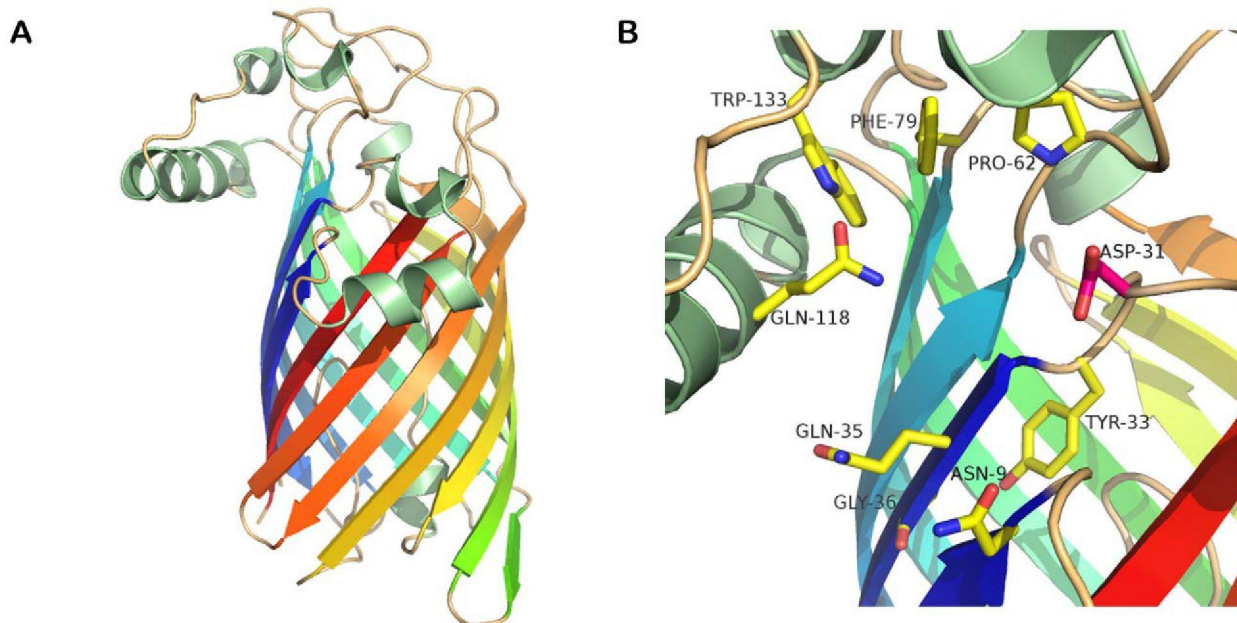
study the ability of YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km to invade HeLa cells by using a gentamicin protection assay. The amount of intracellular bacteria was 55% lower when cells were infected with the *lpxR* mutant than with the wild type (Figure 10B).

RovA is required for *inv* expression in *Y. enterocolitica* [33]. Therefore, among other possibilities, the low *inv* expression found in the *lpxR* mutant could be caused by downregulation of *rovA* expression. To address this, the *rovA::lucFF* transcriptional fusion [14] was introduced into the genome of the wild type and the *lpxR* mutant and the luminescence was determined. Results shown in figure 10C demonstrate that *rovA* expression was downregulated in YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km. This phenotype was complemented with plasmids pTMYeLpxR, pTMLpxR(N9A) and pTMLpxR(S34A).

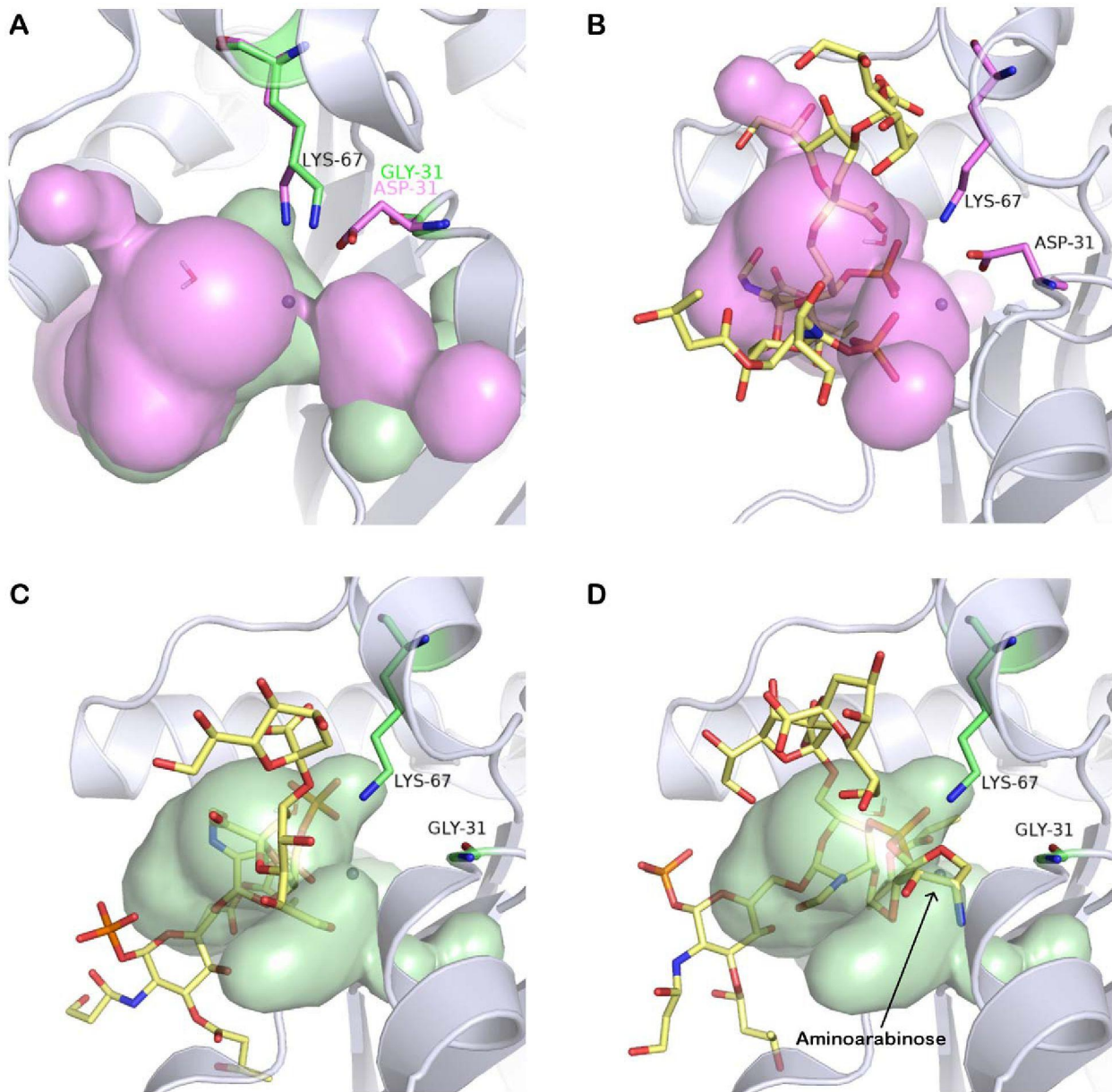
Together, our data show that the down-regulation of *inv* expression found in the *lpxR* mutant is most likely caused by downregulation of *rovA* expression, the positive transcriptional regulator of *inv*.

### Impact of lipid A acylation on pYV-encoded virulence factors

*Y. enterocolitica* harbours a plasmid (pYV)-encoded type III secretion system which is required for virulence. A set of virulence factors, called Yops, are secreted by this system and enable *Y. enterocolitica* to multiply extracellularly in lymphoid tissues [34–36]. In several pathogens, LPS polysaccharide status affects the expression of the type III secretion systems [37–39]. Therefore, we asked whether the production of the *Yersinia* pYV-encoded type III secretion system is altered in the *lpxR* mutant. At 37°C and under low calcium concentrations, this system secretes the Yops to



**Figure 5. Modelling of *Y. enterocolitica* O:8 LpxR.** (A) The model of YeLpxR based on the StLpxR crystal structure. The  $\beta$ -barrel is colored as rainbow, the helices are green and loops are wheat. (B) Close-up view of the active site. The amino acids mutated in this study are shown as sticks in yellow and pink. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g005



**Figure 6. Docking of Kdo<sub>2</sub>-lipid A to LpxR.** (A) The differences in surface cavities between YeLpxR (pink) and StLpxR (green) with K67 as sticks with pink carbon atoms for YeLpxR and green carbon atoms for StLpxR and YeLpxR D31 as sticks with pink carbon atoms. G31 in StLpxR is hidden behind D31 in YeLpxR. (B) The YeLpxR model with Kdo<sub>2</sub>-lipid A (sticks with yellow carbon atoms) in the active site. The surface cavity of YeLpxR is shown in pink and K67 and D31 as sticks with pink carbon atoms. (C) The StLpxR model with Kdo<sub>2</sub>-lipid A (yellow sticks) in the active site. The surface cavity of StLpxR is shown in green along with K67 and G31 (green sticks). (D) The StLpxR model with Kdo<sub>2</sub>-lipid A including aminoarabinose in the active site. The surface cavity of StLpxR is shown in green along with K67 and G31 (green sticks).  
doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g006

the culture supernatant [40]. Analysis of Yop secretion revealed that the wild type and the *lpxR* mutant secreted similar levels of Yops (Figure 11A). We sought to determine whether the translocation of Yops to the cytosol of eukaryotic cells is affected in the *lpxR* mutant. Detection of cytoskeleton disturbances upon infection of epithelial cells is one of the most sensitive assays to establish Yop translocation [41]. The injection of YopE into the cytosol of A549 cells by wild-type bacteria induced disruption and condensation of the actin microfilament structure of the cells whereas this was not the case when cells were infected with YeO8- $\Delta$ yopE mutant (Figure 11B). YopE translocation to A549 cells was not affected in the *lpxR* mutant background (Figure 11C). As

expected, A549 cells infected with YeO8- $\Delta$ lpxR<sub>Km</sub> displayed similar cytoskeleton disturbances than those cells infected with the wild type (Figure 11B).

*yadA* is another pYV-encoded virulence gene whose expression is only induced at 37°C [42]. YadA is an outer membrane protein mediating bacterial adhesion, bacterial binding to proteins of the extracellular matrix and complement resistance (for a review see [43]). Analysis of YadA expression by SDS-PAGE demonstrated that YeO8- $\Delta$ lpxR<sub>Km</sub> and YeO8 produced the same amount of the protein (Figure 11D). To assess YadA functionality, we asked whether the YadA-dependent binding to collagen is altered in the *lpxR* mutant. To this end, we analyzed the binding of YadA-



**Table 2.** Effect of *lpxR* mutations on lipid A deacylation.

Mutations	Lipid A deacylation	
	<i>E. coli</i> (37°C) m/z 1360	<i>Y. enterocolitica</i> (21°C) m/z 1414
N9A	No	No
D10A	No	n.a.
S34A	No	n.a.
H122A	No	n.a.
Q118A	No	No
Q57A	Yes	No
Y130A	Yes	No
G36A	Yes	No
F79A	Yes	No
P62A	Yes	No
W133A	Yes	No
D31G	Yes	Yes

n.a.; Not analyzed.

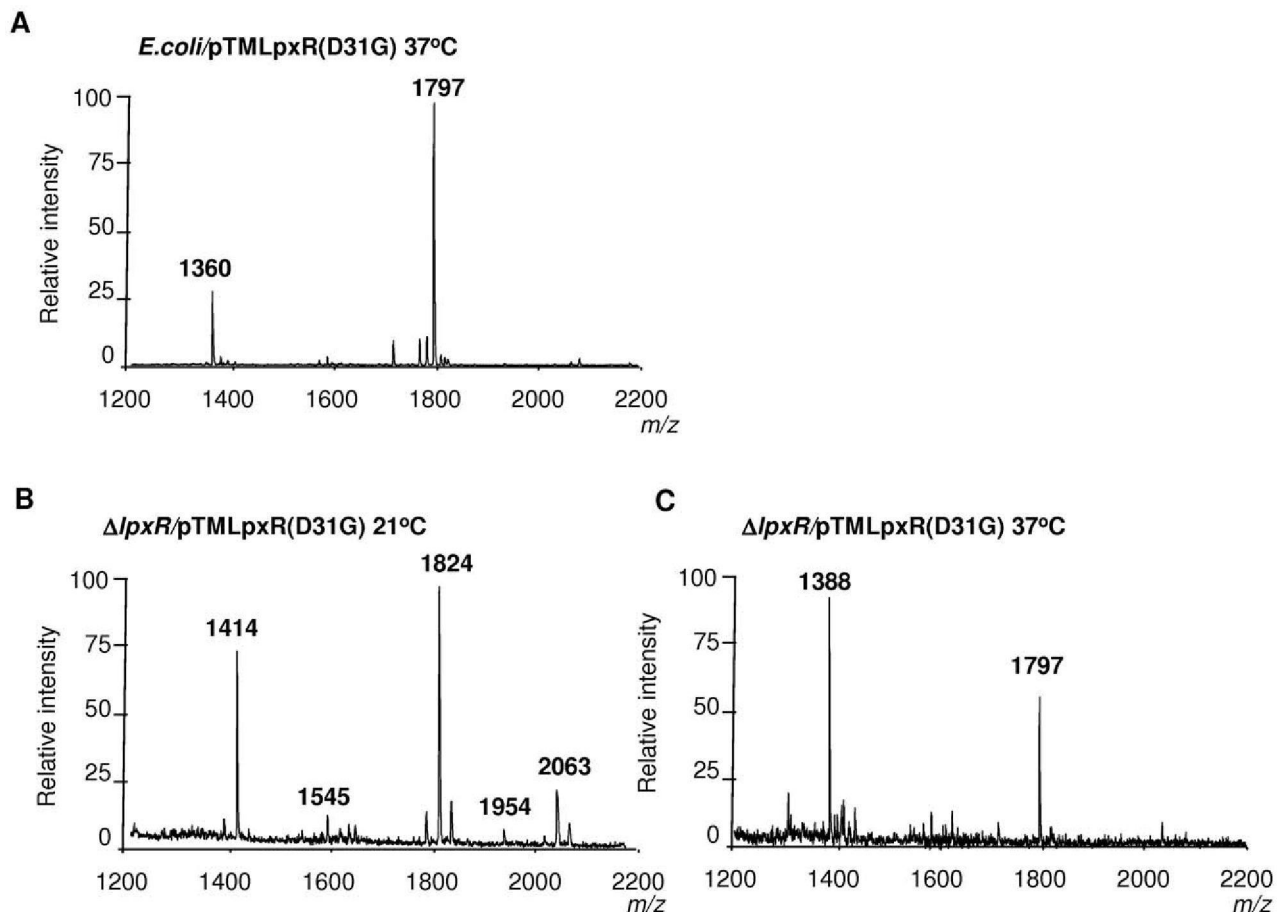
doi:10.1371/journal.ppat.1002978.t002

expressing whole bacteria to collagen type I by immunofluorescence (see Material and Methods). In contrast to the negative control, a pYV-cured strain (YeO8c), YeO8 and YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km bound to collagen without differences between them (Figure 11E–F).

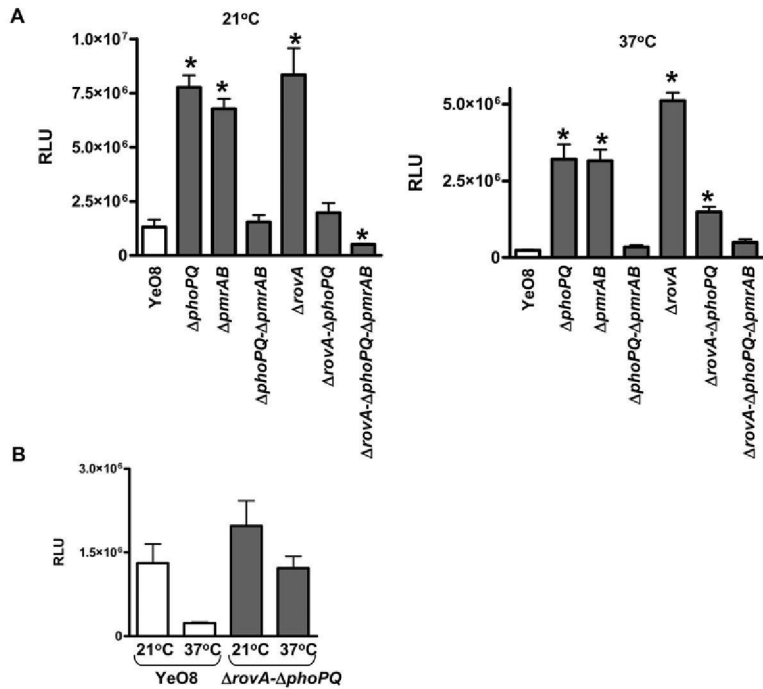
Taken together, these results suggest that the production and function of the pYV-encoded virulence factors Yops and YadA are not altered in the *lpxR* mutant.

### Lipid A acylation and innate immunity

Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) belong to the arsenal of weapons of the innate immune system against infections. In the case of Gram-negative bacteria, CAMPs interact with the lipid A moiety of the LPS [44–47] and lipid A modification is one of the strategies employed by Gram-negative bacteria to counteract the action of CAMPs. We and others have used polymyxin B as a model CAMP since it also binds to lipid A. Furthermore, resistance to this peptide reflects well the resistance to other mammalian peptides and correlates with virulence [48–51]. Therefore we evaluated the resistance of the *lpxR* mutant to polymyxin B. Results shown in figure 12A demonstrate that the mutant was as resistant as the wild type to the peptide when grown either at 21°C or at 37°C. Of note both strains were more susceptible to polymyxin B when grown at 37°C than at 21°C (Figure 12A).

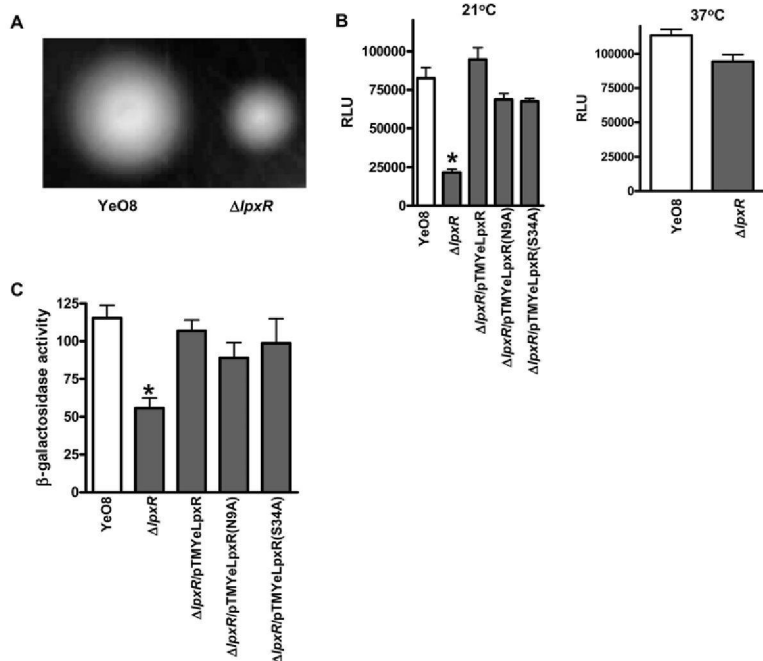


**Figure 7. Presence of D31 in the active site pocket of *Y. enterocolitica* O:8 LpxR affects the deacylation activity of the enzyme.** Negative ion MALDI-TOF mass spectrometry spectra of lipid A isolated from: (A) *E. coli* MG1655 (*E. coli*) carrying pTMLpxR(D31G) grown at 37°C. (B) YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km ( $\Delta$ *lpxR*) carrying pTMLpxR(D31G) grown at 21°C. (C) YeO8- $\Delta$ *lpxR*Km ( $\Delta$ *lpxR*) carrying pTMLpxR(D31G) grown at 37°C. The results in all panels are representative of three independent lipid A extractions. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g007



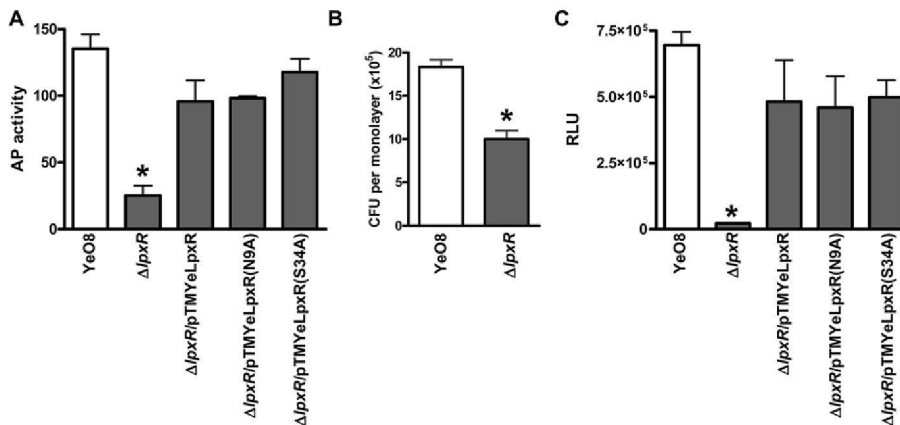
**Figure 8. *Y. enterocolitica* PhoPQ, PmrAB two-component systems and RovA control the expression of *lpxR*.** (A) Analysis of the expression of *lpxR* by YeO8 (white bar), and mutants (grays bars) YeO8- $\Delta$ phoPQ ( $\Delta$ phoPQ), YeO8- $\Delta$ pmrAB ( $\Delta$ pmrAB) and YeO8- $\Delta$ phoPQ- $\Delta$ pmrAB ( $\Delta$ phoPQ-*pmrAB*), Yvm927 ( $\Delta$ rovAYvm927- $\Delta$ phoPQ- $\Delta$ pmrAB ( $\Delta$ rovA $\Delta$ phoPQ- $\Delta$ pmrAB)) carrying the transcriptional fusion *lpxR::lucFF* grown at 21°C or 37°C. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). \*, results are significantly different (p < 0.05; two-tailed *t* test) from the results for YeO8 grown at the same temperature. (B) This panel displays the same results shown in panel A for YeO8 and the double mutant Yvm927- $\Delta$ phoPQ ( $\Delta$ rovA- $\Delta$ phoPQ) and it is included for the sake of clarity.

doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g008



**Figure 9. Flagellar regulon is downregulated in the *Y. enterocolitica* O:8 *lpxR* mutant.** (A) Motility assays were performed with YeO8, and YeO8- $\Delta$ lpxR ( $\Delta$ lpxR) in a semisolid agar plate (3% agar and 1% tryptone). Plates were incubated at 22°C for 24 h. (B) Analysis of *flhDC* expression by YeO8, YeO8- $\Delta$ lpxR ( $\Delta$ lpxR), and YeO8- $\Delta$ lpxR with the plasmids pTMYeLpxR ( $\Delta$ lpxR/pTMYeLpxR); pTMYeLpxR(N9A) ( $\Delta$ lpxR/pTMYeLpxR(N9A)), and pTMYeLpxR(S34A) ( $\Delta$ lpxR/pTMYeLpxR(S34A)) carrying the transcriptional fusion *flhDC::lucFF* grown at 21°C and 37°C. (C)  $\beta$ -galactosidase activity production by *yplA::lacZYA* present in YeO8, YeO8- $\Delta$ lpxR ( $\Delta$ lpxR), and YeO8- $\Delta$ lpxR with the plasmids pTMYeLpxR ( $\Delta$ lpxR/pTMYeLpxR); pTMYeLpxR(N9A) ( $\Delta$ lpxR/pTMYeLpxR(N9A)), and pTMYeLpxR(S34A) ( $\Delta$ lpxR/pTMYeLpxR(S34A)) [ $\beta$ -galactosidase values given in Miller units, mean  $\pm$  SD (n = 3)]. \*, results are significantly different (p < 0.05; two-tailed *t* test) from the results for YeO8.

doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g009



**Figure 10. *Inv* expression is altered in *Y. enterocolitica* O:8 *lpxR* mutant.** (A) Alkaline phosphatase (AP) activities exhibited by *inv::phoA* translational fusion present in YeO8, YeO8-Δ*lpxR*Km (Δ*lpxR*), and YeO8-Δ*lpxR* with the plasmids pTMYeLpxR (Δ*lpxR*/pTMYeLpxR); pTMYeLpxR(N9A) (Δ*lpxR*/pTMYeLpxR(N9A)), and pTMYeLpxR(S34A) (Δ*lpxR*/pTMYeLpxR(S34A)) [AP is expressed in enzyme units per OD<sub>600</sub> unit; mean ± SD (n = 3)]. (B) Invasion of HeLa cells by YeO8, and YeO8-Δ*lpxR*Km (Δ*lpxR*), and YeO8-Δ*lpxR* with the plasmids pTMYeLpxR (Δ*lpxR*/pTMYeLpxR); pTMYeLpxR(N9A) (Δ*lpxR*/pTMYeLpxR(N9A)), and pTMYeLpxR(S34A) (Δ*lpxR*/pTMYeLpxR(S34A)) carrying the transcriptional fusion *rovA::lucFF*. \*, results are significantly different (p < 0.05; one-tailed *t* test) from the results for YeO8. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g010

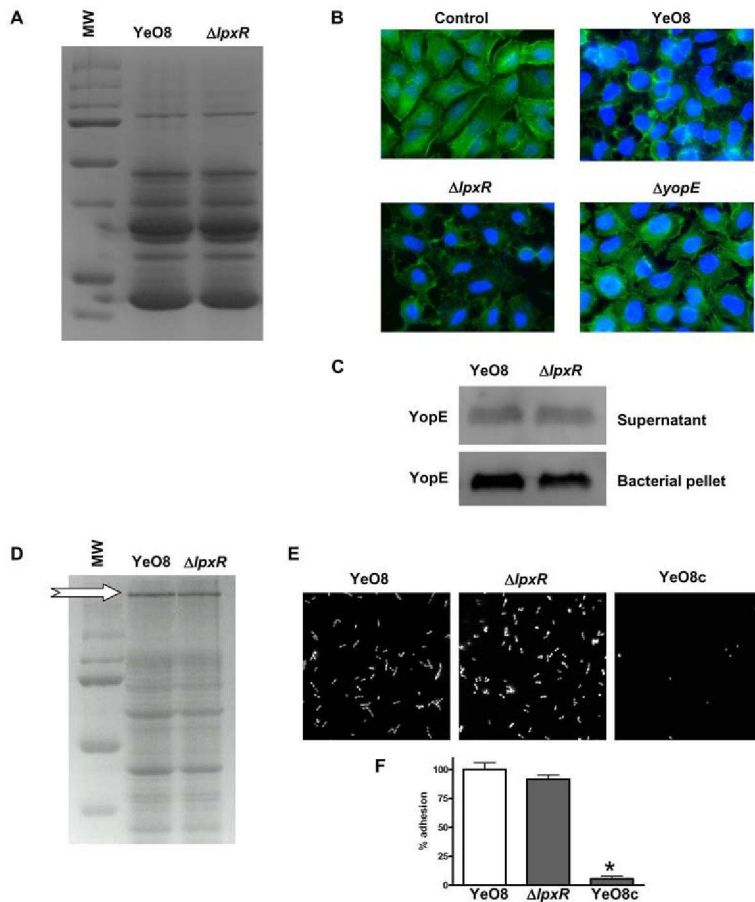
The mammalian immune system recognizes and responds to *E. coli* LPS via the TLR4 complex, resulting in the synthesis and secretion of pro-inflammatory cytokines that recruit immune cells to the site of infection. The ability of LPSs to evoke inflammatory responses and the potency of them are directly related to the structure of the molecule. It has been reported that underacylated LPSs are less inflammatory than hexa-acylated ones, being the *E. coli* lipid A (*m/z* 1797) the prototype of hexa-acylated LPSs [52]. Therefore, the dramatic changes in lipid A acylation displayed by the *lpxR* mutant at 37°C led us to evaluate the immunostimulatory properties of YeO8 and YeO8-Δ*lpxR*Km. As cellular read-out, we determined TNFα levels secreted by macrophages infected either with the wild type or the *lpxR* mutant grown at 21°C and 37°C. YeO8 and YeO8-Δ*lpxR* induced similar levels of TNFα although the levels induced by bacteria grown at 37°C were significantly lower than those triggered by bacteria grown at 21°C (p < 0.05 for comparison of TNFα levels between temperatures for a given strain) (Figure 12B). This was dependent on the well known anti-inflammatory action of the pYV-encoded YopP [53,54], since a *yopP* mutant grown at 37°C induced similar levels of TNFα than those induced by wild-type bacteria grown at 21°C (Figure 12B). Therefore we sought to determine whether YopP could be counteracting the inflammatory response induced by YeO8-Δ*lpxR*Km. Indeed, YeO8-Δ*yopP*-Δ*lpxR*Km induced the highest levels of TNFα (Figure 12B). Further sustaining this notion, the TNFα levels induced by the *lpxR* mutant cured of the pYV virulence plasmid grown at 37°C were significantly higher than those induced by the virulence plasmid negative wild-type strain but not different than the YeO8-Δ*yopP*-Δ*lpxR*Km-triggered TNFα levels (Figure 12B). Of note, the TNFα levels induced by the virulence plasmid negative wild-type strain grown at 37°C were significantly lower than those triggered by bacteria grown at 21°C hence further highlighting the importance of lipid A acylation on the immunostimulatory properties of YeO8.

## Discussion

Pathogenic yersiniae show a temperature-dependent variation in lipid A acylation [9–14]. At 21°C, *Y. enterocolitica* synthesizes hexa-acylated lipid A containing four 3-OH-C<sub>14</sub>, one C<sub>12</sub> and

either one C<sub>16:1</sub> or one C<sub>14</sub>. At 37°C, *Y. enterocolitica* lipid A presents a tetra-acylated species (*m/z* 1388) and a hexa-acylated one containing four 3-OH-C<sub>14</sub>, one C<sub>12</sub> and C<sub>14</sub>. In a previous work, we identified and characterized the acyltransferases, *lpxM*, *lpxL* and *lpxP*, responsible for the addition of C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> and C<sub>16:1</sub>, respectively, to lipid A [14]. Moreover, we demonstrated that the expressions of these enzymes are temperature regulated [14]. However, the unique tetra-acyl lipid A found in the wild type grown at 37°C (*m/z* 1388) remained to be explained at the molecular level. We and others have established that this species is consistent with 3'-O-deacylation of lipid A [12,14,17]. In this work by combining biochemistry, genetics and molecular modelling we present evidence that LpxR is the lipid A 3'-O-deacylase of *Y. enterocolitica*.

YeLpxR is one of the closest homologues to StLpxR. Despite the presence of StLpxR in the *Salmonella* outer membrane, the bacterium does not produce 3'-O-deacylated lipid A species under any growth conditions tested to date [18]. This has been termed as enzyme latency and similar findings have been reported for the *Salmonella* lipid A 3'-O-deacylase PagL and *E. coli* PagP [55,56]. Our data revealed that YeLpxR is also latent in the membrane of YeO8 grown at 21°C. However, this is not a general feature of lipid A deacylases since *H. pylori* LpxR is constitutively active [19]. Several explanations could underlie YeLpxR latency at 21°C. Firstly, we explored whether low temperature may affect the function of the enzyme. The fact that YeLpxR did deacylate *E. coli* lipid A when grown at 21°C does not support that low temperatures grossly inhibit the enzyme activity. Nevertheless, we do not by any means completely rule out that temperature may affect YeLpxR activity, and thorough biochemical analyses are warranted to rigorously define the functional parameters of YeLpxR activity. This will be the subject of future studies. We next hypothesized that specific features of YeO8 lipid A, which do not exist in the *E. coli* lipid A, may be responsible for YeLpxR latency. The first conspicuous difference is the type of secondary fatty attached to the lipid IV<sub>A</sub>. In *E. coli* the late acyltransferases LpxL and LpxM add laureate (C<sub>12</sub>) and myristate (C<sub>14</sub>) respectively [1] whereas in YeO8 these enzymes transfer myristate (C<sub>14</sub>) and laureate (C<sub>12</sub>) respectively [14]. However, this cannot

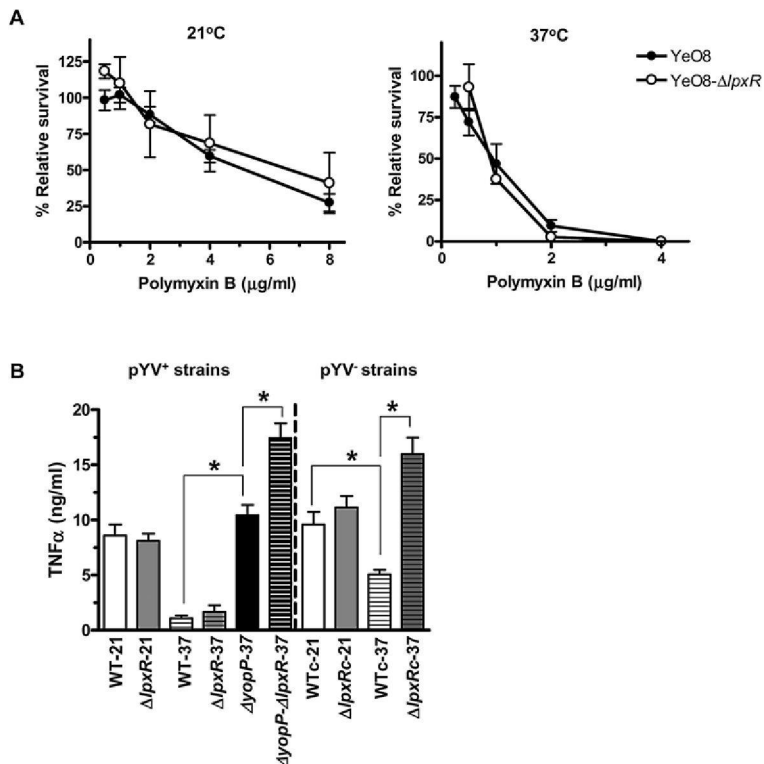


**Figure 11. The productions of Yops and YadaA are not affected in *Y. enterocolitica* O:8 *lpxR* mutant.** (A) SDS-PAGE (the acrylamide concentration was 4% in the stacking gel and 12% in the separation one) and Coomassie brilliant blue staining of proteins from the supernatants of  $\text{Ca}^{2+}$ -deprived cultures from YeO8 and YeO8- $\Delta lpxR$ Km. Result is representative of four independent experiments. (B) Actin disruption by *Yersinia* infection. A549 cells (monolayer of 70% confluence) were infected with YeO8, YeO8- $\Delta lpxR$ Km or YeO8- $\Delta yopE$  (MOI 25:1) for 1 h. After fixing and permeabilization of cells actin was stained with OregonGreen 514-phalloidin (1:100) and cells were analyzed by fluorescence microscopy. Result is representative of four independent experiments. (C) Translocation of YopE into A549 cells by YeO8, or YeO8- $\Delta lpxR$ Km ( $\Delta lpxR$ ) (MOI 25:1 and 1 h of infection). After digitonin extraction, aliquots corresponding to approximately  $6 \times 10^4$  infected A549 cells were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting using rabbit polyclonal antiserum raised against YopE (1:2000 dilution). Result is representative of four independent experiments. (D) SDS-PAGE (the acrylamide concentration was 4% in the stacking gel and 10% in the separation one) followed by Coomassie brilliant blue staining of cell extracts from strains grown in RPMI 1640 at 37°C. White arrow marks YadaA protein. Result is representative of four independent experiments. (E) *Y. enterocolitica* strains were allowed to adhere to collagen-coated coverslips. Weakly-bound bacteria were washed off and adherent bacteria stained with Hoechst 33342. YeO8c, pYV-cured derivative of YeO8 (Table 1). (F) Adhering bacteria to collagen-coated coverslips were counted. Wild-type bacteria (YeO8) adherence was set to 100%. Bars represent mean  $\pm$  SD ( $n=4$ ). \*, results are significantly different ( $p<0.05$ ; two-tailed  $t$  test) from the results for YeO8. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g011

account for the reduced LpxR activity since the enzyme did deacylate *E. coli* lipid A. The presence of palmitoleate in YeO8 lipid A at 21°C but not at 37°C cannot be the reason since YeLpxR deacylated *E. coli* lipid A containing palmitoleate, found in *E. coli* grown at 21°C. Instead, our results revealed that the lipid A substitution with aminoarabinose is associated with YeLpxR latency since LpxR-dependent lipid A deacylation was clearly observed in the *pmrF* mutant grown at 21°C. Notably, the lack of aminoarabinose also releases *Salmonella* PagL from latency [56], hence suggesting a key role for the lipid A modification with aminoarabinose in LPS remodelling.

The molecular modelling and docking experiments further highlighted the importance of lipid A substitution with aminoarabinose for YeLpxR function. D31 in YeLpxR forces the conserved K67 to adopt a different conformation compared to StLpxR. According to the docking results, the resulting loss of

cavity space in the vicinity of K67 in YeLpxR, causes the phosphate at the 4' end of Kdo<sub>2</sub>-lipidA to bind somewhat differently to YeLpxR than to StLpxR. In the latter, the phosphate binds in the cavity near K67, while in YeLpxR it is forced to bind more outwards from the enzyme. The docking of Kdo<sub>2</sub>-lipidA with aminoarabinose to StLpxR showed that aminoarabinose occupies the cavity space, which corresponds to a narrow connection between two larger cavities in YeLpxR. The large reduction in cavity volume at this particular site causes this space to be too small for the accommodation of aminoarabinose. Hence, D31 seems to cause steric hindrance for the binding of aminoarabinose-containing Kdo<sub>2</sub>-lipidA to YeLpxR. Therefore, we predicted that D31 could have an important role for the YeLpxR substrate specificity. Indeed, the site-directed mutagenesis experiments validated that the presence of D31 in the active site pocket of YeLpxR causes a steric hindrance for the binding and



**Figure 12. Impact of *lpxR* on *Y. enterocolitica* O:8 interplay with the innate immune system.** (A) YeO8 (black circle) or YeO8-Δ*lpxR*Km (white circle) grown at 21°C or 37°C were exposed to different concentrations of polymyxin B. Each point represents the mean and standard deviation of eight samples from four independently grown batches of bacteria. (B) TNF $\alpha$  secretion by infected macrophages with YeO8 (WT), YeO8-Δ*lpxR*Km (Δ*lpxR*), YeO8-Δ*yopP* (Δ*yopP*), YeO8-Δ*yopP*-Δ*lpxR*Km (Δ*yopP*-Δ*lpxR*). "c" denotes bacteria without the virulence plasmid. Strains were grown at 21°C (denoted as 21) and 37°C (denoted as 37). The data are means and s.e.m. \*,  $p < 0.05$  (for the indicated comparisons). doi:10.1371/journal.ppat.1002978.g012

deacylation of lipid A species modified with aminoarabinose. Nevertheless, at present we do not rule out that other residues of YeLpxR also contribute to its latency. In this regard, *Salmonella* PagL is released from latency when specific amino acid residues located at extracellular loops of the enzyme are mutated and it has been postulated that these residues are involved in the recognition of aminoarabinose-modified lipid A [56–58]. Studies are going to explore whether residues located at extracellular loops of LpxR also contribute to enzyme latency.

The inverse correlation between the aminoarabinose content in the LPS and the LpxR-dependent lipid A deacylation prompted us to evaluate whether the same regulatory network governing the expression of the *pmrF* operon and *ugd* could regulate *lpxR*. Recently, we have shown that the global regulators RovA, PhoPQ, and PmrAB positively control the expression of the loci necessary for aminoarabinose biosynthesis at 21°C [15]. Furthermore, there is a cross-talk between these regulators since the expressions of *phoPQ* and *pmrAB* are downregulated in the *rovA* mutant whereas *rovA* expression is downregulated in *phoPQ* and *pmrAB* single mutants [15]. Our findings support the notion that RovA and PhoPQ are negative regulators of *lpxR* since its expression was higher in *phoPQ* and *rovA* single mutant backgrounds than in the wild type. In turn, the two-component system PmrAB and/or a PmrAB-regulated system may act as a positive regulator because *lpxR* expression was similar in the wild-type and *rovA-phoPQ* backgrounds.

One striking finding of our study is that motility and invasion of eukaryotic cells were reduced in the *lpxR* mutant grown at 21°C. Mechanistically, our data revealed that the expressions of *flhDC* and

*rovA*, the key regulators controlling the flagellar regulon and invasin respectively [22,25,33], were down-regulated in the *lpxR* mutant. Although we have reported that lipid A acylation status affects motility and invasion [14], the phenotypes were found in mutants lacking the late-acyltransferases and hence displaying major changes in the lipid A structure at 21°C [14]. This is in contrast to the *lpxR* mutant grown at 21°C, where the LpxR-dependent deacylation was hardly observed. The fact that YeLpxR is in latent stage at this growth temperature may suggest that, in the *lpxR* mutant background, the absence of the enzyme in the outer membrane, not the lipid A deacylation, acts as the regulatory signal underlying the reduced expressions of *flhDC* and *rovA*. Given experimental support to this hypothesis, the catalytically inactive mutants LpxR(N9A) and LpxR(S34A) restored the expressions of *flhDC*, *ylpA*, *inv* and *rovA* to wild-type levels. These results are in good agreement with the notion that membrane-intrinsic  $\beta$ -barrel proteins, such as LpxR, may launch transmembrane signal transduction pathways upon sensing outer membrane perturbations [59], in our case, the absence of the protein itself. Therefore, it can be speculated that those systems sensing extracytoplasmic stresses could underlie the regulatory connection between the absence of LpxR and the expression of *Y. enterocolitica* virulence factors. Giving indirect support to our speculation, it has been reported that lipid A deacylation induces  $\sigma^E$ -dependent responses in *E. coli* [60], the Cpx system senses changes in LPS O-polysaccharide [61]. Experiments are underway to test whether the activation status of the Cpx and/or  $\sigma^E$  systems is altered in the *lpxR* mutant background and whether any of these systems is responsible for the reduced expression of *flhDC* and *rovA* found in the mutant.

The LPS contains a molecular pattern recognized by the innate immune system thereby arousing several host defence responses. On one hand, CAMPs target this LPS pattern to bind to the bacterial surface, which is necessary for their microbicidal action. On the other hand, recognition of the LPS by the LPS receptor complex triggers the activation of host defence responses, chiefly the production of inflammatory markers. Not surprisingly, the modification of the LPS pattern is a virulence strategy of several pathogens to evade the innate immune system, and *Y. enterocolitica* is not an exception. Recently, we have demonstrated that the temperature-dependent lipid A modifications with aminoarabinose and palmitate help *Y. enterocolitica* to avoid the bactericidal action of CAMPs [15]. In this context, it was not totally unexpected to find out that the *lpxR* mutant was as susceptible as the wild type to polymyxin B, a model CAMP, since the mass spectrometry analysis indicated that the aforementioned lipid A modifications were not affected in the *lpxR* mutant background. Concerning the activation of inflammatory responses, several studies highlight the critical role of pYV-encoded Yops, chiefly YopP, to prevent the activation of inflammatory responses in a variety of cells, including macrophages. Nevertheless, Rebeil and co-workers [12] conclusively demonstrated that purified LPS from *Y. enterocolitica* grown at 37°C is less inflammatory than that purified from bacteria grown at 21°C. This is in agreement with the concept that underacylated LPSs are less inflammatory than hexacylated ones [52]. Therefore, it was plausible to speculate that the LpxR-dependent deacylation of LPS at 37°C was responsible for the reduced stimulatory potential of the LPS described by Rebeil and co-workers. To confirm this speculation we chose to challenge macrophages with alive bacteria instead of using purified LPS since there might be differences between the cellular recognition of purified LPS and the LPS expressed in the complex lipid environment of the bacterial outer membrane. To our initial surprise, we observed that the *lpxR* mutant elicited similar inflammatory response than the wild type when both strains were grown at 37°C. The fact that these responses were significantly lower than those elicited by bacteria grown at 21°C suggested that pYV-encoded factors were attenuating the inflammatory response. Therefore, we hypothesized that the arsenal of Yops injected to the cell were efficiently counteracting the activation of inflammatory responses evoked by the *lpxR* mutant LPS. In fact, our data demonstrated that the production and function of the pYV-encoded virulence factors were not affected in the *lpxR* mutant. Giving support to our hypothesis, the inflammatory response elicited by the *lpxR* mutant cured of the pYV virulence plasmid grown at 37°C was significantly higher than that induced by the virulence plasmid negative wild-type strain. Moreover, our findings suggest that, among all Yops, YopP plays a major role in counteracting the inflammation elicited by the *lpxR* mutant since the TNF $\alpha$  levels induced by the *lpxR* mutant cured of the pYV virulence plasmid grown at 37°C were not different than those triggered by YeO8- $\Delta$ yopP- $\Delta$ lpxR. On the whole, our results and those reported by Rebeil and co-workers [12] are consistent with a model in which the characteristic low inflammatory response associated to *Y. enterocolitica* infections might be the sum of the anti-inflammatory action exerted by YopP and the reduced activation of the LPS receptor complex due to the expression of a LpxR-dependent deacylated LPS. In this scenario, the latency of LpxR may facilitate a quick bacterial response upon entering the host to reduce the initial recognition of the pathogen by the LPS receptor complex. This will allow the pathogen to activate other host countermeasures, among others the pYV-encoded type III secretion system, which is a time consuming process.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Unless otherwise indicated, *Yersinia* strains were grown in lysogeny broth (LB) medium at either 21°C or 37°C. When appropriate, antibiotics were added to the growth medium at the following concentrations: ampicillin (Amp), 100  $\mu$ g/ml for *Y. enterocolitica* and 50  $\mu$ g/ml for *E. coli*; kanamycin (Km), 100  $\mu$ g/ml in agar plates for *Y. enterocolitica*, 50  $\mu$ g/ml in agar plates for *E. coli*, and 20  $\mu$ g/ml in broth; chloramphenicol (Cm), 20  $\mu$ g/ml; trimethoprim (Tp), 100  $\mu$ g/ml; tetracycline (Tet) 12.5  $\mu$ g/ml; and streptomycin (Str), 100  $\mu$ g/ml.

### *Y. enterocolitica* mutant construction

*In silico* analysis led to the identification of *Y. enterocolitica* 8081 homologue of *lpxR* (YE3039), *yopP* (YEP0083) and *yopE* (YEP0053) [accession number AM286415; [20]]. To obtain the *lpxR*, *yopP*, and *yopE* mutants two sets of primers (Table S1) were used for each gene to amplify two different fragments from each gene, LpxRUP and LpxRDOWN, YopPUP and YopPDOWN, YopEUP and YopEDOWN, respectively. Both fragments were BamHI-digested, purified, ligated, amplified as a single PCR fragment using a mixture of GoTaq Flexi polymerase (2.5 units/reaction; Promega) and *Vent* polymerase (2.5 units/reaction; New England Biolabs), gel purified and cloned into pGEMT-Easy (Promega) to obtain pGEMT $\Delta$ lpxR, pGEMT $\Delta$ yopP, and pGEMT $\Delta$ yopE respectively. A kanamycin resistance cassette flanked by FRT recombination sites was obtained as a BamHI fragment from pGEMTFRTKm and it was cloned into BamHI-digested pGEMT $\Delta$ lpxR and pGEMT $\Delta$ yopP to generate pGEMT $\Delta$ lpxRKm and pGEMT $\Delta$ yopPKm respectively.  $\Delta$ lpxR::Km, and  $\Delta$ yopP::Km alleles were amplified using *Vent* polymerase (New England Biolabs) and cloned into SmaI-digested pKNG101 to obtain pKNG $\Delta$ lpxRKm and pKNG $\Delta$ yopPKm, respectively.  $\Delta$ yopE allele was obtained by PvuII-digestion of pGEMT $\Delta$ yopE, gel purified and cloned into SmaI-digested pKNG101 to obtain pKNG $\Delta$ yopE. pKNG101 is a suicide vector that carries the defective *pir*-negative origin of replication of R6K, the RK2 origin of transfer, and an Str resistance marker [62]. It also carries the *sacBR* genes that mediate sucrose sensitivity as a positive selection marker for the excision of the vector after double crossover [62]. Plasmids were introduced into *E. coli* CC118- $\lambda$ pir from which they were mobilized into *Y. enterocolitica* 8081 by triparental conjugation using the helper strain *E. coli* HB101/pRK2013. Bacteria were diluted and aliquots spread on *Yersinia* selective agar medium plates (Oxoid) supplemented with Str. Bacteria from 5 individual colonies were pooled and allowed to grow in LB without any antibiotic overnight at RT. Bacterial cultures were serially diluted and aliquots spread in LB without NaCl containing 10% sucrose and plates were incubated at RT. The recombinants that survived 10% sucrose were checked for their antibiotic resistance. The appropriate replacement of the wild-type alleles by the mutant ones was confirmed by PCR and Southern blot (data not shown). In the case of YeO8- $\Delta$ lpxRKm and YeO8- $\Delta$ yopPKm mutants, the kanamycin cassette was excised by FLP-mediated recombination [63] using plasmid pFLP2Tp. This plasmid is a derivative from pFLP2 constructed by cloning a trimethoprim resistance cassette, obtained by SmaI digestion of p34S-Tp [64], into ScaI-digested pFLP2. The generated mutants were named YeO8- $\Delta$ lpxR and YeO8- $\Delta$ yopP, respectively. YeO8- $\Delta$ yopP- $\Delta$ lpxRKm and YeO8- $\Delta$ pmrF- $\Delta$ lpxRKm double mutants were obtained mobilizing the pKNG $\Delta$ lpxRKm plasmid into YeO8- $\Delta$ yopP and YeO8- $\Delta$ pmrF, respectively. The replacement of

the wild-type alleles by the mutant ones was done as described above and confirmed by PCR (data not shown).

To cure the pYV plasmid from YcO8- $\Delta$ *lpxR*Km, bacteria were grown at 37°C in Congo Red Magnesium oxalate agar plates [65]. Colony size and lack of uptake of Congo Red were used to detect loss of the virulence plasmid. This was further confirmed by testing the YadA-dependent autoagglutination ability [66].

### Construction of *lpxR::lucFF* reporter fusion

A 443 bp DNA fragment containing the promoter region of *lpxR* was amplified by PCR using *Vent* polymerase (see Table S1 for primers used), EcoRI digested, gel purified and cloned into EcoRI-SmaI digested pGPL01Tp suicide vector [15]. This vector contains a promoterless firefly luciferase gene (*lucFF*) and a R6K origin of replication. A plasmid in which *lucFF* was under the control of the *lpxR* promoter was identified by restriction digestion analysis and named pGPL01TpYelpxR. This plasmid was introduced into *E. coli* DH5 $\alpha$ -*lpir* from which it was mobilized into *Y. enterocolitica* by triparental conjugation using the helper strain *E. coli* HB101/pRK2013. Strains in which the suicide vectors were integrated into the genome by homologous recombination were selected. This was confirmed by PCR (data not shown).

### Complementation of *lpxR* mutant

To complement the *lpxR* mutant, a DNA fragment of 1.5 kb was PCR-amplified using TaKaRa polymerase (see Table S1 for primers used) gel purified, and cloned into pGEMT-Easy (Promega) to obtain pGEMTCom*lpxR*. A fragment, containing the putative promoter and coding region of the deacylase, was obtained by PvuII digestion of pGEMTCom*lpxR*, gel purified and cloned into the *ScaI* site of the medium copy plasmid pTM100 [40] to obtain pTMLpxR. For the construction of plasmid pTMLpxRFLAG, the *lpxR* coding region with its own promoter and a FLAG epitope sequence right before the stop codon was PCR amplified using *Vent* polymerase, primers LpxRtagging and LpxRFLAG (Table S1) and genomic DNA as template. The fragment was phosphorylated, gel purified and cloned into *ScaI*-digested pTM100. pTMLpxR and pTMLpxRFLAG were introduced into *E. coli* DH5 $\alpha$ -*lpir* and then mobilized into *Y. enterocolitica* strains by triparental conjugation using the helper strain *E. coli* HB101/pRK2013.

### Isolation and analysis of lipid A

Lipid As were extracted using an ammonium hydroxide/isobutyric acid method and subjected to negative ion matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis [14,67]. Analyses were performed on a Bruker Autoflex II MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Incorporated) in negative reflective mode with delayed extraction. Each spectrum was an average of 300 shots. The ion-accelerating voltage was set at 20 kV. Dihydroxybenzoic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was used as a matrix. Further calibration for lipid A analysis was performed externally using lipid A extracted from *E. coli* strain MG1655 grown in LB at 37°C. Interpretation of the negative-ion spectra is based on earlier studies showing that ions with masses higher than 1000 gave signals proportional to the corresponding lipid A species present in the preparation [9,12,17,68]. Important theoretical masses for the interpretation of peaks found in this study are: lipid IV<sub>A</sub>, 1405; C<sub>12</sub>, 182, C<sub>14</sub>, 210; C<sub>16:1</sub>, 236.2; aminoarabinose (AraNH), 131.1; C<sub>16</sub>, 239.

### Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis of the *lpxR* gene was performed by PCR [69]. Plasmid pTMLpxR, obtained with a minipreparation kit

(Macherey-Nagel), was used as template and the desired mutations were introduced by the primer pairs described in Table S1. Amplifications were carried out in 50  $\mu$ l reaction mixture using *Vent* DNA polymerase (New England BioLabs.). The PCR was started with initial 70 sec incubation at 95°C and then steps (95°C 50 sec, 60°C 75 sec and 72°C 6 min) were repeated 20 times followed by a 10 min extension time at 72°C. The obtained PCR products were gel purified, phosphorylated with T4 polynucleotide kinase, ligated, and digested with DpnI to break down any remaining template plasmid. The ligated PCR-product was transformed into *E. coli* C600. Plasmid DNA was isolated from transformants and the *lpxR* gene was completely sequenced to confirm the generated mutations and to ensure that no other changes were introduced. The name of each mutant construct includes the wild-type residue (single-letter amino acid designation) followed by the codon number and mutant residue (typically alanine).

For the construction of plasmids pTMLpxR(N9A)FLAG and pTMLpxR(S34A)FLAG, the *lpxR* alleles encoded into pTMLpxR(N9A) and pTMLpxR(S34A) were PCR amplified using *Vent* polymerase, and primers LpxRtagging and LpxRFLAG (Table S1). The fragments were phosphorylated, gel purified and cloned into *ScaI*-digested pTM100 [40]. Plasmids were introduced into *E. coli* DH5 $\alpha$ -*lpir* and then mobilized into *Y. enterocolitica* strains by triparental conjugation using the helper strain *E. coli* HB101/pRK2013.

### Purification of membrane proteins and Western blot analysis of LpxR FLAG tagged levels

Overnight 5-ml cultures of *Y. enterocolitica* strains were diluted 1:21 into 100 ml of LB in a 250-ml flask. Cultures were incubated with aeration at 21°C or 37°C until OD<sub>600</sub> 0.8. Bacteria were recovered by centrifugation (6500 $\times$ g; 10 min, RT) and they were resuspended in 2 ml of 10 mM Tris/HCl (pH 7.4)-5 mM MgSO<sub>4</sub> containing 2% Triton X-100 (v/v). Cells were broken by sonication (Branson digital sonifier; microtip 1/8" diameter, amplitude 10%) for 15 $\times$ 1 min cycles, each cycle comprised 1 min sonication step separated by 1 min intervals. Unbroken cells were eliminated by centrifugation (2000 $\times$ g, 20 min), and cell envelopes were recovered by ultracentrifugation (Beckman 70.1 Ti rotor; 45 000 $\times$ g; 1 h, 4°C). The cell envelopes were resuspended in 500  $\mu$ l of distilled water. The protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

80  $\mu$ g of proteins were separated on 4–12% SDS-PAGE, and semi-dry electrotransferred onto a nitrocellulose membrane using as transfer buffer SDS-PAGE-urea lysis buffer [a freshly prepared 1:1 mix of 1 $\times$  SDS running buffer (12 mM Tris, 96 mM glycine, 0.1% SDS) and urea lysis buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% SDS, 6 M urea)] [70]. Membrane was blocked with 4% skim milk in PBS. Membranes were stained using anti-Flag antibody (1:2000; Sigma) following the instructions of the supplier.

### Structural modeling of *Yersinia enterocolitica* LpxR

A homology model of YeLpxR was constructed based on the crystal structure of StLpxR (PDB code 3FID; [21]). The YeLpxR sequence was used as bait to search Protein Data Bank with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) at NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A pairwise sequence alignment was made using the program MALIGN [71] in the BODIL modeling environment [72], and a picture of the alignment was created using ESPrpt [73]. The essential water molecule and the zinc ion in the StLpxR crystal structure were also included in the YeLpxR model. A set of ten models was created with the program MODELLER [74], from which the model with the lowest value of the MODELLER objective function was analyzed and compared to the crystal structure of StLpxR by superimposing with the

program VERTAA (Johnson & Lehtonen, 2004) in BODIL. Different rotamers for D10 and D31 were searched with the program Jackal ([http://wiki.c2b2.columbia.edu/honiglab\\_public/index.php/Software:Jackal](http://wiki.c2b2.columbia.edu/honiglab_public/index.php/Software:Jackal)). D10 was changed to the same rotamer as in the crystal structure of StLpxR, while the rotamer used for D31 was the one with the lowest energy according to Jackal. SURFNET [75] was used to detect surface cavities, while PyMOL (Version 1.4, Schrödinger, LLC) was used for preparing pictures. For the SURFNET calculations, the minimum radius for gap spheres was set to 1.5 Å and the maximum radius was 4.0 Å.

For the docking studies, a Kdo<sub>2</sub>-lipid A, both with and without aminoarabinose, was modified from the coordinates for the LPS molecule in the crystal structure of FhuA [76]. The fatty acyl chains were removed from the Kdo<sub>2</sub>-lipid A molecule in order to reduce the number of rotatable bonds and make the docking more reliable. Aminoarabinose was added to the modified Kdo<sub>2</sub>-lipid A molecule with SYBYL (Version 8.0, Tripos Associates, Inc., St Louis, MO, USA), and the structure was minimized with the conjugate gradient method and Tripos force field. The modified Kdo<sub>2</sub>-lipid A, both with and without aminoarabinose, was docked to the YeLpxR model and the StLpxR crystal structure (PDB code 3FID) with GOLD via Discovery Studio (CSC IT Center for Science Ltd, Espoo, Finland), with default docking parameters and the receptor cavity defined to D10, Q16, T/S34, K67, and Y130.

### Luciferase activity

The reporter strains were grown at 21°C or at 37°C on an orbital incubator shaker (180 r.p.m.) until OD<sub>540</sub> 1.6. The cultures were harvested (2500×g, 20 min, 24°C) and resuspended to an OD<sub>540</sub> of 1.0 in PBS. A 100 µl aliquot of the bacterial suspension was mixed with 100 µl of luciferase assay reagent (1 mM D-luciferin [Synchem] in 100 mM citrate buffer pH 5). Luminescence was immediately measured with a Luminometer LB9507 (Berthold) and expressed as relative light units (RLU). All measurements were carried out in quintuplicate on at least three separate occasions.

### Analysis of motility and *flhDC* expression

Phenotypic assays for swimming motility were initiated by stabbing 2 µl of an overnight culture at the centre of agar plates containing 0.3% agar and 1% tryptone [25,26]. Plates were analyzed after 24 h of incubation at RT and the diameters of the halos migrated by the strain from the inoculation point were compared. Experiments were run in quadruplicate in three independent occasions.

To measure *flhDC* expression, plasmid pRSFlhDC08 [26] encoding the transcriptional fusion *flhDC::lucFF* was integrated into the genomes of the strains by homologous recombination. This was confirmed by Southern blot (data not shown). Luminescence was determined as previously described.

### β-galactosidase and alkaline phosphatase activities

β-galactosidase activity was determined as previously described with bacteria grown in 1% tryptone at RT [77]. Alkaline phosphatase activity was determined in permeabilized cells and the results are expressed in enzyme units per OD<sub>600</sub> as previously described [78]. Experiments were run in duplicate in three independent occasions.

### Real time-quantitative PCR (RT-qPCR)

Bacteria were grown at 21°C or at 37°C in 5 ml of LB medium on an orbital incubator shaker (180 r.p.m.) until an OD<sub>600</sub> of 0.3. 0.5 ml of ice-cold solution EtOH/phenol [19:1 v/v (pH 4.3)] were

added to the culture and the mixture was incubated on ice for 30 min to prevent RNA degradation. Total RNA was extracted using a commercial NucleoSpin RNA II kit as recommended by the manufacturer (Macherey-Nagel).

cDNA was obtained by retrotranscription of 2 µg of total RNA using a commercial M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma), and random primers mixture (SABiosciences, Quiagen). 50 ng of cDNA were used as a template in a 25-µl reaction. RT-PCR analyses were performed with a Smart Cycler real-time PCR instrument (Cepheid, Sunnyvale, CA) and using a KapaSYBR Fast qPCR Kit as recommended by the manufacturer (Cultek). The thermocycling protocol was as follows; 95°C for 3 min for hot-start polymerase activation, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 30 s. SYBR green dye fluorescence was measured at 521 nm.

cDNAs were obtained from three independent extractions of mRNA and each one amplified by RT-qPCR in two independent occasions. Relative quantities of *lpxR* mRNAs were obtained using the comparative threshold cycle ( $\Delta\Delta C_T$ ) method by normalizing to *rpoB* and *tonB* genes (Table S1).

### Analysis of Yop secretion

Overnight cultures of *Y. enterocolitica* strains were diluted 1:50 into 25 ml of TSB supplemented with 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 20 mM sodium oxalate in a 100-ml flask. Cultures were incubated with aeration at 21°C for 2.5 h, and then transferred at 37°C for 3 h. The optical density at 540 nm of the culture was measured and the bacterial cells were collected by centrifugation at 1500×g for 30 min. Ammonium sulphate (final concentration 47.5% w/v) was used to precipitate proteins from 20 ml of the supernatant. After overnight incubation at 4°C, proteins were collected by centrifugation (3000×g, 30 min, 4°C) and washed twice with 1.5 ml of water. Dried protein pellets were resuspended in 50 to 80 µl of sample buffer and normalized according to the cell count. Samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12% polyacrylamide gels and proteins visualized by Coomassie brilliant blue staining.

Control experiments revealed that the secretion of Yops was not affected in *yopE* and *yopP* mutants except that each mutant did not produce either YopE or YopP, respectively (data not shown).

### Analysis of YadA production

Bacteria were grown overnight in 2 ml RPMI 1640 medium lacking phenol red at 37°C without shaking. The OD<sub>540</sub> of the culture was measured and CFUs were determined by plating serial dilutions. Bacteria from 1-ml aliquot were recovered by centrifugation (16 000×g, 10 min, 4°C) and resuspended in 200 µl of SDS-sample buffer. Samples were incubated for 4 h at 37°C and kept frozen at -20°C. Samples were analyzed by SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gels and proteins visualized by Coomassie brilliant blue staining. Samples were normalized according to the cell count and they were not boiled before loading the gel.

### Binding assay to collagen-coated slides

Overnight cultures of *Y. enterocolitica* strains grown at 37°C were diluted 1:10 into 5 ml of LB and grown with aeration at 37°C for 2.5 h. bacteria were pelleted, washed once with PBS and resuspended to an OD<sub>540</sub> of 0.3 in PBS.

12 mm circular coverslips in 24-well tissue culture plates were coated overnight at 4°C with 10 µg/ml human collagen type I (Sigma) in PBS (final volume 100 µl). Coverslips were washed three times with TBS and later they were blocked for 1 h at 4°C with 2% BSA in TBS. Finally, coverslips were washed three times



and were incubated at 37°C with 100 µl of the bacterial suspension. After 1 h incubation, the coverslips were washed three times with PBS and then bacteria fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) in PBS pH 7.4 for 20 min at room temperature. PFA fixed cells were incubated with PBS containing 0.1% saponin, 10% horse serum and Hoechst 33342 (1:25000) for 30 min in a wet dark chamber. Finally, coverslips were washed twice in 0.1% saponin in PBS, once in PBS and once in H<sub>2</sub>O, mounted on Aqua Poly/Mount (Polysciences) and analysed with a Leica CTR6000 fluorescence microscope. Bacteria were counted in images from three randomly selected fields of view obtained at a magnification of ×100 taken with a Leica DFC350FX camera. Wild-type adhesion was set to 100%.

### Actin disruption by *Yersinia* infection

Carcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549, ATCC CCL-185) were maintained in RPMI 1640 tissue culture medium supplemented with 1% HEPES, 10% heat inactivated foetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin and streptomycin) in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere as previously described [79]. For infections, A549 cells were seeded on 12 mm circular coverslips in 24-well tissue culture plates to 70% confluence. Cells were serum starved 16 h before infection. Overnight cultures of *Y. enterocolitica* strains grown at 21°C were diluted 1:10 into 5 ml of LB and grown with aeration at 21°C for 1.5 h and then 1 h at 37°C. Bacteria were pelleted, washed once with PBS and resuspended to an OD<sub>600</sub> = 1 (approximately 10<sup>9</sup> CFU/ml) in PBS. Cells were infected with this suspension to get a multiplicity of infection of 25:1. After 1 h incubation, the coverslips were washed three times with PBS and then cells fixed with 3.7% PFA in PBS pH 7.4 for 20 min at room temperature. PFA fixed cells were incubated with PBS containing 0.1% saponin, 10% horse serum, Hoechst 33342 (1:2500), and OregonGreen 514-phalloidin (1:100) (Invitrogen) for 30 min in a wet dark chamber. Finally, coverslips were washed twice in 0.1% saponin in PBS, once in PBS and once in H<sub>2</sub>O, mounted on Aqua Poly/Mount (Polysciences) and analysed with a Leica CTR6000 fluorescence microscope. Images were taken with a Leica DFC350FX camera.

### YopE translocation

YopE translocation into A549 cells was done as previously described [38]. Briefly, A549 cells were seeded in 12-well tissue culture plates to 80% confluence. Cells were serum starved 16 h before infection. Overnight cultures of *Y. enterocolitica* strains grown at 21°C were diluted 1:10 into 5 ml of LB and grown with aeration at 21°C for 1.5 h and then 1 h at 37°C. Bacteria were pelleted, washed once with PBS and resuspended to an OD<sub>600</sub> = 1 (approximately 10<sup>9</sup> CFU/ml) in PBS. Cells were infected with this suspension to get a multiplicity of infection of 25:1. To synchronize infection, plates were centrifuged at 200×g during 5 min. After 1 h infection, cells were washed twice with PBS and resuspended in 400 µl of PBS with the help of a rubber policeman. Cell suspensions were transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube and cells pelleted (16 000×g; 12 sec). Supernatant was carefully removed and cells were resuspended in 100 µl of 1% digitonin (w/v) in PBS supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Halt protease inhibitor single-use cocktail EDTA-free; Thermo). After 2-min incubation at RT, samples were centrifuged (16 000×g; 10 min, 4°C). 80 µl of the supernatant, containing cytosolic proteins, were collected to whom 20 µl of 5× SDS sample buffer were added. The pellet, containing intact bacteria and cell membranes, was resuspended in 100 µl 1× SDS sample buffer. Aliquots corresponding to approximately 6×10<sup>4</sup> infected A549

cells were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting using rabbit polyclonal antiserum raised against YopE (1:2000 dilution).

### Invasion to HeLa cells

Strains were grown aerobically for 16 h at RT, pelleted and resuspended to an OD<sub>540</sub> of 0.3 in PBS. Bacteria suspensions were added to subconfluent HeLa cells at a multiplicity of infection of ~25:1. After a 30 min infection, monolayers were washed twice with PBS and then incubated for an additional 90 min in medium containing gentamicin (100 µg/ml) to kill extracellular bacteria. This treatment was long enough to kill all extracellular bacteria. After this period, cells were washed three times with PBS and lysed with 0.5% saponin in PBS and bacteria were plated. Experiments were carried out in triplicate on three independent occasions. Invasion is expressed as CFUs per monolayer.

### Polymyxin B susceptibility assay

Bacteria were grown either at 21°C or 37°C in 5 ml LB in a 15-ml Falcon tube with shaking (180 rpm), and harvested (2500×g, 20 min, 24°C) in the exponential growth phase (OD<sub>540</sub> 0.8). Bacteria were washed once with PBS and a suspension containing approximately 1×10<sup>5</sup> CFU/ml was prepared in 10 mM PBS (pH 6.5), 1% Tryptone Soya Broth (TSB; Oxoid), and 100 mM NaCl. Aliquots (5 µl) of this suspension were mixed in 1.5 ml microcentrifuge tubes with various concentrations of polymyxin B (Sigma). In all cases the final volume was 30 µl. After 1 h incubation at the bacterial growth temperature, the contents of the tubes were plated on LB agar. Colony counts were determined and results were expressed as percentages of the colony count of bacteria not exposed to antibacterial agents. All experiments were done with duplicate samples on at least four independent occasions.

### Macrophage culture and TNFα ELISA

Murine macrophages RAW264.7 (ATCC, TIB71) were grown on DMEM tissue culture medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) and Hepes 10 mM at 37°C in an humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For bacterial infection, cells were seeded in 24-well tissue culture plates 15 h before the experiment at a density of 7×10<sup>5</sup> cells per well. Overnight cultures of *Y. enterocolitica* strains grown at 21°C were diluted 1:10 into 5 ml of LB and grown with aeration at 37°C or 21°C for 3 h. Bacteria were pelleted, washed once with PBS and resuspended to an OD<sub>600</sub> = 1 (approximately 10<sup>9</sup> CFU/ml) in PBS. Cells were infected with this suspension to get a multiplicity of infection of 25:1. To synchronize infection, plates were centrifuged at 200×g during 5 min. After a 30 min infection, cells were washed twice with PBS and then incubated for an additional 180 min in medium containing gentamicin (100 µg/ml). Supernatants were removed from the wells, cell debris removed by centrifugation, and samples were frozen at -80°C. TNFα present in supernatants of culture cells was determined by ELISA (Bender MedSystems) with a sensitivity <4 pg/ml.

### Statistical analysis

The results were analyzed by the one-sample *t* test using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc.). Results are given as means ± SD. A *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

### Supporting Information

**Figure S1 Sequence alignment of StLpxR and YeLpxR.** Conserved residues are shown with black background. The amino

acids that were mutated in this study are highlighted with grey background, with the two biggest differences, G/D31 and A/Q35, indicated by grey stars. The secondary structure for StLpxR is shown on top of the alignment. (TIF)

**Figure S2 Analysis of the expression of *Y. enterocolitica* *lpxR*.** Analysis of *lpxR* mRNA levels assessed by RT-qPCR. Total RNA was extracted from YeO8 (white bar), and mutants (grays bars) YeO8- $\Delta$ *phoPQ* ( $\Delta$ *phoPQ*), YeO8- $\Delta$ *pmrAB* ( $\Delta$ *pmrAB* and YeO8- $\Delta$ *phoPQ*- $\Delta$ *pmrAB* ( $\Delta$ *phoPQ*-*pmrAB*), Yvm927 ( $\Delta$ *rouA*), Yvm927- $\Delta$ *phoPQ*- $\Delta$ *pmrAB* ( $\Delta$ *rouA- $\Delta$ *phoPQ*- $\Delta$ *pmrAB*). (A) Bacteria were grown at 21°C. Wild-type bacteria (YeO8) expression levels were set to 1. (B) Bacteria were grown at 37°C. Wild-type bacteria (YeO8) expression levels were set to 1. (TIF)*

**Figure S3 Analysis of LpxR levels.** Cell envelopes were purified from YeO8- $\Delta$ *lpxR* mutant (YeO8- $\Delta$ *lpxR*) carrying plasmids pTMLpxRFLAG, pTMLpxR(N9A)FLAG or pTMLpxR(S34A)FLAG. Strains were grown at 21°C. 80  $\mu$ g of proteins were run in SDS-12% polyacrylamide gel, electrotrans-

ferred onto a nitrocellulose membrane, and developed by using anti-Flag antibodies. (TIF)

**Table S1 Primers used in this study.** (DOC)

## Acknowledgments

We are grateful members of Bengoechea lab for helpful discussions. We are indebted to Virginia Miller for providing the *rouA* mutant and to Holger Rüssmann for sending us the anti-YopE antiserum. Professor Mark Johnson is acknowledged for the excellent facilities at the Structural Bioinformatics Laboratory at the Department of Biosciences at Åbo Akademi University. Use of Biocenter Finland infrastructure at Åbo Akademi (bioinformatics, structural biology, and translational activities) is also acknowledged.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TAS JAB. Performed the experiments: MR EL KMD CPG CML NT. Analyzed the data: MR EL KMD CPG CML NT TAS JAB. Wrote the paper: MR EL KMD TAS JAB.

## References

- Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635–700.
- Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE (2007) Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 76: 295–329.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, et al. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085–2088.
- Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV (2006) Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res* 12: 205–223.
- Murata T, Tseng W, Guina T, Miller SI, Nikaido H (2007) PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 189: 7213–7222.
- Bottonne EJ (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 10: 257–276.
- Marceau M (2005) Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update. *Curr Issues Mol Biol* 7: 151–177.
- Straley SC, Perry RD (1995) Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol* 3: 310–317.
- Aussel L, Thérissod H, Karibian D, Perry MB, Brunet M, et al. (2000) Novel variation of lipid A structures in strains of different *Yersinia* species. *FEBS Letters* 465: 87–92.
- Bengoechea JA, Brandenburg K, Arraiza MD, Seydel U, Skurnik M, et al. (2003) Pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains increase the outer membrane permeability in response to environmental stimuli by modulating lipopolysaccharide fluidity and lipid A structure. *Infect Immun* 71: 2014–2021.
- Kawahara K, Tsukano H, Watanabe H, Lindner B, Matsuura M (2002) Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect Immun* 70: 4092–4098.
- Rebeil R, Ernst RK, Gowen BB, Miller SI, Hinnebusch BJ (2004) Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae. *Mol Microbiol* 52: 1363–1373.
- Rebeil R, Ernst RK, Jarrett CO, Adams KN, Miller SI, et al. (2006) Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. *J Bacteriol* 188: 1381–1388.
- Perez-Gutierrez C, Llobet E, Llopart CM, Reines M, Bengoechea JA (2010) Role of lipid A acylation in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect Immun* 78: 2768–2781.
- Reines M, Llobet E, Llopart CM, Moranta D, Perez-Gutierrez C, et al. (2012) Molecular basis of *Yersinia enterocolitica* temperature-dependent resistance to antimicrobial peptides. *J Bacteriol* 194: 3173–3188.
- Anisimov AP, Dentovskaya SV, Titareva GM, Bakhteeva IV, Shaikhutdinova RZ, et al. (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.
- Oertelt C, Lindner B, Skurnik M, Holst O (2001) Isolation and structural characterization of an R-form lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Eur J Biochem* 268: 554–564.
- Reynolds CM, Ribeiro AA, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CR, et al. (2006) An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* *lpxR* that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J Biol Chem* 281: 21974–21987.
- Stead CM, Beasley A, Cotter RJ, Trent MS (2008) Deciphering the unusual acylation pattern of *Helicobacter tyloori* lipid A. *J Bacteriol* 190: 7012–7021.
- Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MT, Crossman L, et al. (2006) The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* 2: e206.
- Rutten L, Mannie JP, Stead CM, Raetz CR, Reynolds CM, et al. (2009) Active-site architecture and catalytic mechanism of the lipid A deacylase LpxR of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1960–1964.
- Cathelyn JS, Ellison DW, Hinchliffe SJ, Wren BW, Miller VL (2007) The RovA regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many RovA-regulated genes were acquired more recently than the core genome. *Mol Microbiol* 66: 189–205.
- Ellison DW, Miller VL (2006) H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol* 188: 5101–5112.
- Young GM, Schmiel DH, Miller VL (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 U S A* 96: 6456–6461.
- Young GM, Smith MJ, Minnich SA, Miller VL (1999) The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J Bacteriol* 181: 2823–2833.
- Bengoechea JA, Najdenski H, Skurnik M (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.
- Schmiel DH, Wagar E, Karamanou L, Weeks D, Miller VL (1998) Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect Immun* 66: 3941–51.
- Young BM, Young GM (2002) YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 184: 1324–1334.
- Schmiel DH, Young GM, Miller VL (2000) The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol* 182: 2314–2320.
- Miller VL, Falkow S (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 56: 1242–1248.
- Pepe JC, Miller VL (1993) *Yersinia enterocolitica* invasion: A primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6473–6477.
- Pepe JC, Badger JL, Miller VL (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Mol Microbiol* 11: 123–135.
- Revell PA, Miller VL (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* 35: 677–685.
- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811–825.
- Trosky JE, Liverman AD, Orth K (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* 10: 557–565.
- Viboud GI, Bliska JB (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 59: 69–89.
- Augustin DK, Song Y, Baek MS, Sawa Y, Singh G, et al. (2007) Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 2203–2209.
- Perez-Gutierrez C, Llopart CM, Skurnik M, Bengoechea JA (2007) Expression of the *Yersinia enterocolitica* pYV-encoded type III secretion system is modulated by lipopolysaccharide O-antigen status. *Infect Immun* 75: 1512–1516.

39. West NP, Sansonetti P, Mounier J, Exley RM, Parsot C, et al. (2005) Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science* 307: 1313–1317.
40. Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert J-M, Cornelis G (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 58: 2840–2849.
41. Rosqvist R, Forsberg Å, Wolf-Watz H (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* 59: 4562–4569.
42. Skurnik M, Toivanen P (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 174: 2047–2051.
43. El Tahir Y, Skurnik M (2001) YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol* 291: 209–218.
44. Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238–250.
45. Hancock REW, Chapple DS (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1317–1323.
46. Nicolas P, Mor A (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defence system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 49: 277–304.
47. Vaara M (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56: 395–411.
48. Groisman EA (1994) How bacteria resist killing by host-defence peptides. *Trends Microbiol* 2: 444–449.
49. Gutschmann T, Hagge SO, David A, Roes S, Bohling A, et al. (2005) Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res* 11: 167–173.
50. Nizet V (2006) Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* 8: 11–26.
51. Wiese A, Gutschmann T, Seydel U (2003) Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes. *J Endotoxin Res* 9: 67–84.
52. Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K (2000) Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem* 267: 3032–3039.
53. Thieles A, Wolf A, Doerrie A, Grassl GA, Matsumoto K, et al. (2006) The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep* 7: 838–844.
54. Zhou H, Monack DM, Kayagaki N, Wertz I, Yin J, et al. (2005) *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF- $\kappa$ B activation. *J Exp Med* 202: 1327–1332.
55. Jia W, El ZA, Petruzzello TN, Jayabalasingham B, Seyedirashú S, et al. (2004) Lipid trafficking controls endotoxin acylation in outer membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279: 44966–44975.
56. Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI (2005) Inhibition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J Bacteriol* 187: 2448–2457.
57. Manabe T, Kawasaki K (2008) Extracellular loops of lipid A 3-O-deacylase PagL are involved in recognition of aminoarabinose-based membrane modifications in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J Bacteriol* 190: 5597–5606.
58. Manabe T, Kawano M, Kawasaki K (2010) Mutations in the lipid A deacylase PagL which release the enzyme from its latency affect the ability of PagL to interact with lipopolysaccharide in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 812–816.
59. Bishop RE (2008) Structural biology of membrane-intrinsic beta-barrel enzymes: sentinels of the bacterial outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1881–1896.
60. Tam C, Missiakas D (2005) Changes in lipopolysaccharide structure induce the sigma(E)-dependent response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55: 1403–1412.
61. Bengoechea JA, Zhang L, Toivanen P, Skurnik M (2002) Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* includes cell envelope-dependent signals. *Mol Microbiol* 44: 1045–1062.
62. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria - Inactivation of the *blaD* Gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109: 137–141.
63. Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212: 77–86.
64. Dennis JJ, Zylstra GJ (1998) Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 64: 2710–2715.
65. Riley G, Toma S (1989) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. *J Clin Microbiol* 27: 213–214.
66. Skurnik M, Bölin I, Heikkinen H, Piha S, Wolf-Watz H (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* 158: 1033–1036.
67. El Hamidi A., Tirsoaga A, Novikov A, Hussein A, Caroff M (2005) Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Res* 46: 1773–1778.
68. Lindner B (2000) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of lipopolysaccharides. *Methods Mol Biol* 145: 311–325.
69. Byrappa S, Gavin DK, Gupta KC (1995) A highly efficient procedure for site-specific mutagenesis of full-length plasmids using *Vent* DNA polymerase. *Genome Res* 5: 404–407.
70. Abeyrathne PD, Lam JS (2007) Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. *Can J Microbiol* 53: 526–532.
71. Johnson MS, May AC, Rodionov MA, Overington JP (1996) Discrimination of common protein folds: application of protein structure to sequence/structure comparisons. *Methods Enzymol* 266: 575–598.
72. Lehtonen JV, Still DJ, Rantanen VV, Ekholm J, Bjorklund D, et al. (2004) BODIL: a molecular modeling environment for structure-function analysis and drug design. *J Comput Aided Mol Des* 18: 401–419.
73. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15: 305–308.
74. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779–815.
75. Laskowski RA (1995) SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. *J Mol Graphics* 13: 323–330.
76. Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W (1998) Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282: 2215–2220.
77. Miller JH (1992) A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
78. Manoil C, Beckwith J (1985) *TnphoA*: A transposon for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8129–8133.
79. Regueiro V, Campos MA, Pons J, Alberti S, Bengoechea JA (2006) The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. *Microbiology* 152: 555–566.
80. Appleyard RK (1954) Segregation of new lysogenic types during growth of doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39: 440–452.
81. Zhang L, Skurnik M (1994) Isolation of an R<sup>-</sup> M<sup>+</sup> mutant of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 and its application in construction of rough mutants utilizing mini-Tn5 derivatives and lipopolysaccharide-specific phage. *J Bacteriol* 176: 1756–1760.
82. Llobet E, Campos MA, Gimenez P, Moranta D, Bengoechea JA (2011) Analysis of the networks controlling the antimicrobial peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun* 79: 3718–3732.