

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Patología Animal I**



**CARACTERIZACIÓN DE LIPI-2, UNA NUEVA ISLA DE  
PATOGENICIDAD DE “LISTERIA”**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Gustavo Domínguez Bernal

Bajo la dirección del Doctor:  
José Antonio Vázquez-Boland

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2148-6**

# ÍNDICE.

Listado de figuras.....	i
Listado de tablas.....	v
Listado de abreviaturas.....	vi
Resumen.....	vii
Summary.....	ix

## 1. INTRODUCCIÓN..... 9

1.1. EL GÉNERO <i>LISTERIA</i> Y LA LISTERIOSIS.....	10
1.1.1. Breve reseña histórica y situación actual.....	10
1.1.2. Taxonomía y especies patógenas del género <i>Listeria</i> .....	11
1.1.3. Patogenicidad de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. ivanovii</i> .....	13
1.2. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR <i>LISTERIA</i> .....	14
1.2.1. Ciclo intracelular de <i>Listeria</i> .....	17
1.2.2. Determinantes moleculares del parasitismo intracelular de <i>Listeria</i> .....	18
1.3. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y EVOLUCIÓN DE LOS DETERMINANTES DE VIRULENCIA DE <i>LISTERIA</i> .....	28
1.3.1. Región hly de virulencia.....	29
1.3.2. Familia multigénica de las internalinas.....	31
1.3.3. Regulación genética de los determinantes de virulencia de <i>Listeria</i> .....	35

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... 40

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 44

3.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE 44/2, UN MUTANTE POR TRANSPOSÓN AFECTADO EN LA PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD ESFINGOMIELINASA: IDENTIFICACIÓN DEL LOCUS <i>LYRA</i> .....	45
3.1.1. Introducción.....	46
3.1.2. Resultados.....	46
3.1.2.1. Caracterización preliminar y virulencia del mutante 44/2.....	46
3.1.2.2. Mapeo de la inserción de Tn1545 en el mutante 44/2 y clonaje de la región cromosómica flanqueante.....	49
3.1.2.3. Caracterización genética de la región de inserción del transposón en 44/2.....	55
3.1.2.4. Caracterización de la región del locus <i>lyrA</i> de <i>L. ivanovii</i> .....	56
3.1.2.5. Ensayos de complementación de 44/2 con <i>lyrA</i> .....	11
3.1.2.6. Construcción de un mutante <i>lyrA</i> de <i>L. ivanovii</i> .....	11
3.1.2.7. Presencia de <i>lyrA</i> en <i>L. monocytogenes</i> y análisis genómico comparado del locus.....	13
3.1.2.8. Caracterización de mutantes <i>lyrA</i> en <i>L. ivanovii</i> .....	17
3.1.3. Discusión.....	18
3.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS DE <i>L. IVANOVII</i> CON FENOTIPO HEMOLÍTICO ALTERADO.....	22
3.2.1. Introducción.....	23
3.2.2. Resultados.....	23
3.2.2.1. Identificación de variantes hemolíticas de <i>L. ivanovii</i> .....	23
3.2.2.2. Clasificación de las variantes.....	25
3.2.2.3. Caracterización genética del fenotipo variante de clase IV.....	36
3.2.3. Discusión.....	38

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LIPI-2, UNA NUEVA ISLA DE PATOGENICIDAD DE <i>L. IVANOVII</i> .....	41
3.3.1. Introducción.....	42
3.3.2. Resultados.....	42
3.3.2.1. Identificación del cluster <i>smcL</i> / <i>i-inlF</i> / <i>i-inlE</i> .....	42
3.3.2.2. Identificación y caracterización genética de la región deletada en los mutantes de clase IV.....	43
3.3.2.3. Caracterización de los extremos del fragmento deletado.....	48
3.3.2.4. Ensayos de virulencia en el modelo murino y en el hospedador natural de <i>L. ivanovii</i> ..	49
3.3.2.5. Caracterización de una isla genómica de virulencia específica de <i>L. ivanovii</i> .....	53
3.3.2.5.1 Estructura genética del segmento cromosómico específico de <i>L. ivanovii</i> .....	55
3.3.2.5.2 Análisis de los extremos de la región específica de <i>L. ivanovii</i> .....	66
3.3.2.5.3 LIPI-2, una nueva isla de patogenicidad de <i>Listeria</i> .....	71
3.3.2.6. Estudio de LIPI-2 en distintas cepas de <i>L. ivanovii</i> .....	71
3.3.2.7. Estructura de la región de inserción de LIPI-2 en <i>Listeria</i> spp.....	72
3.3.3. Discusión.....	75
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>84</b>
4.1. CEPAS BACTERIANAS, CONDICIONES DE CULTIVO Y MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN.....	85
4.2. PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....	85
4.3. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.....	86
4.4. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD LECITINASA (PLCB).....	86
4.5. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ESFINGOMIELINASA.....	91
4.6. PRUEBA DE UTILIZACIÓN DE G-1-P.....	92
4.7. EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSÓMICO Y SOUTHERN BLOT.....	92
4.8. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN (SLOT BLOT, NORTHERN BLOT Y PRIMER EXTENSION (PE)).....	93
4.9. SONDAS DE DNA E HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	94
4.10. HIBRIDACIÓN DE COLONIAS.....	95
4.11. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR.....	95
4.12. PASEO CROMOSÓMICO (GENOME WALKING) MEDIANTE PCR INVERSA.....	96
4.13. SECUENCIACIÓN DE DNA.....	97
4.14. CLONAJE DIRECTO DE PRODUCTOS DE PCR.....	97
4.15. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DELECIONADOS EN FASE POR DOBLE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	98
4.16. PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE <i>LYRA</i> Y <i>ORFD1-LYRA</i> .....	100
4.17. PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE <i>PRFA</i> .....	100
4.18. INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS EN <i>LISTERIA</i> MEDIANTE ELECTROPORACIÓN.....	102
4.19. OTRAS TÉCNICAS GENÉTICAS.....	103
4.20. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS E IMMUNOBLOTTING.....	103
4.21. CURVAS DE CRECIMIENTO.....	104
4.22. ENSAYOS DE VIRULENCIA.....	104
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>106</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>



# LISTADO DE FIGURAS.

**Figura 1.1.** Representación esquemática del ciclo de infección celular de las especies patógenas de *Listeria*.

**Figura 1.2.** Estructura genética de la región cromosómica del cluster *hly* de virulencia en *Listeria* spp.

**Figura 1.3.** Filogenia del género *Listeria* y modelo hipotético para la evolución del cluster *hly* de virulencia.

**Figura 1.4.** Esquema de la familia multigénica de las internalinas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.

**Figura 3.1.1.** Principales características fenotípicas de 44/2 y 8/6.

**Figura 3.1.2.** Curvas de aclaramiento en el hígado de ratones *Swiss* infectados experimentalmente con una misma dosis por ratón de  $2.5 \times 10^6$  de WT y 44/2.

**Figura 3.1.3.** Análisis por *Southern blot* del número de copias de Tn 1545 en el mutante 44/2.

**Figura 3.1.4.** Análisis por *Southern blot* del plásmido pGM10 conteniendo el fragmento *HindIII* que abarca el punto de inserción de Tn 1545 clonado en el vector pBR322.

**Figura 3.1.5.** Principales características estructurales de LyrA.

**Figura 3.1.6.** Organización física y transcripcional del locus *lyrA* de *L. ivanovii* y su región flanqueante.

**Figura 3.1.7.** Análisis transcripcional de los genes *smcL*, *i-inIE*, así como del locus *lyrA* y sus regiones adyacentes en la cepa de *L. ivanovii* ATCC19119<sup>T</sup> y su mutante 44/2.

**Figura 3.1.8.** Secuencia de nucleótidos de las regiones flanqueantes al punto de inserción de Tn 1545 obtenido a partir de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>.

**Figura 3.1.9.** Comprobación, mediante *Southern blot*, de la mutación en fase de *lyrA* por doble recombinación homóloga.

**Figura 3.1.10.** Análisis mediante *Southern blot* de la presencia de homólogos a *lyrA* en las seis especies que integran *Listeria* spp.

**Figura 3.1.11.** Representación de la estructura del locus *lyrA* y sus regiones flanqueantes en los géneros bacterianos filogenéticamente más próximos a *Listeria*.

**Figura 3.1.12.** Curvas de crecimiento de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>, los dos mutantes por delección  $\Delta$ *lyrA* así como el mutante  $\Delta$ *lyrA trans* complementado con el alelo *lyrA* introducido en multicopia en el vector pHP59 cultivadas en BHI a 37°C.

**Figura 3.2.1.** Variantes hemolíticas obtenidas tras someter a diversas condiciones de estrés térmico y prolongada fase estacionaria de crecimiento a *L. Ivanovii*.

**Figura 3.2.2.** Actividades hemolítica y lecitinasa en agar sangre (panel A) y agar yema de huevo (panel B) de las variantes débilmente hemolíticas y sus correspondientes *trans* complementaciones con los alelos silvestre y mutados de *prfA*.

**Figura 3.2.3.** Reacciones de hemólisis sinérgica (test de CAMP) de las variantes débilmente hemolíticas (estrías horizontales) con *R. equi* (estrías verticales).

**Figura 3.2.4.** SDS-PAGE y *Western immunoblot* con anti-ILO de los SC del inicio de la fase exponencial precipitados con TCA.

**Figura 3.2.5.** SDS-PAGE de concentraciones diluidas de las proteínas de SC mostradas en la Figura 3.2.4.

**Figura 3.2.6.** Curvas de crecimiento de las variantes débilmente hemolíticas cultivadas en BHI a 37°C.

**Figura 3.2.7.** Esquema de las principales características de organización de la estructura primaria de PrfA comparado con los dos PrfA mutados. Alineamiento de las secuencias de sus extremos C-terminales.

**Figura 3.2.8.** Perfiles de macrorrestricción obtenidos mediante digestión con *SmaI* y electroforesis con campo pulsado de los DNA cromosómicos de WT y los tres mutantes encuadrados en la Clase IV.

**Figura 3.3.1.** Análisis del locus *smcL/i-inIF/i-inIE* en *L. ivanovii* WT y los mutantes GD-3 y 44/2.

**Figura 3.2.2.** Organización física y definición de los extremos derecho (E.D.) e izquierdo (E.I.) de la región deletcionada. Análisis genómico comparado con *L. monocytogenes* EGDe.

**Figura 3.2.3.** Ensayos de virulencia en el modelo murino. Curva de aclaramiento en el hígado de ratones BALB/c de *L. ivanovii* (WT), un mutante por transposición en la ivanolisina (20/24) y GD-3.

**Figura 3.2.4A.**

**Figura 3.2.4B.**

**Figura 3.2.5.** Organización física de LIPI-2 y sus regiones flanqueantes.

**Figura 3.2.6.** Alineamiento múltiple y principales características estructurales de las internalinas pequeñas y secretadas de LIPI-2.

**Figura 3.2.7.** Alineamiento y principales características estructurales de las internalinas de superficie de LIPI-2 e InIB de *L. monocytogenes*.

**Figura 3.2.8.** Análisis estructural del dominio Csa de las internalinas de superficie de LIPI-2, InIB y la proteína Ami.

**Figura 3.2.9.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo izquierdo de LIPI-2.

**Figura 3.2.10.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo derecho de LIPI-2.

**Figura 3.2.11.** Estructura de LIPI-2 y la región de inserción en *Listeria* spp.

**Figura 4.1.** Diagrama de flujo en el que se representa la estrategia seguida para construir mutantes en fase por doble recombinación homóloga.

**Figura 4.2.** Diagrama de flujo que representa la estrategia para preparar distintas construcciones de *lyrA*.

**Figura 4.3.** Esquema donde se representa la estrategia utilizada para preparar las distintas construcciones de *prfA*

## LISTADO DE TABLAS.

**Tabla 3.1.1.** Principales características de los mutantes obtenidos por transposición con Tn1545.

**Tabla 3.1.2.** Cajas LysR en las zonas promotoras de distintos genes de *L. ivanovii*.

**Tabla 3.1.3.** Porcentajes de homología entre las proteínas codificadas en los loci representados en la Figura 3.1.11.

**Tabla 3.2.1.** Propiedades de los mutantes débilmente hemolíticos.

**Tabla 3.3.1.** Principales características de las distintas ORFs flanqueantes a LIPI-2.

**Tabla 3.3.2.** Ensayos de virulencia en el hospedador natural de *L. ivanovii*.

**Tabla 3.3.3.** Papel en la patogenicidad de la región delecionada.

**Tabla 3.3.4.** Principales características de las internalinas de LIPI-2.

**Tabla 3.3.5A.** Porcentaje de identidad entre las internalinas pequeñas y secretadas.

**Tabla 3.3.5B.** Porcentaje de identidad entre las internalinas grandes asociadas a la superficie de LIPI-2, InIB e InIA de *L. monocytogenes*.

**Tabla 4.1.** Cepas de *Listeria* utilizadas en este trabajo.

**Tabla 4.2.** Mutantes de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>.

**Tabla 4.3.** Plásmidos utilizados.

**Tabla 4.4.** Oligonucleótidos diseñados y empleados en este trabajo.

## LISTADO DE ABREVIATURAS.

ASO	<b>Agar sangre de oveja.</b>
3T6	Línea celular de fibroblastos de embrión de ratón.
BHI	Infusión de cerebro y corazón.
Caco-2	Línea celular de carcinoma de colon humano.
cAMP	Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico.
CAMP	Test de Christie, Atkins, Munch y Petersen.
Crp	Proteína receptora de cAMP.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50%.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DO <sub>x</sub>	Densidad óptica a longitud de onda x (en nm).
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético.
F-actina	Filamentos de actina.
G-1-P	Glucosa-1-fosfato.
HTH	Dominio proteico "hélice-giro-hélice" de unión a DNA.
J774	Línea celular macrofágico de origen murino.
kb	Kilobases.
kDa	Kilodalton.
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani.
(i)	<i>Listeria ivanovii</i> .
<i>llo</i>	Alelo de <i>hly</i> presente en <i>L. ivanovii</i> .
<i>Hly</i>	locus de la hemolisina.
LLO	Listeriolisina O.
ILO	Ivanolisina O.
MEM	Medio mínimo esencial.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
nts	<b>Nucleótidos.</b>
ORF	Fase de lectura abierta.
P	Promotor.
PAI	Isla de patogenicidad.
pb/bp	Par de bases.
PC-PLC (PLC):	Fosfatidilcolina fosfolipasa C (lecitinasa).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PI	Punto isoeléctrico.
PI-PLC	Fosfatidilinositol fosfolipasa C.
PLO	Perfringolisina O.
PrfA	Factor regulador positivo.
RBS	Punto de unión al ribosoma.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero.
SC	Sobrenadante de cultivo.
SDS	Dodecil sulfato sódico.

<b>SDS-PAGE</b>	<b>Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida-SDS.</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema nervioso central.</b>
<b>SSC</b>	Solución citrato sódico.
<b>Tn</b>	Transposón.
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonias.</b>
<b>UHly</b>	Unidad de actividad hemolítica.
<b>UPicB</b>	Unidad de actividad lecitinasa.
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>VASP</b>	Fosfoproteína vasodilatador-estimulada.

## RESUMEN.

En este trabajo de tesis, partiendo de unos mutantes espontáneos afectados en la producción de dos factores de virulencia de *L. ivanovii* (una esfingomielinasa y una internalina secretada), hemos identificado y caracterizado una nueva isla de patogenicidad (PAI) de *Listeria*. Se trata de una región cromosómica específica de *L. ivanovii*, que con *L. monocytogenes* constituyen una de las dos especies patógenas del género *Listeria*. A diferencia de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* presenta, junto a otras características patogénicas diferenciales, un marcado tropismo de hospedador hacia los rumiantes. La región cromosómica caracterizada ha sido denominada LIPI-2 y comprende el gen de la esfingomielinasa (*smcL*), nueve miembros de la familia multigénica de las internalinas y una ORF de función desconocida. LIPI-2 cumple la mayoría de los criterios que definen habitualmente a las PAIs: gran tamaño (22 kb), presencia exclusiva en una especie que representa una patovariedad dentro del género *Listeria*, composición de DNA significativamente distinta a la del resto del genoma, punto de inserción asociado con un locus tRNA, e inestabilidad genética. LIPI-2 es la primera PAI identificada en bacterias gram-positivas para la que se demuestra inestabilidad genética y asociación con un locus tRNA, una estructura normalmente utilizada como punto de inserción de elementos genéticos móviles tales como fagos o plásmidos integrativos. El locus donde se encuentra el gen tRNA afectado por LIPI-2, enmarcado por los loci *ysnB* e *ydel*, no alberga más que una ORF en *L. monocytogenes* EGDe. El análisis de la secuencia de dicha región intergénica en otras cepas y especies del género sugiere que dicho locus constituye un punto sujeto a variabilidad genética, presumiblemente por permitir la inserción de fragmentos de DNA. La inestabilidad genética de LIPI-2 se manifiesta dando lugar a una delección específica y reproducible que afecta a una porción de la isla así como a un fragmento de la región cromosómica adyacente. La delección va acompañada de una pérdida de virulencia en el modelo murino y en el hospedador natural de *L. ivanovii*, la oveja. En este animal, la delección de LIPI-2 está aparentemente asociada a un cambio en el tropismo tisular. De las diez internalinas codificadas en LIPI-2, ocho son del subgrupo S-InI, caracterizado por su pequeño tamaño, su estricta dependencia expresional de PrfA y su carácter soluble. Las otras dos internalinas pertenecen al subgrupo L-InI, de mayor tamaño, con dominios de anclaje a la pared bacteriana, de expresión independiente de (o sólo parcialmente controlada por) PrfA, y abundantes en *L. monocytogenes*. Estas dos internalinas constituyen los primeros representantes de esta clase identificadas en *L. ivanovii*. LIPI-2 está presente con la misma estructura genética en distintas cepas de *L. ivanovii*. Esta conservación refleja probablemente la importancia de este locus cromosómico para la biología de *L. ivanovii*. Esta PAI está también insertada, en el mismo locus cromosómico, en la subespecie londoniensis, lo que revela que fue adquirida hace un largo tiempo, antes de la diversificación de *L. ivanovii* en las dos subramas evolutivas que la componen. La adquisición y posterior evolución de LIPI-2 ha jugado probablemente un importante papel en la definición de la especie *L. ivanovii*. LIPI-2 juega probablemente un importante papel en la especificidad patogénica de *L. ivanovii*.

Junto a los mutantes espontáneos de delección de LIPI-2, hemos identificado en este trabajo otros tres mutantes estables de fenotipo débilmente hemolítico. Dos de ellos presentan defectos genéticos en el gen *prfA*, que codifica el regulador central de la virulencia de *Listeria*

(PrfA). Uno de los mutantes resulta de la delección en fase de un fragmento central del gen *prfA*, dando lugar a una proteína afuncional por pérdida del dominio de unión al DNA. El otro mutante presenta una mutación puntual que rompe la fase de lectura, dando lugar a una proteína PrfA truncada que mantiene cierta actividad residual. El análisis de este mutante revela la importancia del dominio C-terminal de cremalleras de leucina en la función transcripcional de PrfA. El tercer mutante obedece a un defecto genético desconocido, presumiblemente afectando a un locus que controla la expresión de al menos *smcL* y la internalina *i-inlE*. Todas estas mutaciones fueron obtenidas sometiendo a *L. ivanovii* a condiciones de estrés asociadas con estancias prolongadas a elevada temperatura y/o fase estacionaria. Este hecho refleja probablemente de el carácter dispensable de los genes de virulencia cuando la bacteria crece en condiciones in vitro en el laboratorio.

# **1. INTRODUCCIÓN.**

## 1.1. El género *Listeria* y la listeriosis.

El género *Listeria* está compuesto por pequeños bacilos Gram positivos de extremos redondeados con 0,4-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,5-2  $\mu\text{m}$  de longitud. No forman cápsulas ni esporos y son anaerobios facultativos. Gracias a unos pocos flagelos peritricos, son móviles a 20-25°C aunque no a 37°C (523,524).

En medios sólidos forman pequeñas colonias tras 24-48 horas, de 1mm de diámetro, redondeadas, convexas y translúcidas con una coloración gris azulada que se torna en iridiscencia azul-verdosa si se ilumina oblicuamente. Son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, entre 1 y 43°C, si bien su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30 y 37°C. Toleran condiciones de acidez y de alcalinidad, siendo capaces de crecer entre pH 5,5 y pH 9,6, aunque el crecimiento óptimo se produce a pH neutro o ligeramente alcalino.

Esta capacidad para crecer en un amplio rango de condiciones puede explicar que las bacterias pertenecientes a este género estén ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se han aislado tanto del suelo como de aguas residuales, de vegetales en descomposición, de heces animales, de salas de mataderos así como de alimentos frescos, ahumados y congelados (146,201,478,515,520,524). También es frecuente identificar portadores humanos y animales. Es decir, son microorganismos extraordinariamente ubicuos y resistentes, con un estilo de vida esencialmente saprofita, aunque algunas especies son patógenas oportunistas para el hombre y los animales (apartado 1.1.2) (524).

De las seis especies que pertenecen al género *Listeria*, tres, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*, son  $\beta$ -hemolíticas en agar con 5% vol/vol de sangre de caballo o cordero. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* presentan un pequeño halo de hemólisis alrededor de las colonias que, en numerosas ocasiones, es difícil de observar de tal forma que se hace necesario retirar la colonia para poder detectarlo. Por el contrario, *L. ivanovii* presenta un amplio doble halo de  $\beta$ -hemólisis. Para diferenciar más claramente entre estas especies se utiliza un test de potenciación de su actividad hemolítica con *Staphylococcus aureus* productor de  $\beta$ -hemolisina (esfingomielinasa C) y *Rhodococcus equi*, denominado test de CAMP (87). Mientras *L. ivanovii* presenta un característico efecto de potenciación en forma de "pala" con *R. equi*, en *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se observa un efecto en forma de cerilla (196,470). Con *S. aureus* tan sólo *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* muestran una potenciación de su actividad hemolítica (523).

### 1.1.1. Breve reseña histórica y situación actual.

La primera descripción de *L. monocytogenes* data de 1926 y se debe a un brote espontáneo de infección septicémica ocurrida en 1924 entre animales de laboratorio en la Universidad de Cambridge (Reino Unido) (391). El proceso se caracterizaba por una leucocitosis mononuclear y lesiones necróticas en el hígado, por lo que se propuso el nombre de *Bacterium*

*monocytogenes* para el microorganismo responsable. En 1927, Pirie, estudiando la “Tiger river disease” del gerbo en Africa del Sur, que cursaba con focos hepáticos de necrosis, aisló una bacteria a la que llamó *Listerella hepatolytica* (433).

En 1929, Nyfeldt aisló un organismo similar a partir de una mononucleosis infecciosa humana (411). Fue en 1940 cuando el propio Pirie propuso designar a *L. monocytogenes* con su nomenclatura actual (434). Gill, en 1933 y 1937 (184,185) aisló como agente etiológico, a partir del cerebro de ovejas afectadas con una enfermedad que denominó *circling disease*, un microorganismo al que asignó el nombre de *Listerella ovis*, describiendo así la forma más característica de la listeriosis en rumiantes: la meningoencefalitis. Schultz *et al.*, en 1934 (515), aislaron por primera vez, *L. monocytogenes* a partir de pacientes con meningoencefalitis. En 1935, Burn (69) fue el primero en describir la “granulomatosis infantiséptica”, forma característica de la infección neonatal por *Listeria*, en cuatro casos de muertes de recién nacidos. En 1955, Ivan Ivanov aisló por primera vez a la especie *L. ivanovii* (a la que denominó *Listeria bulgarica*) a partir de abortos e infecciones perinatales en ovejas (259).

Otro hito importante en la historia de estos microorganismos fue la publicación en 1960, por Gray y Killinger (201), de la clásica revisión titulada “*Listeria monocytogenes* and listerial infections” en la que se resumía extensivamente el relativamente escaso conocimiento acumulado acerca de este grupo de bacterias. Desde entonces se ha producido un aumento en el interés por este patógeno, especialmente con motivo de la aparición, a partir de los años ochenta, de importantes brotes de listeriosis humana que, aunque de reducida morbilidad, producían una elevada mortalidad. Fue precisamente a raíz de estos brotes cuando se pudo demostrar por primera vez, sin ambigüedad, una asociación entre la infección humana y el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (158,431,509).

Actualmente la listeriosis es una de las infecciones de origen alimentario que causan más preocupación tanto a las administraciones de la Salud Pública como a la industria alimentaria, por el incremento en la incidencia y el gran impacto económico de brotes epidémicos asociados al consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. La emergencia de la listeriosis en la actualidad puede ser el resultado de complejas interacciones entre diversos factores que son un reflejo de los cambios sufridos en el estilo de vida de los países desarrollados en las últimas décadas. Entre estos factores se pueden incluir: (i) progresos médicos que han producido un cambio demográfico, incrementando la proporción de población de edad avanzada e inmunocomprometida; (ii) cambios en el sistema de producción primaria de alimentos (producción a gran escala de materias primas, modificación de las técnicas de procesado de los alimentos, expansión de la industria alimentaria y desarrollo de sistemas de almacenamiento en frío); (iii) modificaciones en los hábitos de alimentación (incremento en la demanda por parte de los consumidores de alimentos listos para comer, precocinados, refrigerados o congelados pero con un mínimo requerimiento de tiempo de cocinado antes de su consumo); (iv) realización de la compra una vez a la semana (482).

### **1.1.2. Taxonomía y especies patógenas del género *Listeria*.**

En la edición de 1986 del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (523), el género *Listeria* se encontraba encuadrado en la sección 14 que agrupa a bacilos Gram-positivos, regulares y no formadores de esporos. Recientemente, en la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, forma parte del Volumen 3 y la sección 23 de bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C. Recientes estudios analizando secuencias de 16S rRNA, indican su relación más estrecha con *Streptococcus* (90) y análisis de 23S rRNA agrupan al género *Listeria* junto a los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus* (500). El contenido en G+C de su DNA oscila entre 36-42%.

Desde 1926 hasta 1974 *L. monocytogenes* fue la única especie reconocida dentro del género *Listeria*, en el que se incluía una mezcla heterogénea de bacterias hemolíticas y patógenas con bacterias no hemolíticas y apatógenas. La octava edición del Manual de Bergey, de 1974, amplió oficialmente el número de especies a cuatro con la descripción de otras tres no patógenas: *L. denitrificans* (descrita en 1963), *L. grayi* y *L. murrayi* (descritas en 1966 y 1971, respectivamente). *L. monocytogenes*, considerada en esta edición como *sensu lato*, seguía incluyendo cepas tan heterogéneas como las arriba mencionadas (hemolíticas y patógenas junto a no hemolíticas y apatógenas). Ello creaba no pocos problemas a la hora de realizar estudios de seguimiento epidemiológico, ya que, en esas condiciones, resultaba imposible establecer conclusiones de aislamientos de *Listeria* a partir del ambiente o portadores sanos y de individuos afectados de listeriosis.

En 1982, mediante análisis de hibridación DNA-DNA (485), *L. monocytogenes sensu lato* fue dividida en cinco grupos genéticos, representando cada uno a una especie diferente: *L. monocytogenes sensu stricto*, compuesta por cepas hemolíticas y patógenas; *L. innocua* (521) y *L. welshimeri* (477), integradas por cepas no hemolíticas y apatógenas; *L. seeligeri*, que es débilmente hemolítica pero apatógena (459,481,523); y un grupo que incluiría las cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al serovar 5, caracterizadas por producir una fuerte  $\beta$ -hemólisis en medios de agar sangre.

El microbiólogo búlgaro Ivan Ivanov ya había sugerido ,en 1975, que las cepas de *L. monocytogenes* serovar 5 fueran incluidas dentro de una especie distinta (260). En 1982, Seeliger *et al.* recomendaron que el serovar 5 debería ser considerado como un taxón diferente a *L. monocytogenes* (520). Finalmente, basándose en sus características fenotípicas, y como resultado de estudios de homología de DNA-DNA (477), todas las cepas pertenecientes al serovar 5 de *L. monocytogenes* se agruparon en una nueva especie: *L. ivanovii*, oficialmente reconocida como tal en 1984 (524). En 1992, Boerlin *et al.* (44) demuestran que *L. ivanovii* contiene dos grupos genómicos con rango de subespecie: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. Ambas se pueden diferenciar por la producción de ácido a partir de ribosa, (negativa en el caso de subs. *londoniensis*) y de N-acetil- $\beta$ -D-manosamina (positiva en caso de subs. *londoniensis*).

En la última edición del Manual de Bergey (523), el género *Listeria* está constituido por ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi* y *L. denitrificans*. No obstante, las tres últimas están clasificadas como *incertae sedis*. Actualmente no existen dudas sobre el hecho de que *L. denitrificans* no pertenece al género *Listeria* (449,545), del que ha sido excluida y encuadrada en un nuevo género: *Jonesia*,

formado por una única especie, *Jonesia denitrificans* (489). El empleo de técnicas genéticas ha permitido demostrar que *L. grayi* y *L. murrayi* constituyen una única especie a la que se ha denominado *L. grayi* por haber sido descrita con anterioridad (483). Por lo tanto, actualmente el género *Listeria* está formado por seis especies (262): *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* (subdividida en las dos subespecies nombradas anteriormente).

Recientes estudios basados en el análisis de la secuencia del 16S y 23S rRNA (53,500) sugieren un árbol filogenético donde *L. grayi* se distancia claramente de las otras cinco especies, que a su vez se separan en dos ramas: en una se encontrarían *L. monocytogenes* y *L. innocua* y en otra estarían incluidas *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*.

De las seis especies que actualmente componen el género *Listeria* solamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas. Si bien *L. seeligeri* presenta una ligera actividad hemolítica, y se ha descrito algún caso de listeriosis humana atribuido a esta especie (486,487), no es considerada como patógena (459,481,523).

### **1.1.3. Patogenicidad de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.**

Aunque ambas especies están muy estrechamente relacionadas taxonómicamente y comparten un ciclo de vida intracelular parásita análogo (272) (apartado 1.2.1), muestran diferencias en su patogenicidad.

La listeriosis es una infección alimentaria atípica debido a la severidad y naturaleza no entérica de la sintomatología principal que provoca (meningitis o encefalitis, septicemia y abortos o infecciones neonatales), a una alta tasa de mortalidad (30%), así como a periodos prolongados de incubación (30 días; (340)). Es así mismo una infección de tipo oportunista que afecta fundamentalmente a niños, ancianos, mujeres embarazadas, y en general, a personas inmunodeprimidas o sometidas a tratamientos inmunosupresores, mientras que el resto de la población no suele verse afectada.

*L. monocytogenes* no sólo se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, de la que se aísla con frecuencia, sino que es capaz de afectar al hombre y a un amplio número de especies animales, tanto mamíferos como aves. Sin embargo, *L. ivanovii* se aísla raramente del medio ambiente o de los alimentos, sugiriendo una distribución mucho más restringida (146,478). Aunque se han descrito casos de listeriosis humana donde el agente etiológico responsable ha sido *L. ivanovii* (110,141,334,361), esta especie posee un tropismo diferencial específico hacia los rumiantes, especialmente los pequeños rumiantes (95,247,341,478,524), en los que origina abortos, septicemias, incluso enteritis, pero nunca encefalitis que, por otro lado, es la manifestación clínica más característica de los pequeños rumiantes afectados por *L. monocytogenes*. De hecho, mientras *L. monocytogenes* invade activamente el sistema nervioso central, *L. ivanovii* no sólo carece de esta capacidad sino que aparentemente posee un tropismo hacia el útero grávido de los pequeños rumiantes (282).

La sintomatología de la listeriosis es una consecuencia de la característica y exclusiva habilidad de los microorganismos responsables de este proceso infeccioso para atravesar dos o tres barreras fisiológicas durante su infección: barrera intestinal y barrera placentaria en el caso de *L. ivanovii* y, además de las anteriores, la barrera hematoencefálica en el caso de *L. monocytogenes*. Los diversos cuadros clínicos con los que puede cursar la listeriosis están, por tanto, en función del agente etiológico responsable (*L. monocytogenes* o *L. ivanovii*), la especie animal afectada, las barreras fisiológicas atravesadas, y los factores predisponentes del propio hospedador. Los cuadros más características son: (i) forma que cursa en forma de meningoencefalitis, (ii) forma maternofetal, que cursa con abortos e infecciones perinatales, y (iii) formas septicémicas. No obstante, también pueden presentarse otros procesos como queratoconjuntivitis, endocarditis, miocarditis (fundamentalmente en aves), iritis, mastitis y enteritis (94,146, 201,403).

La infección del SNC es la forma más frecuente tanto en rumiantes como en personas adultas. En el ganado ovino, la sintomatología nerviosa se manifiesta con signos propios de una romboencefalitis con opistótonos, ceguera, nistagmo, parálisis facial, y marcha en círculos, lo que, inicialmente, dio nombre a la enfermedad en esta especie (*circling disease*) (184). Esta forma de listeriosis suele ser muy severa y origina la muerte de los animales a los pocos días de la aparición de los primeros síntomas. En el ganado bovino las alteraciones del SNC se manifiestan con una extensión de la cabeza sobre el dorso y movimientos paroxísticos de las extremidades como si intentaran nadar, llegando la muerte a causa de una apatía completa o bien de un episodio espasmódico. Rara vez los rumiantes superan la forma nerviosa de la enfermedad. En el hombre, la componente meníngea en la sintomatología de la infección del SNC por *Listeria* es más importante. Se desarrolla también un cuadro grave, caracterizado por una primera fase de excitación seguida de somnolencia que puede llevar al coma y a la muerte si no se instaura un tratamiento adecuado.

La forma maternofetal de listeriosis es especialmente importante en el ganado bovino y en la mujer.. La infección del feto se produce de forma transplacentaria, ocasionando el aborto o, si llega a término, la muerte rápida del neonato debido a la septicemia generalizada con la que nace. En los niños recién nacidos este cuadro se conoce con el nombre ya citado de "granulomatosis infantiséptica", que se manifiesta con la aparición de pequeños granulomas ampliamente diseminados por todo el organismo incluyendo su superficie (519).

La forma septicémica puede aparecer en el individuo adulto, especialmente si concurre inmunodepresión, aunque se han descrito casos en los que no había factores predisponentes reconocidos (403). La septicemia va acompañada generalmente de enteritis, neumonía y, si afecta a hembras gestantes, normalmente abortan.

## **1.2. Patogénesis de la infección por *Listeria*.**

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la patogénesis de la infección por *Listeria* están basados en el modelo murino de listeriosis experimental, ya que constituye un sistema altamente reproducible para caracterizar la virulencia de las especies patógenas del género *Listeria*, mimetizando ciertos aspectos de la infección natural en el hombre y los animales. No

obstante, sobre la base de acercamientos moleculares, actualmente se está cuestionando la capacidad del modelo murino para reproducir importantes aspectos de la listeriosis humana y se ha propuesto el cobaya como modelo de elección para futuros estudios *in vivo* (325).

El primer paso importante para el conocimiento de la patofisiología de la listeriosis se dio gracias a los trabajos pioneros de Mackaness quien, en 1962 (347), estableció que el sistema mononuclear fagocítico atrapaba a las listerias en el hígado y el bazo de los animales infectados, aportando evidencias convincentes de que estas bacterias eran capaces no sólo de sobrevivir sino de multiplicarse activamente en los macrófagos. El modelo de listeriosis experimental en el ratón contribuyó definitivamente a considerar a *L. monocytogenes* como paradigma en el estudio del parasitismo intracelular facultativo y permitir así el desarrollo de conceptos básicos en enfermedades infecciosas e inmunología relacionados con el parasitismo intracelular, tales como la inmunidad adquirida de base celular mediada por células T y macrófagos activados.

La infección por *Listeria* ocurre normalmente tras la ingestión de alimentos contaminados. Por lo tanto la entrada de las bacterias en el organismo se produce fundamentalmente a través de la barrera intestinal tras haber superado el primer filtro de la acidez del estómago (146,509). Sin embargo, se ha postulado que la invasión del SNC podría producirse directamente a partir de lesiones en la mucosa bucal desde donde las listerias accederían a las terminaciones de los nervios trigémino o facial, ascendiendo centripetamente hasta alcanzar el tronco del encéfalo (11,510). Otras posibles vías de invasión, aunque muy infrecuentes, serían la conjuntiva o la mucosa respiratoria (10,328,418,419).

Una vez las bacterias se encuentran en el intestino deben atravesar la barrera mucosa intestinal, ya que no se trata de un patógeno primario del intestino sino sistémico. La puerta de entrada hacia órganos profundos ha sido un tema muy debatido. Tradicionalmente han coexistido dos hipótesis: por un lado, Racz *et al.* (454) describieron, en cobayas infectadas por vía oral, la entrada de *Listeria* a través de los enterocitos y Karunasagar *et al.* (273) mostraron la invasión de células de carcinoma de colon humano (Caco-2) por la superficie apical de las mismas. Por otro lado, Mac Donald *et al.* (345) y Marco *et al.* (356), utilizando el modelo murino, demostraron que las bacterias se localizaban fundamentalmente en las placas de Peyer del íleon, por lo que la invasión del epitelio intestinal podría tener lugar, principalmente, atravesando las células M que tapizan la superficie de los folículos linfoides de la pared intestinal (placas de Peyer). Desde esta localización los microorganismos podrían acceder a los enterocitos por su cara basolateral, como es el caso de *Shigella flexneri* (505,584).

Recientemente se han presentado evidencias apoyando ambas hipótesis. Jensen *et al.* consideran a las células M como puerta de entrada de *Listeria* (261), mientras Marco *et al.* y Pron *et al.* (355,452) indican que no existe un lugar preferencial de entrada (enterocitos o células M). No obstante, todos los autores consideran esta primera fase de entrada como un proceso inespecífico e ineficaz que depende únicamente de la cantidad de bacterias que haya en el intestino y que no requiere ningún factor de virulencia específico (261,452). Sin embargo, se ha demostrado que las células fagocíticas subyacentes a las placas de Peyer constituyen un lugar para la multiplicación primaria de *Listeria* (347,452).

A partir de estos focos primarios de replicación las bacterias, vía linfática y posteriormente por la circulación sanguínea, llegan al hígado y al bazo constituyendo éstos los órganos diana primarios de la infección. En los sinusoides hepáticos son atrapadas por los macrófagos residentes (células de Küpffer), donde la mayoría de las bacterias son destruidas en las primeras 6 horas (114,348) debido a la fusión fagolisosómica y a la explosión oxidativa (495). Un porcentaje variable, dependiendo de la dosis infectiva, es capaz de escapar de los fagolisosomas de las células de Küpffer y replicarse en su citosol.

La fase hepática de la listeriosis es crucial para el posterior desarrollo de la listeriosis. Una de las piedras angulares de la virulencia de *Listeria* es la capacidad para moverse en el interior de las células eucariotas y de pasar directamente de una célula a otra sin entrar en contacto con el medio extracelular, quedando por tanto al abrigo de los efectores humorales del sistema inmune (apartado 1.2.1.; 111,127,289,559). Gracias a esta habilidad, *Listeria*, pasa desde las células de Küpffer a los hepatocitos donde se multiplica activamente. En contra de lo que se venía creyendo, los hepatocitos y no los macrófagos, son el principal lugar de replicación de *Listeria* en el organismo durante las fases tempranas de la infección. La multiplicación masiva de *Listeria* en los hepatocitos acaba destruyéndolos por necrosis o apoptosis, dando lugar a la concomitante liberación de citocinas que reclutan neutrófilos en el foco infeccioso (91,491). Los neutrófilos tienen un papel fundamental en los mecanismos de defensa temprana y resolución del foco infeccioso (492): al fagocitar y destruir los hepatocitos apoptóticos, dejan libres y vulnerables a las bacterias que también serán destruidas por ellos. Otra posible vía de entrada a los hepatocitos puede producirse a partir de las listerias que quedan libres en el espacio extracelular después de haber sido destruidas las células de Küpffer donde se encontraban, mediante fagocitosis inducida.

Las bacterias que logran sobrevivir crecen logarítmicamente durante 2-3 días. Los neutrófilos son sustituidos por monocitos y macrófagos que llegan al foco de infección inducidos por factores quimiotácticos y citocinas tales como, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), gamma-interferón (IFN- $\gamma$ ), CSF (colony-stimulating factor), e interleuquinas (IL-) 1, 4, 6 y 12 (para cuya inducción es necesaria la hemolisina de *L. monocytogenes*; 27,221). La reacción inflamatoria se organiza dando lugar a la formación de granulomas que constituyen la lesión característica de la listeriosis y que forman una auténtica barrera física que frena la progresión del foco infeccioso.

Uno de los mecanismos por los que *Listeria* puede entrar en los macrófagos es dependiente del complemento. Los ácidos teicoicos de la pared celular bacteriana activan su vía alternativa, que da lugar a la deposición del componente C3b sobre la misma y la consiguiente fagocitosis (108). Los macrófagos infectados producen TNF- $\alpha$ , que va a estimular a las células *natural killer* (NK), que a su vez producirán grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , el cual va a activar los mecanismos listericidas de los macrófagos (17). No todos los macrófagos infectados son capaces de destruir a las listerias y se han descrito factores que determinan la actividad listericida de los macrófagos, como el receptor por el cual las listerias son fagocitadas, los niveles de hierro, y la presencia de la IL-10 en la superficie de los macrófagos (revisado en 157). También se ha sugerido que los propios hepatocitos podrían destruir a las listerias tras su estimulación con IFN- $\gamma$  (204).

La resolución de una listeriosis depende de la activación y potenciación de la actividad bactericida de los macrófagos mediada por células T y por la expansión clonal de linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) con actividad bactericida, específicamente dirigidas contra antígenos de *Listeria* tales como la hemolisina (48,238,499,532), y la proteína de superficie p60 (177,178,230). La presentación de los correspondientes epitopos de *Listeria* por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I da lugar a la activación de dichas células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>), esenciales para la destrucción de las células infectadas. La estimulación de las células T CD4<sup>+</sup> por el MHC de clase II también contribuye a la adquisición de resistencia contra la bacteria (279). Ambos mediadores de la respuesta inmune producen a su vez IFN- $\gamma$ , contribuyendo a incrementar la cascada de activación de los macrófagos.

La interacción del sistema inmune con células hepáticas infectadas es crucial para el control de la infección (348,407,442). Si esta respuesta inmune no es suficientemente eficaz (como puede ocurrir en el caso de individuos inmunocomprometidos), las listerias se multiplicarán en el hígado sin restricción. La consecuente destrucción de los hepatocitos origina la liberación de una gran carga bacteriana al torrente circulatorio y una diseminación hematogena a los órganos diana secundarios, fundamentalmente el SNC o la placenta, o la invasión generalizada del organismo, dando lugar a los cuadros clínicos característicos de la listeriosis (201; apartado 1.1.3).

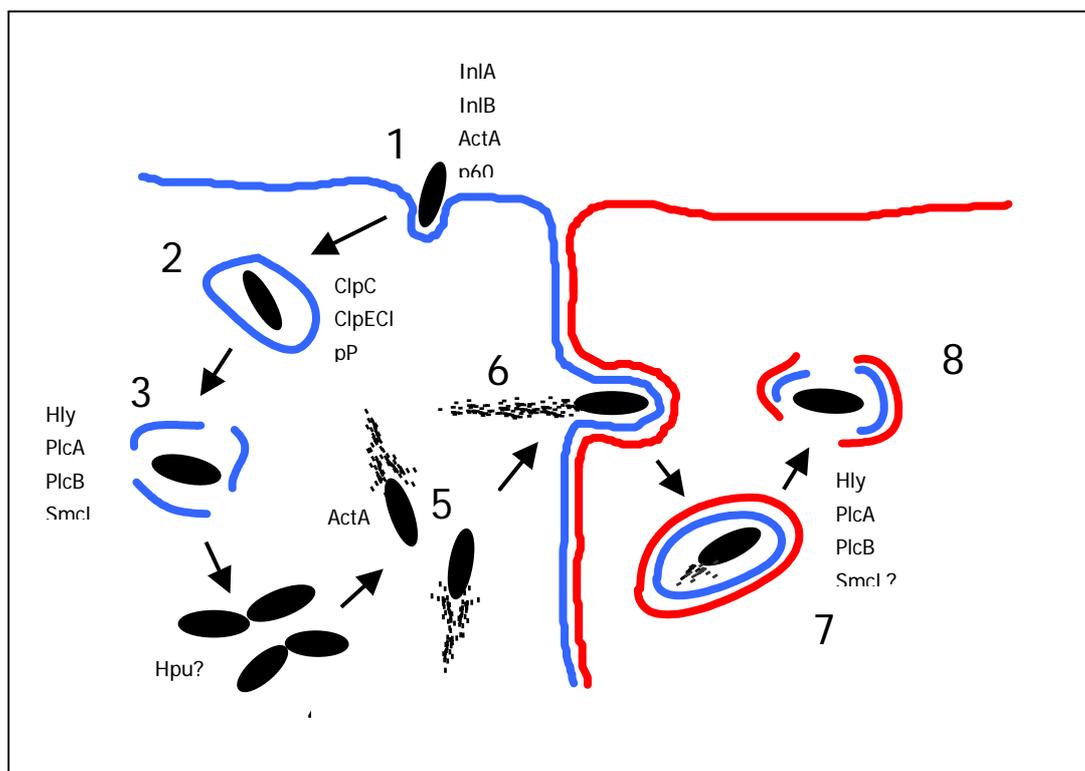
### **1.2.1. Ciclo intracelular de *Listeria*.**

Tanto *L. monocytogenes* como *L. ivanovii* son patógenos intracelulares facultativos capaces no sólo de sobrevivir y multiplicarse en macrófagos de diferentes orígenes sino de invadir activamente distintos tipos celulares no fagocíticos (101,132,170,206,207,337). Esta habilidad de las especies patógenas de *Listeria* de invadir las células no fagocíticas constituye una piedra angular para el éxito de su estilo de vida como parásito intracelular (revisado en 101,253,254). El ciclo de vida intracelular se inicia con la adhesión y posterior invasión de las células hospedadoras. Este proceso implica muy probablemente interacciones específicas ligando-receptor que inducen la estimulación de vías de transducción de señales en la célula eucariota, desencadenando la reorganización del citoesqueleto cortical de actina y la fagocitosis.

Tras su internalización, las listerias quedan confinadas en un fagosoma. Algunos de estos fagosomas se fusionan con lisosomas y las bacterias son destruidas. Sin embargo, un porcentaje significativo de listerias escapa del compartimento vacuolar mediante la disrupción de la membrana fagosómica. Una vez libre en el citoplasma, las bacterias se multiplican activamente. Al mismo tiempo, inician un proceso de motilidad intracelular subvirtiendo nuevamente la funcionalidad del citoesqueleto de actina de la célula hospedadora. La polimerización de actina en uno de los polos de la bacteria es utilizada como fuerza de propulsión, generando un movimiento bacteriano aleatorio en el citoplasma. Este movimiento permite que algunas alcancen la

periferia de la célula infectada. Allí, las listerias entran en contacto con la cara interna de la membrana celular, haciendo protrusión hacia la célula colindante en evaginaciones citoplásmicas que contienen en su extremo apical una bacteria. Estas estructuras son fagocitadas por las células vecinas y las bacterias quedan englobadas en fagosomas secundarios de doble membrana (Fig. 1.1). Las listerias son nuevamente capaces de lisar este compartimento vacuolar y escapar al citoplasma, iniciando así un nuevo ciclo de multiplicación y propagación.

Mediante este elegante mecanismo las listerias patógenas pueden diseminarse entre diferentes células y tejidos del hospedador infectado sin verse expuestas a los efectores humorales del sistema inmune del medio extracelular.



**Figura 1.1.** Representación esquemática del ciclo de infección celular de las especies patógenas de *Listeria*. Se indican los factores de virulencia que intervienen en cada etapa del proceso (texto). 1, Adhesión e invasión a la célula hospedadora; 2, inclusión y supervivencia en el fagosoma; 3, lisis de la vacuola fagocítica y liberación de la bacteria al citoplasma; 4, multiplicación en el citosol y reclutamiento de actina; 5, movimiento intracelular de *Listeria* mediado por la polimerización de F-actina; 6, protrusión hacia la célula vecina; 7, supervivencia en fagosomas secundarios (doble membrana); 8, ruptura de la doble membrana, liberación al citoplasma, y consiguiente repetición del ciclo.

## 1.2.2. Determinantes moleculares del parasitismo intracelular de *Listeria*.

Desde la publicación de los primeros trabajos de caracterización de los determinantes de patogenicidad, en la década de los ochenta (170,215,578), se han identificado y caracterizado varios factores de virulencia fundamentales para explicar el ciclo de vida intracelular de *Listeria*.

La mayor parte de los estudios genéticos se han llevado a cabo en *L. monocytogenes*. Sin embargo, el ciclo de vida intracelular de *L. ivanovii* es, básicamente análogo e implica esencialmente a los mismos factores de virulencia.

**Invasión celular.** El mecanismo de entrada de *Listeria*, es similar al de *Yersinia* y se ha descrito como un evento de tipo “cremallera” o “zipper”, caracterizado por un progresivo involucramiento del microorganismo por una membrana plasmática en estrecho contacto con la superficie bacteriana, gracias a una reorganización en el citoesqueleto de actina (101,153,254). Este proceso es claramente distinto del mecanismo desencadenado por *Salmonella* o *Shigella* durante su entrada, denominado de “disparo” o “trigger” y implica una dramática reorganización del citoesqueleto y cambios espectacularmente dinámicos en la membrana plasmática que recuerdan a las implicadas en la macropinocitosis y que literalmente atrapan a la bacteria (152,258,376,550).

La entrada de *Listeria* en células eucariotas está mediada por, al menos, dos proteínas de superficie de la familia de las internalinas que participan directamente en el proceso de invasión en cultivos celulares: InIA (o internalina propiamente dicha) codificada por el gen *inIA*, y responsable de la invasión de líneas de células epiteliales intestinales humanas (Caco-2) (132,169), e InIB, codificada por *inIB*, que media la entrada en líneas celulares de hepatocitos (53,132) así como en algunas líneas de fibroblastos y células epiteliales de distintos orígenes: HeLa, HEp-2, CHO, L2 y Vero (53,256,421).

La E-caderina de origen humano es el receptor celular de InIA. Se trata de una glicoproteína implicada en la adhesión intercelular dependiente de calcio que se expresa específicamente en los tejidos epiteliales, esencialmente en piel, hígado, tracto digestivo y plexo coroideo (376). Asimismo, se ha identificado el receptor de las cabezas globulares del componente C1q del complemento (gC1q-R) como receptor de InIB en las células eucariotas (51).

La entrada mediada por InIB implica una activación de la fosfoinositol-3 quinasa (PI-3K) p85/p110. Esta activación requiere una fosforilación de tirosinas de proteínas de la célula hospedadora tales como Gab1, Cbl y Shc (255) y la asociación de p85 con al menos una de ellas. El mecanismo por el cual la PI-3K media el proceso de invasión se desconoce, aunque es posible que esté implicada en el control de la polimerización de filamentos de actina, como en el caso de las plaquetas (153,229). La participación de quinasas de la célula hospedadora en la invasión bacteriana implica la existencia de una estrecha comunicación entre la bacteria y la célula eucariota.

Los miembros de la familia de las internalinas, cuyo prototipo estructural es InIA, se caracterizan por poseer una secuencia señal, dos regiones diferentes de repeticiones con una

región muy conservada entre ambas, y un dominio C-terminal responsable de su unión covalente con el péptidoglicano bacteriano (155,169). La primera región de repeticiones está formada por un número variable de unidades repetidas de 22 aminoácidos (aa) ricas en leucina (LRR's *leucine rich repeats*) con la secuencia consenso -L--L-L--N-L-DI--L--L- (donde "--" equivale a cualquier aa). El motivo LRR está implicado en interacciones proteína-proteína (288). La estructura de anclaje a la pared bacteriana está compuesta por un pentapéptido consenso LPXTG (donde "X" equivale a cualquier aa), seguido por una secuencia hidrofóbica y residuos con carga positiva (135,155,169). InIB, es la única internalina que no presenta este dominio de unión a la pared bacteriana. Se ha demostrado que los últimos 231 aa son necesarios y suficientes para su ensamblaje a la pared (50). Esta región de anclaje está formada por repeticiones de 80 aa, comenzando siempre por glicina y triptofano (GW) (Fig. 1.4). Estructuras similares se han identificado en una bacteriolisina de superficie de *L. monocytogenes*, Ami, y en la lisostafina de *Staphylococcus simulans* (50,464).

Se han identificado en *L. monocytogenes* nuevos miembros pertenecientes a esta familia de internalinas: InIC2,D,E,F,G,H que comparten el patrón estructural prototipo de InIA. Estas internalinas se encuentran codificadas en genes localizados en tres loci (*inIC2,G,H*; *inIG,H,E* e *inIF*; apartado 1.3.2 y Fig. 1.4). Los dos loci que contienen tres internalinas corresponden a un único islote de internalinas que ha evolucionado de forma diferente en dos aislados de la cepa EGD (apartado 1.3.2) (134,456).

Recientemente se ha descrito una serie de proteínas: InIC (IrpA) en *L. monocytogenes* e i-InIC,D,E,F en *L. ivanovii*, (128,142,144,299,336), que poseen una estructura relacionada con las internalinas pero con un tamaño mucho menor y ausencia de estructuras de anclaje a la pared bacteriana (apartado 3.3.1 para más detalles).

Se han diferenciado, por tanto, dos subfamilias dentro de las internalinas: (i) internalinas de gran tamaño, secretadas y ancladas en la pared celular, cuyo prototipo es InIA, descritas por el momento tan sólo en *L. monocytogenes*; (ii) internalinas de pequeño tamaño, secretadas y sin estructuras de anclaje a la pared bacteriana, con función desconocida, cuyo prototipo es InIC, y que se encuentran presentes fundamentalmente en *L. ivanovii*.

La función de las internalinas en la virulencia, utilizando el modelo murino, no está clara. El papel de InIA en la supervivencia *in vivo* no ha podido ser demostrada todavía (132,135,337), e InIB parece tener un pequeño aunque significativo papel en la virulencia (132,135,337). La delección del cluster *inIG,H,E* presente en una de las cepas de EGD no afecta al fenotipo invasivo de *Listeria* en distintas líneas celulares de mamíferos, sugiriendo que estas internalinas, a diferencia de InIA e InIB, no están implicadas en la invasión. Sin embargo, se ha descrito una disminución de la supervivencia en hígado y bazo de los mutantes  $\Delta inIG,H,E$  con respecto a su cepa parental, indicando un papel importante de este cluster de internalinas en la colonización de tejidos *in vivo* (456). La delección del locus *inIC2,D,E*, homólogo a *inIG,H,E* y el locus adicional *inIF* identificados en la segunda cepa de EGD tampoco permite observar diferencias en la entrada de *Listeria* en diversas líneas celulares, además, la ausencia de estos loci no afecta a los recuentos bacterianos en hígado y bazo de origen murino (134). Teniendo en cuenta estos resultados junto con la existencia de genes homólogos a las internalinas en especies no patógenas como *L. innocua* (169), cobra fuerza la hipótesis de que los miembros

de esta familia multigénica poseen funciones biológicas no exclusivamente relacionadas con la virulencia.

Sin embargo, las internalinas de pequeño tamaño y secretadas, tanto de *L. monocytogenes* como de *L. ivanovii*, sí parecen tener un papel importante en la virulencia *in vivo* (128,143,144). Si bien su función aún no se ha determinado, no parecen estar implicadas en el fenómeno de invasión. *inIC* se expresa preferentemente en el citoplasma de las células hospedadoras durante las últimas fases del ciclo de vida intracelular cuando la bacteria se encuentra en la fase de paso de célula a célula (véase más adelante) (65,142). Estos resultados sugieren que *InIC* podría estar implicada en la diseminación de la infección. Sin embargo, la diseminación intercelular no se ha visto afectada en los estudios realizados con un mutante  $\Delta inIC$  (128,142,206). No obstante, las posibles funciones en patogénesis de las proteínas pertenecientes a la familia de las internalinas deberán ser estudiadas en modelos animales alternativos al murino, en los que se pueda reproducir una listeriosis análoga a la que se produce en los hospedadores habituales, ya que es muy probable que estén implicadas en un tropismo de hospedador (254,325).

Un hito fundamental en el conocimiento de la función de *InIA* ha sido el reciente descubrimiento por Lecuit *et al.* (325) de que el residuo de Prolina localizado en la posición 16 de la E-cadherina es crítico para la interacción con *InIA*. Así, la existencia de Pro16 en la E-cadherina está correlacionada con la permisividad de invasión dependiente de *InIA* de las células hospedadoras. De tal manera que, aquellas células que expresan la E-cadherina de origen murino o de ratas, ambas con un residuo Glu en posición 16, no permiten la entrada dependiente de *InIA*. Sin embargo, las células que expresan E-cadherina de origen humano o de cobayas, con Pro16, son susceptibles de ser invadidas por bacterias que expresan *InIA*. Además, la sustitución Pro16→Glu en la E-cadherina humana impide la interacción con *InIA* mientras que el reemplazo de Glu16 por una Pro en la E-cadherina murina le confiere la capacidad de interactuar con *InIA* (325). Estos hechos constituyen las primeras evidencias experimentales en identificar una posible base molecular de la especificidad de hospedador que presenta un patógeno bacteriano. Estos resultados constituyen sólidos argumentos para cuestionar la idoneidad del modelo murino, que es y ha sido, profusamente utilizado en el estudio de la inmunobiología de la infección por *Listeria* y en investigaciones sobre patogénesis de *Listeria*. Por lo que parece necesaria una reevaluación de la información experimental disponible sobre el papel en la virulencia de, al menos, *InIA* e *InIB* utilizando un modelo animal más adecuado. Recientemente se ha propuesto el cobaya como modelo animal de elección para futuros estudios *in vivo* (325).

El papel en la adhesión e invasión de la proteína de superficie p60, codificada por el gen *iap*, y presente en todas las especies del género *Listeria* es, por el momento, incierto (305). Sin embargo, se ha relacionado un defecto en la producción de la proteína de 60 kDa tanto en el sobrenadante de cultivo (305) como asociada a la pared celular (498), con una disminución en la virulencia (246). Además, este descenso de la virulencia está relacionada con una reducción de la invasividad, particularmente en fibroblastos (305). Existen evidencias experimentales que implican a p60 en la invasión intestinal y en la supervivencia *in vivo* (239,241). Además, un reciente estudio ha mostrado, empleando p60 recombinante de *L. monocytogenes*, la unión específica que presenta esta proteína a células intestinales Caco-2

(422). Sin embargo, resulta extremadamente difícil determinar el preciso papel que tiene p60 en la virulencia ya que, debido a la actividad murein hidrolasa de p60, esencial para la viabilidad celular, los mutantes en *iap* son letales (599).

Recientemente se ha demostrado que otra proteína de superficie, ActA, responsable en la polimerización de actina (véase más adelante), interviene en la interacción de *L. monocytogenes* con la célula hospedadora, constituyendo posiblemente un ligando en el reconocimiento específico de los receptores de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) de la célula eucariota (7).

**Supervivencia intrafagosomal y evasión del fagosoma.** A consecuencia de su internalización, la bacteria queda englobada en un fagosoma durante aproximadamente 30 minutos en el caso de *L. monocytogenes* y una hora en *L. ivanovii* (272). Este fagosoma se acidifica rápidamente por medio de bombas ATPasas de protones (371). La supervivencia bacteriana y su posterior multiplicación en el citosol van a ser el resultado de una competición entre la fusión fagosoma-lisosoma y la explosión oxidativa de las células hospedadoras, que llevaría a la expresión de la actividad bactericida producida por la transferencia de enzimas hidrolíticas a los fagosomas, y la capacidad de las bacterias virulentas para escapar de este compartimento ácido antes de que se produzca dicha fusión (114).

*Listeria* es capaz de lisar la membrana fagosómica gracias, fundamentalmente, a una potente toxina formadora de poros, la listeriolisina O (LLO) codificada por el gen *hly* (181,378,578) en el caso de *L. monocytogenes*, o ivanolisina O (ILO), codificada por el gen *ilo* (215,300,571), en *L. ivanovii*.

La actividad de las proteínas citolíticas se evalúa habitualmente por su capacidad para lisar eritrocitos, de ahí que se denominen hemolisinas. Ambas citolisinas pertenecen al numeroso grupo de las toxinas colesterol-dependientes (tiol-activadas) formadoras de poros y cuyo prototipo es la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes* (536). Estas toxinas están producidas por varios géneros de bacterias Gram positivas cercanas filogenéticamente a *Listeria* (*Streptococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*) (373,378). De éstas, únicamente LLO de *L. monocytogenes* e ILO de *L. ivanovii* están producidas por patógenos intracelulares. Contrariamente al resto de las toxinas tiol-activadas, ILO y LLO presentan una actividad máxima a pH ácido (181,300,571), lo que puede ser especialmente importante para su acción en un ambiente fagosómico ácido. Y, lo que es más interesante, se ha visto que LLO muestra una actividad nula a pH neutro, lo que serviría para evitar el efecto lítico de estas toxinas en las membranas celulares cuando las bacterias son liberadas al citosol, con pH neutro. Experimentos realizados en *Bacillus* mostraron que tanto LLO como la perfringolisina O (PFO), toxina muy similar a LLO y producida por *Clostridium perfringens*, conferían a *Bacillus* la capacidad de escapar del fagosoma (32,443). Sin embargo, a diferencia de LLO, PFO ejercía también un efecto citotóxico sobre la célula hospedadora debido a que su pH óptimo es básico y tiene una vida media más prolongada en el citoplasma de la célula (264,265,443). Mediante la selección de mutantes de *L. monocytogenes* que, expresando el gen *pfo*, eran capaces de proliferar normalmente en el citosol intracelular, se han identificado mutaciones en la PFO que mantienen la propiedad de mediar la lisis de la membrana vacuolar pero son deficientes en provocar un efecto tóxico en las células hospedadoras (265). Un tipo de mutaciones acortaba la vida media citoplasmática de la toxina mientras que un segundo grupo de mutaciones

modificaban el pH óptimo de PFO, volviéndolo similar al que presenta LLO (265). LLO proporciona pues un elegante ejemplo de adaptación molecular evolutiva en el que *Listeria* ha sido capaz de desarrollar una toxina que, gracias a su bajo pH óptimo, tiene una actividad restringida al compartimento fagosómico, protegiendo así a la célula hospedadora de cualquier efecto citotóxico.

Por otro lado, la función de la hemolisina no está restringida a la lisis del fagosoma sino que aparece como un factor de virulencia multifuncional con importantes funciones en la interacción parásito-hospedador. De tal manera que la exposición exógena y endógena a esta toxina puede inducir numerosas respuestas en las células hospedadoras tales como: proliferación celular en fibroblastos transfectados (118); activación de la ruta de Raf-Mek-MAP kinasas en células epiteliales (494,589,553), inducción de exocitosis mucosa en células intestinales (88); modulación de la internalización vía señalización de calcio (582); expresión de citoquinas en macrófagos (307,404), degranulación y formación de leucotrienos en neutrófilos (531); inducción de apoptosis en células dendríticas (213); generación de mediadores lipídicos (530); activación de NF- $\kappa$ B (280) y contribuir a la inducción de la expresión de moléculas de adhesión celulares en células endoteliales infectadas (280,304,122)

La hemolisina juega también un papel crucial en la respuesta inmune protectora frente a la infección por *L. monocytogenes* desde dos vías fundamentalmente. La primera, favoreciendo la liberación y posterior proliferación de las bacterias en el citosol, esencial para la presentación de antígenos de *Listeria* asociados al MHC de clase I y la inducción de la respuesta protectora de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (27,18,63,244,243). La segunda, la hemolisina es el principal antígeno reconocido por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> durante la infección de *Listeria* (29,48,0,499,532). Por último, recientemente Edelson et al. (38) han cuestionado el viejo paradigma de que la única respuesta protectora frente a los parásitos intracelulares es la inmunidad de base celular (279), demostrando que anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-LLO incrementan la resistencia a la infección del ratón por *Listeria*. Por lo que es probable que la respuesta del sistema inmune de tipo humoral está implicada en la protección frente a *L. monocytogenes* y la LLO juega un papel clave.

Mutantes incapaces de producir LLO o ILO son completamente avirulentos en el modelo murino, y prácticamente incapaces de evadirse del fagosoma, lo que demuestra que la salida de la bacteria hacia el citosol es un paso crítico para el establecimiento de la infección (32,168,441). No obstante, mutantes impedidos en la producción de LLO/ILO aún mantienen cierta capacidad para proliferar en determinadas células epiteliales, como Henle407, o fibroblastos murinos (272,441,548). Estas observaciones sugirieron que podría haber otros factores implicados en la lisis de las membranas fagosómicas. Se ha demostrado en *L. monocytogenes* que la acción de las hemolisinas de *Listeria* se ve reforzada por la interacción sinérgica de dos fosfolipasas (360,535); una fosfatidilinositol fosfolipasa C específica, PlcA (74,517), codificada por el gen *plcA* (*iplcA* en *L. ivanovii*) (200,314,329,372) y una fosfolipasa C de amplio espectro de actuación (PlcB, conocida como lecitinasa) (182), codificada por *plcB* (*iplcB* en *L. ivanovii*) (200,301,574). Recientemente se ha caracterizado una nueva fosfolipasa C específica de *L. ivanovii*, la esfingomielinasa C (SmcL) codificada por *smcL* (196).

Las primeras evidencias experimentales que asignaban a las fosfolipasas (PLCs) un papel en la disrupción de membranas fagosómicas se obtuvieron mediante mutagénesis en el operón de la lecitinasa (apartado 1.3.1) de *L. monocytogenes*. De tal manera que, mutantes en *plcB*, formaban placas de lisis más pequeñas en cultivos monocapas de macrófagos J774 y permanecían retenidos en las vacuolas de doble membrana (574). Esto indicaba que PlcB jugaba un importante papel en la lisis eficiente de los fagosomas secundarios formados durante tras el paso de célula a célula de *Listeria* (Fig. 1.1). Utilizando mutantes deficientes en *Hly*, se ha mostrado que PlcB participa en la lisis efectiva de las vacuolas primarias en células Henle 407 (360). Recientemente se ha descrito una implicación de PlcB en la proliferación intercelular desde macrófagos a diferentes tipos celulares de mamíferos incluyendo células endoteliales de microcapilares cerebrales (206) así como en la proliferación en tejido cerebral murino *in vivo* (53). Estos datos proporcionan evidencias experimentales para asignar un papel fundamental a PlcB en el paso de célula a célula en la fisiopatogénesis *in vivo* de *Listeria*.

Cepas deficientes en la expresión de *plcA* fueron inicialmente aisladas durante la búsqueda de determinantes moleculares implicados en el paso de célula a célula en una librería de mutantes obtenidos mediante transposición (73,548). Los mutantes por inserción en *plcA*, presentaban una drástica reducción de su virulencia en el modelo murino, fracasaban en su supervivencia en órganos de ratón y eran incapaces de proliferar en macrófagos (73). Sin embargo, esta severa deficiencia en su virulencia se debía a un efecto polar sobre el gen situado en su extremo 5', *prfA*, que codifica el activador transcripcional de los genes de virulencia de *Listeria* con el que *plcA* se cotranscribe (apartado 1.3.3). Estudios posteriores con mutantes en fase de *plcA*, han revelado una pequeña reducción de la virulencia *in vivo* y ligera disminución en la habilidad de escapar del fagosoma primario en macrófagos de origen murino (74). El análisis comparado del comportamiento de los mutantes obtenidos por delección simple y doble en *plcA*, *plcB* y *hly*, en ratones y en infecciones de cultivos celulares, indican que PlcA juega un papel individual menor en la virulencia, pero actúa sinérgicamente con PlcB (que a su vez también muestra un papel accesorio en la virulencia) para conseguir, junto a LLO, niveles óptimos de escape de los fagosomas primarios y secundarios (360,535).

Recientes evidencias experimentales indican que SmcL de *L. ivanovii* juega también un papel accesorio en la patogénesis, similar a PlcA y PlcB. La falta de producción de SmcL en *L. ivanovii* se traduce en un moderado descenso en la virulencia así como en una disminución en el crecimiento intracelular en células epiteliales bovinas. La complementación en *trans* con *smcL* facilita la supervivencia intracelular de especies no patógenas como *L. innocua* en macrófagos, y confiere a un mutante de *L. monocytogenes* al que se le ha delecionado *actA* (véase más abajo) y los determinantes de virulencia conocidos implicados en la alteración de membranas (*hly*, *plcA*, *plcB/mpl*), la habilidad de proliferar en células epiteliales. Estudios de microscopía electrónica de estas células muestra como SmcL media la disrupción de las vacuolas primarias y la liberación de las bacterias al citosol (53,196).

Además de las funciones de escape del fagosoma, las PLCs de *Listeria*, pueden también jugar un importante papel en la patogénesis subvirtiéndolo las vías de señalización de la célula hospedadora mediadas por los productos de la hidrólisis de los fosfolípidos tales como el diacilglicerol (DAG), ceramida (CER) e inositol fosfato. Estos metabolitos lipídicos regulan procesos celulares claves, entre los que se incluye la diferenciación y proliferación celular, la apoptosis y la síntesis de citoquinas y quimoquinas (53,516). Existen algunas evidencias

experimentales apoyando este sutil papel de las PLCs de *Listeria*. Así, se ha observado que altos niveles lipídicos se transforman en una acumulación de DAG y CER a las 3 ó 4 horas postinfección de macrófagos J774 (535). Se ha sugerido una implicación de las PLCs bacterianas en esta actividad ya que células infectadas con mutantes  $\Delta plcA$  y  $\Delta plcB$  presentaban menores incrementos en los niveles de los mediadores DAG y CER (535). Sin embargo, un mutante doble  $\Delta(plcA, plcB)$  continúa induciendo la generación de DAG y CER (535), indicando la participación de fosfolipasas endógenas en esta respuesta de las células hospedadoras. Asimismo, se ha mostrado la implicación de las fosfolipasas PlcA y PlcB en la activación persistente de NF- $\kappa$ B en macrófagos P3888D<sub>1</sub> (53) y en la inducción de CER asociada a la activación de NF- $\kappa$ B. No se ha podido comprobar si la liberación de mensajeros lipídicos es mediada por la acción directa de las PLCs bacterianas sobre los fosfolípidos de las membranas, o se produce como resultado de un efecto indirecto gobernado por las fosfolipasas endógenas estimuladas indirectamente por las vías relacionadas con el escape del fagosoma. Sin embargo, existen evidencias indicando que las *Listerias* patógenas pueden modular y adaptar las respuestas inflamatorias de las células y tejidos hospedadores a sus necesidades, mediante la generación de mensajeros lipídicos secundarios.

La supervivencia de *Listeria* en el interior de las vacuolas fagocíticas implica una respuesta adaptada a las condiciones estresantes y hostiles del medio intrafagosómico, mediada por un conjunto de proteínas conservadas que se producen en condiciones ambientales hostiles. Estas proteínas pueden ser chaperonas que asisten en el correcto plegamiento o ensamblaje de proteínas dañadas en situaciones de estrés o proteasas que degradan las proteínas alteradas, asegurando así una correcta función de las rutas fisiológicas esenciales en condiciones de estrés (198). Se ha descrito un nuevo grupo de mediadores de estrés asociados con la virulencia implicados en la supervivencia intravacuolar y el posterior escape hacia el citoplasma en *L. monocytogenes*. Una de estas proteínas de estrés es una ClpC-ATPasa perteneciente a la familia HSP-100/Clp, una clase de proteínas altamente conservadas e implicadas en la tolerancia al estrés en numerosos organismos tanto eucariotas como procariotas (508,541,587). El locus que codifica ClpC, *clpC*, fue identificado mediante mutagénesis por transposición por Rouquette *et al.* (497). *clpC* se encuentra sobreexpresado en condiciones de choque térmico (42°C) y durante la fase estacionaria de crecimiento, lo que coincide con un patrón de inducción general en condiciones de estrés (472). Mutantes en *clpC* presentan una significativa reducción de su virulencia. El estudio de estos mutantes mediante microscopía electrónica permitió comprobar que permanecían confinados dentro de las vacuolas fagosómicas, indicando que, bien ClpC estaba implicado en la lisis de las membranas fagosómicas (496), o, con mayor probabilidad la pérdida de ClpC compromete la supervivencia intrafagosómica de *Listeria*, impidiendo la producción de cantidades suficientes de factores de virulencia con actividad membrano-lítica.

Más recientemente, se han identificado proteínas adicionales (ClpE y ClpP) inducidas por estrés e importantes en la patogénesis (393,394). ClpE es, como ClpC, un nuevo miembro de la familia de proteínas de estrés HSP100, igualmente, se requiere para la supervivencia prolongada a 42°C y está implicado en la virulencia de *L. monocytogenes*. ClpP, pertenece a una familia de proteasas de estrés altamente conservadas en procariotas y eucariotas (172). Un mutante de delección en *clpP* presenta una supervivencia disminuida en macrófagos y una reducción de su virulencia en el ratón. ClpC, ClpE y ClpP están regulados negativamente por

CtsR, homólogo al represor CtsR de genes de respuesta al estrés en *B. subtilis*. CtsR de *L. monocytogenes*, está codificado en el primer gen del operón que incluye *clpC*, *clpE* y *clpP* (497).

**Vida intracelular y motilidad intra e intercelular.** Inmediatamente después de liberarse en el citosol, *Listeria*, comienza a dividirse activamente con un tiempo de generación semejante al que presenta en un medio de cultivo rico como el BHI (92,170,548). En un principio, se pensaba que el citosol era un medio particularmente rico y permisivo para la multiplicación bacteriana ya que incluso mutantes auxótrofos son capaces de crecer sin restricciones en él (359). Sin embargo, este concepto ha sido recientemente desterrado (179,443). De hecho, sólo un reducido número de patógenos bacterianos, como *Listeria*, *Rickettsia*, *Shigella* o *E. coli* enteroinvasivo, han elegido el citoplasma como lugar de multiplicación en los tejidos del hospedador (revisado en 188), lo cual sugiere que la proliferación en dicho hábitat requiere adaptaciones precisas por parte del agente patógeno.

Nuestro grupo ha presentado evidencias de la existencia de un nuevo factor, la capacidad para utilizar la glucosa-1-fosfato (G-1-P), probablemente implicado en la adaptación de las dos especies patógenas del género *Listeria* a las condiciones del medio citoplásmico. Esta hexosa fosfato proporcionaría al patógeno intracelular una fuente de carbono y fosfato fácilmente metabolizables, propiciando su rápido crecimiento en el citoplasma celular (471). Recientemente hemos descubierto el determinante genético implicado en la utilización de G-1-P. Se trata del gen *hpu*, (*hexose phosphate uptake*) que codifica una permeasa (Hpu) independiente de fosfoenolpiruvato (PTS), transportadora de hexosas fosfato (85,471).

La división de *Listeria* va asociada a la formación de una densa nube de actina que la rodea (559). Asociada con la replicación bacteriana se va a producir una redistribución de los filamentos de actina concentrándose en uno de los polos de la bacteria (290). Posteriormente se produce una polimerización continua de actina en dicho polo, lo que mediante un mecanismo similar al de los cohetes, propulsa a las bacterias por el citoplasma. La proteína necesaria y suficiente para inducir esta polimerización de actina y el posterior movimiento intracitoplásmico de *Listeria* es ActA en *L. monocytogenes* (127,289) e iActA en *L. ivanovii* (183,199,301). Se trata de una proteína de superficie con un péptido señal en su extremo N-terminal y una región hidrofóbica en su extremo C-terminal que le permite anclarse a la membrana bacteriana.

Aunque en el resto de los factores de virulencia descritos hasta ahora e implicados en las distintas fases del ciclo de vida intracelular, ambas especies comparten un alto grado de identidad (Hly 80% (215), PlcA 68% y PrfA 77% (314)), entre ActA e iActA no existe más que un 34% de identidad comparando el conjunto de su secuencia aminoacídica. Sin embargo, poseen una misma funcionalidad y, muy probablemente, un mecanismo de acción análogo (183,199,254,301).

ActA puede artificialmente dividirse en tres partes: un dominio N-terminal cargado positivamente, un dominio central caracterizado por presentar repeticiones ricas en prolinas, y una región C-terminal. Recientes comparaciones de secuencias aminoacídicas sugieren que ActA podría ser una proteína compuesta (101,318). La región de repeticiones de prolinas y el dominio C-terminal comparten una similitud significativa con zyxin, una proteína humana

relacionada con la interacción con microfilamentos de actina (194). El dominio N-terminal de ActA es similar (25% identidad) a la región C-terminal de la vinculina, proteína recientemente descrita como capaz de unirse a la actina a través de esta región (186,318). Por tanto, ActA posee dominios similares a distintas proteínas eucariotas implicadas en la organización del citoesqueleto.

Estudios genéticos han revelado que el extremo amino terminal de ActA es necesario y suficiente para el movimiento y la polimerización de actina, la región central rica en prolinas incrementa la eficiencia del proceso, mientras el extremo C-terminal no juega, aparentemente, ningún papel salvo el de motivo de anclaje a la superficie bacteriana (80,318,320).

Los intentos iniciales para demostrar una interacción entre ActA y actina fallaron sugiriendo que ActA podría sufrir modificaciones en el interior del hospedador o reclutar proteínas celulares para interactuar con la actina, o cumplir ambas hipótesis. ActA purificada se une a VASP, una proteína celular asociada con microfilamentos y que se adhiere a la profilina, una pequeña proteína con capacidad para unirse a monómeros de actina globular (G-actina) y que juega un papel crítico en el control del ensamblaje celular de actina (80,318,320). Por tanto, VASP, podría poner en contacto con la bacteria complejos profilina-actina preparados para ser polimerizados. Sin embargo, en las células infectadas, VASP se une a la zona rica en prolinas de ActA, dominio considerado como no absolutamente esencial en el proceso de polimerización (401).

Todas estas consideraciones han llevado a sugerir un modelo para explicar la función de ActA en el movimiento de *Listeria* (254,318). En este modelo, la región central rica en prolinas de ActA (389) se une a VASP (80) que desde la parte central de ActA proporciona complejos profilina-actina susceptibles a ser utilizados para elongar los extremos abiertos libres de los filamentos de actina, en el extremo N-terminal de ActA. Recientemente se ha descrito al complejo proteico humano Arp2/3 como el nexo responsable de interactuar con el extremo N-terminal de ActA y provocar la nucleación de actina (590,591). Los filamentos de actina están protegidos por el extremo N-terminal de ActA de las proteínas bloqueadoras. El movimiento se crea en tres etapas, que ocurren simultáneamente en la bacteria: (i) generación de extremos abiertos libres, bien por nucleación (ensamblaje de monómeros de actina), ruptura o desbloqueo de filamentos preexistentes; (ii) adición de monómeros de actina y movimiento; (iii) continua liberación, bloqueo e interacción de los filamentos y generación de nuevos extremos abiertos libres. El balance entre estos dos últimos fenómenos es lo que produce una continuidad en el movimiento.

Este fenómeno de motilidad por polimerización de actina permite a *Listeria* alcanzar la membrana plasmática de la célula infectada. El propio movimiento de las bacterias las impulsa al exterior englobándolas en evaginaciones, que serán fagocitadas por las células vecinas (289). Como consecuencia de ello, las bacterias quedan atrapadas en una vacuola rodeada por una doble membrana, la interna constituida por la membrana citoplásmica de la primera célula y la externa por la membrana de la nueva célula invadida. En la salida de este fagosoma secundario, la PlcB/lecitinasa juega un papel fundamental (272,574). Estudios de microscopía electrónica basados en el análisis de mutantes de inserción en el gen de la lecitinasa permitieron comprobar que permanecían retenidos en las vacuolas de doble membrana, con lo que se demostró la participación de PlcB en el fenómeno de paso directo de célula a célula al

promover la salida del fagosoma secundario (574). No obstante, una pequeña parte era capaz de evadirse de este segundo fagosoma. Posteriores estudios, en los que se analizó el comportamiento de mutantes delecionados en cada una de las fosfolipasas y en Hly de *L. monocytogenes*, demostraron la implicación de PlcA y Hly, junto con PlcB, en esta fase del proceso de infección (535). Ambas fosfolipasas, por lo tanto, tienen funciones sinérgicas en la virulencia de *Listeria* (apartado de evasión del fagosoma).

Una vez liberada en el citoplasma de la nueva célula infectada, el ciclo se repite dando lugar a la diseminación de *Listeria* por los tejidos del hospedador. La capacidad de subvertir el citoesqueleto de las células infectadas para lograr un movimiento intra- e intercelular (111,127,289,559) permite a *Listeria* propagarse por los tejidos del hospedador, eludiendo el contacto con el medio extracelular y los efectores humorales de la respuesta inmune (222). Esta elegante estrategia explicaría porqué los anticuerpos prácticamente no intervienen en la eliminación de este patógeno tras la infección ni en la protección frente a infecciones secundarias por *Listeria*, siendo la respuesta inmunitaria de tipo celular, estrictamente dependiente de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, la única eficaz (279).

### **1.3. Organización genética y evolución de los determinantes de virulencia de *Listeria*.**

En la mayor parte de las bacterias patógenas, la virulencia es un proceso multifactorial que requiere dos clases generales de determinantes genéticos. La primera incluye genes responsables de procesos fisiológicos necesarios para la supervivencia del patógeno tanto en el hospedador como en el medio ambiente del exterior. El segundo grupo incluye los genes de virulencia propiamente dichos, que son aquellos característicos y exclusivos de los microorganismos patógenos que han evolucionado específicamente para interactuar con el hospedador y no son necesarios para la vida saprofita en otros ambientes. Gran parte de estos genes de virulencia se encuentran organizados en regiones concretas del cromosoma denominadas, en función de su tamaño, islas o islotes de patogenicidad. Estas unidades genéticas son responsable de una determinada función de virulencia en el complejo proceso de patogénesis (42,208,218,220).

El genoma de *Listeria*, como se ha ido describiendo recientemente para otras bacterias (105,151,209,216,270), sería muy probablemente el resultado de un mosaico genético en el que las piezas estarían formadas por diferentes fragmentos de DNA adquiridos por transferencia horizontal de otras bacterias, fundamentalmente de Gram-positivos, y cuya fuerza motora sería la evolución para adaptarse y obtener ventajas selectivas en los diferentes ambientes en los que se puedan encontrar. El análisis comparativo de la secuencia de los genomas de distintas especies del género *Listeria*, actualmente en marcha, contribuirá de forma definitiva a la caracterización de las islas e islotes de patogenicidad responsables de caracteres genéricos de virulencia de estas bacterias, así como a la heterogeneidad patogénica de las especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* y los posibles patovares dentro de éstas.

En las dos especies patógenas del género *Listeria*, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, la mayoría de los determinantes de virulencia descritos en los apartados anteriores e implicados en la supervivencia intracelular y en el paso de célula a célula, se organizan de forma similar y se encuentran agrupados en una isla cromosómica de 9,5 kb, denominada región central de virulencia (200,215,314,440,394).

### 1.3.1. Región *hly* de virulencia.

Este fragmento cromosómico se encuentra enmarcado por el gen metabólico *prs* (que codifica una 5-fosfo-D-ribosil-1-pirofosfato sintetasa) en su extremo izquierdo (200) y *orfB* (que codifica una proteína de 110 aa con ortólogos en numerosas especies bacterianas todos ellos con funciones, por el momento, desconocidas) en su extremo derecho (574) (Fig. 1.2). Si bien *prs* se encuentra a tan sólo 47 pb del extremo izquierdo del *cluster* de virulencia, el borde derecho no parece estar tan claramente definido puesto que existen dos ORF's, *orfX*, y *orfZ* que están presentes en *L. monocytogenes*, permaneciendo tan sólo *orfX* en *L. ivanovii* y *orfZ* en la especie apatógena *L. innocua*, pero ausentes en el resto de especies (200,394) (Fig. 1.2). En *L. ivanovii*, corriente debajo de *orfX*, se ha localizado *orfL* (197,566), que no presenta homología con *orfZ* de *L. monocytogenes*. Sin embargo, el análisis de la secuencia de la región *prs-ldh* en *L. welshimeri* (el homólogo a *L. innocua* en la rama evolutiva de *L. ivanovii*; véase más abajo y Fig. 1.3), nos ha permitido comprobar la presencia de un homólogo de *orfL* situado corriente arriba de *orfB* (197). Esto indicaría que, como en el caso de *L. innocua*, el punto que flanquea el extremo derecho del *cluster hly* de virulencia (ausente en ambas especie apatógenas), se localizaría inmediatamente corriente abajo de *orfX* (Fig. 1.2).

La región *hly* de virulencia está organizada alrededor de *hly*, el locus que codifica la listeriolisina O formadora de poros perteneciente a la familia de toxinas tiol-activadas. *hly* ha sido el primer determinante de virulencia conocido en el género *Listeria* (215,373,578). El gen *hly* está rodeado por dos operones: a continuación de su extremo 3', y en el mismo sentido, se encuentra el operón de la lecitinasa, formado por los genes *mpl* (125,199,283,301), *actA* e *plcB* que codifican, respectivamente, una zinc metaloproteasa, Mpl, requerida para la maduración y activación del producto de *plcB*, que se secreta como una proenzima inactiva (445,461); el nucleador de actina (ActA) y una fosfolipasa C/lecitinasas de amplio rango de sustrato (PlcB).

En el extremo 5' de *hly*, y orientado en sentido divergente, se encuentra el operón *plcA-prfA* cuyos genes codifican, respectivamente, la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PlcA) y el activador transcripcional PrfA, regulador central de la virulencia de *Listeria* (314,374,332), que controla no sólo los genes situados en el *cluster hly* de virulencia sino a determinantes de patogenicidad localizados en diversas regiones del cromosoma y que constituyen el regulón de virulencia dependiente de PrfA (apartado 1.3.3).

La estructura genética y la organización transcripcional de esta región central de virulencia es completamente idéntica en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (200,303). Sin embargo, las secuencias de DNA de los genes homólogos presentan una identidad de 73-78% como media, un grado de divergencia compatible con la distancia genética que separa las dos especies patógenas de *Listeria* spp. (215,314) (véase más abajo). Esta divergencia se

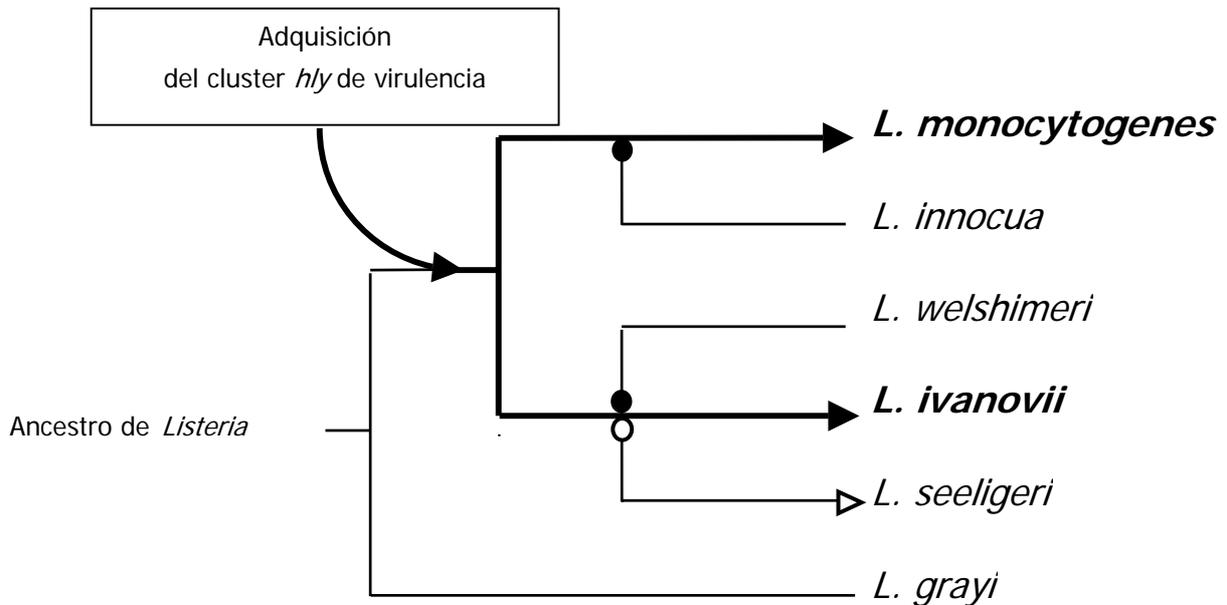
incrementa en *actA*, que exhibe una baja similitud entre *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, reflejada también a nivel aminoacídico (34% de identidad), aunque ambas proteínas mantienen una función idéntica en la motilidad mediada por la polimerización de actina (183,199,301). Una región genética similar se encuentra presente en la especie apatógena *L. seeligeri*, sin embargo, no es funcional debido a una inserción entre *plcA* y *prfA* (el locus *orfE* que se transcribe divergentemente; Fig. 1.2), interrumpiendo el circuito de autorregulación necesario para la expresión adecuada de *prfA* y los genes de virulencia PrfA-dependientes (200,303). Además, esta región en *L. seeligeri* contiene ORFs adicionales (*orfC,D* entre *prfA* y el extremo izquierdo del cluster de virulencia), y duplicaciones parciales de *plcB*, y probablemente también, de *plcA* (locus *orfK*) (Fig. 1.2). No se han determinado las funciones de estos genes adicionales y no está claro si el cluster *hly* de virulencia de *L. seeligeri* constituye un ejemplo de forma corrupta de un fragmento cromosómico que ya no es requerido por la bacteria (y por tanto tolera inserciones de genes), o bien representa la estructura primitiva de la región *hly* de virulencia durante su proceso de modificación.

El cluster *hly* de virulencia se encuentra establemente insertado en la misma posición del cromosoma de *Listeria* en las tres especies (Fig. 1.2) y no se han encontrado restos obvios de elementos genéticos que indiquen movilidad, secuencias de inserción (IS), o dianas normalmente utilizadas para la inserción de elementos genéticos móviles. Además, su contenido de G+C, la frecuencia de codones y la abundancia relativa de dinucleótidos, no difiere significativamente del resto del cromosoma de las correspondientes especies (200,303). Por tanto, resulta muy improbable que la presencia de esta región central de virulencia sea el resultado de un evento independiente e individual de transferencia genética horizontal en las tres especies de *Listeria*. Así, estos datos sugieren la existencia de un cluster *hly* de virulencia con una estructura esencialmente idéntica presente en un ancestro común de las especies de *Listeria* spp. actualmente conocidas.

Los análisis filogenéticos basados en las secuencias de 16S y 23S rRNA (90,500) han identificado dos grupos de descendencia en el género *Listeria*, la primera correspondiente a *L. grayi* y una segunda integrada por el resto de *Listeria* spp. Esta última se dividiría nuevamente en dos ramas evolutivas diferentes: una incluye a *L. monocytogenes* y *L. innocua*; y otra formada por *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. Esta estructura sugiere la siguiente historia evolutiva para el género *Listeria*: *L. grayi* se corresponde con la forma evolucionada del ancestro de *Listeria* previo a la adquisición del cluster central de virulencia; las otras dos ramas constituyen ejemplos de la diversificación clonal del ancestro parásito de *Listeria* tras haber adquirido la región de virulencia, y su estabilización (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*), delección (*L. innocua*, *L. welshimeri*) o inactivación funcional (*L. seeligeri*) durante la evolución (Fig. 1.3).

No está claro si el cluster de virulencia fue adquirido por el ancestro como un bloque en un evento de recombinación simple o fue el producto de un largo proceso de ensamblajes paso a paso ocurrido durante la evolución de *Listeria*. No obstante, su delección completa de los cromosomas de *L. innocua* y *L. welshimeri* se correlaciona con una adquisición en bloque de la región mediante un elemento transferible. Esto implicaría un mecanismo específico de movilización, del que, como se ha mencionado anteriormente, no se han podido identificar restos en los extremos de la región de virulencia. Sin embargo, recientemente, un estudio más profundo de las ORFs presentes en el extremo derecho del cluster de virulencia ha revelado que tanto OrfZ de *L. monocytogenes* y *L. innocua* como OrfX de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*

y OrfL de *L. ivanovii* y *L. welshimeri*, exhiben similitudes significativas con proteínas de bacteriófagos y otros virus (81,566). Estas homologías con proteínas virales podrían indicar que *orfX*, *orfZ* y *orfL* fueran restos de bacteriófagos implicados, mediante transducción, en la movilización de una antigua isla de patogenicidad de vida intracelular.



**Figura 1.3.** Filogenia del género *Listeria* y modelo hipotético para la evolución del cluster *hly* de virulencia. La ruta seguida por el cluster *hly* de virulencia (*chv*) después de su adquisición por una línea descendente del ancestro común de *Listeria* se indica mediante una flecha. Las líneas más gruesas muestran una funcionalidad de *chv* conservada. Los círculos rellenos indican una pérdida de *chv*, originando las especies no patógenas *L. innocua* y *L. welshimeri*. Los círculos vacíos muestran la corrupción de *chv*, originando la versión no funcional del cluster (flecha vacía), dando lugar a la especie apatógena *L. seeligeri*. Este dendograma es una reconstrucción esquemática de la filogenia de *Listeria* según las referencias 90 y 500 los tamaños de las ramas no reflejan las distancias genéticas actuales.

### 1.3.2. Familia multigénica de las internalinas.

Existen numerosos *loci* localizados fuera de la región *hly* de virulencia que codifican internalinas, formando una familia multigénica característica y exclusiva de *Listeria*. Además, se presentan grandes diferencias en el entorno genético que rodea a los distintos *loci* de internalinas en *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*.

**Locus *inIA,B*.** *inIA* e *inIB* codifican las dos únicas internalinas pertenecientes a la subfamilia de las grandes internalinas de las que se ha descrito un papel en virulencia. Se encuentran organizadas en un operón, pudiéndose transcribir tanto conjuntamente, como por

separado en dos mRNAs monocistrónicos (135,169,337). Hasta la fecha, no se han descrito sus genes homólogos en *L. ivanovii*.

Fig. 1.2.

ESTAN AL FINAL DE LA BIBLIOGRAFIA APAISADAS

**Loci *inlC2,D,E/inlG,H,E* e *inlF*.** Tanto el locus *inlC2,D,E* como *inlG,H,E* se encuentran en la misma región cromosómica, encuadrada entre los genes metabólicos *ascB* (codifica una 6-fosfo-B-glucosidasa) y *dapE* (codifica una succinil diaminopimetato desuccinilasa) (Fig. 1.4) (134,394,456). La única diferencia existente entre estos dos loci es el laboratorio de procedencia de la cepa (EGD) de *L. monocytogenes* utilizada para su identificación y posterior secuenciación: el laboratorio de Pascale Cossart en el primer caso y el de Werner Goebel en el segundo. *inlH* parece codificar una internalina quimérica como resultado de un proceso de recombinación entre el extremo 5' de *inlC2* y el extremo 3' de *inlD* (456). Mediante el análisis en *L. ivanovii* y *L. innocua* de la región correspondiente al cluster *inlG,H,E* y los genes metabólicos que la flanquean, se ha comprobado la ausencia de este nuevo locus de internalinas y que los genes metabólicos *ascB* y *dapE* son adyacentes en ambas especies (303). Tampoco parece estar presente en *L. seeligeri* (394), por lo que el operón *inlG,H,E* o *inlC2,D,E* resultaría ser específico de *L. monocytogenes*. Se ha descrito un nuevo locus, *inlF*, que codifica una internalina exclusiva de *L. monocytogenes* (InlF). *inlF* se encuentra en una posición diferente del DNA cromosómico de esta especie, cuya localización exacta no ha sido descrita (134,394).

**Pequeñas internalinas secretadas.** El único representante de este grupo de internalinas en el caso de *L. monocytogenes* es InlC, codificado por un gen monocistrónico, *inlC*, localizado entre los genes metabólicos *rpIS* (codifica la proteína ribosomal L19) en su extremo 5' e *infC* (codifica el factor IF3 de inicio de traducción) en el extremo 3' (142,143). No se han podido encontrar en las regiones flanqueantes a *inlC* estructuras que pudieran hacer pensar en un evento de recombinación por el cual se hubiera insertado *inlC* en esta área concreta del cromosoma (143,302). *L. ivanovii* es la otra especie del género *Listeria* que cuenta con la presencia de esta internalina, codificada por el gen *i-inlC*, prácticamente idéntico a su homólogo en *L. monocytogenes* (92% de identidad a nivel de secuencia de nucleótidos). No obstante, la estructura y localización de la región cromosómica donde se encuentra insertado *i-inlC* es completamente distinta. En primer lugar, en la región situada en el extremo 5' de *i-inlC* se encuentra otro miembro de la familia multigénica de las pequeñas internalinas, *i-InlD*, codificada por *i-inlD*, y que exhibe un porcentaje de identidad del 67% en su secuencia de nucleótidos respecto de *i-inlC* e *inlC* (143). En segundo lugar, *i-inlC,D* se encuentran insertados en un locus rRNA/tRNA que parece poseer una organización similar al locus *rrnB* de *B. subtilis* (143,202,310), en el que los genes codificantes de 23S rRNA y 5S rRNA se continúan con 21 genes que codifican tRNAs y cuya integridad en *L. ivanovii* habría sido destruida debido a la integración de este locus de internalinas. El estudio del cluster homólogo de genes ribosomales en *L. monocytogenes* y en *L. innocua* indica que en estas especies no se ha producido la integración de ningún locus extraño (143).

Las islas e islotes de patogenicidad se encuentran con frecuencia insertadas en loci de tRNAs (208,218). Estos genes *tRNA* son típicas dianas de integración de determinantes genéticos exógenos (220,248). La diferente localización de *inlC* e *i-inlD,C* en los cromosomas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* y la situación de *i-inlD,C* en un locus *tRNA*, posiblemente indiquen que, en *L. ivanovii*, *i-inlD* haya sido el resultado de un proceso de transferencia horizontal seguida de un fenómeno de duplicación en tándem de *inlC* (143). *i-inlC,D* reúne la mayoría de las condiciones postuladas para su definición como islote de patogenicidad (143,394).

### 1.3.3. Regulación genética de los determinantes de virulencia de *Listeria*.

*L. ivanovii* y *L. monocytogenes* son parásitos no obligados y oportunistas que pueden pasar de una forma de vida saprofita en el suelo, a producir infección en los tejidos de sus hospedadores. Tienen, por tanto, la necesidad de poseer sistemas de regulación altamente sensibles para reconocer la transición entre medio ambientes tan diferentes para acomodar la expresión de sus distintos genes a las nuevas necesidades y condiciones determinadas para cada uno de los hábitats en que se encuentran. Estos sistemas son capaces de responder a distintos estímulos ambientales de tipo físico o químico, que señalarían la transición entre el hábitat natural y los tejidos del hospedador, de tal manera que se encargarían de silenciar genes no requeridos, cuya expresión supondría un derroche de energía, y activar aquellos que le resulten esenciales en cada momento. Los genes de virulencia constituyen un ejemplo de determinantes genéticos especialmente adaptados por las bacterias patógenas para sobrevivir y multiplicarse en los tejidos del hospedador al que infectan, y cuya expresión es por definición indispensable para la vida saprofita en el medio ambiente. Por lo tanto, la expresión coordinada de los genes de patogenicidad en regulones controlados por genes reguladores que responden a las variaciones ambientales a través de sistemas sensoriales capaces de traducir

**Fig. 1.4.** loci de internalinas

ESTÁN AL FINAL DE LA INTRODUCCIÓN APAISADAS.

señales procedentes del hábitat (381), permite a las bacterias responder y adaptarse de forma precisa a las variadas condiciones que se producen durante el desarrollo del proceso infeccioso y la transmisión del agente patógeno de un hospedador a otro.

Las primeras evidencias de que la expresión de los genes de virulencia de *Listeria* podrían estar, al igual que en otras bacterias patógenas, coordinadamente regulada fueron analizadas en *L. monocytogenes* y se basaron en varias observaciones. En primer lugar, se encontraron secuencias palindrómicas de 14 pb en las zonas promotoras de varios genes del cluster central de virulencia (378) (Fig. 1.2). Estos palíndromos normalmente constituyen motivos de unión de proteínas reguladoras, sugiriendo que dichos genes podrían estar sometidos a un sistema de control de la expresión común. En segundo lugar, el análisis de mutantes no hemolíticos, tanto espontáneos como por transposición, y que no estaban afectados en el gen *hly*, reveló la presencia de alteraciones localizadas corriente arriba de *hly*. Estas observaciones constituían sólidos argumentos para sugerir que en la región contigua que precede a este gen se encontraban elementos necesarios para su expresión (332). Dichos mutantes, además, presentaban modificaciones en el patrón de expresión de otros factores de virulencia, como la actividad lecitinasa, el carácter invasivo y la virulencia para el ratón. Ello indujo a pensar que estaban afectados en un regulador pleiotrópico de los determinantes de patogenicidad (276,331,374). La caracterización genética de estos mutantes condujo a la identificación de *prfA* (de *positive regulatory factor A* o factor A de regulación positiva), el gen codificante de PrfA, una proteína citoplásmica de 27 kDa (332,374). Al *trans* complementar los mutantes con *prfA*, se restablecía el fenotipo hemolítico normal y las demás características asociadas a la virulencia. Aunque inicialmente, y basándose en análisis por hibridación de sondas de DNA, no se pudo encontrar un gen homólogo en *L. ivanovii* y se concluyó que la regulación en este caso sería diferente con respecto a *L. monocytogenes* (593), posteriormente se comprobó la existencia del correspondiente alelo homólogo en *L. ivanovii*, *i-prfA*. Así, al parecer, ambas especies comparten un sistema de regulación de los genes de virulencia muy similar (314).

Existen secuencias palindrómicas de 14 pb denominados “cajas PrfA” centradas en la posición -41,5 de las regiones promotoras de *hly*, *plcA* (314,405), *mpl* (299,314,377), *actA* (127,299,301,574) e *inIA* (135). Recientemente, se ha localizado igualmente una caja PrfA delante de *inIC*, *i-inIC*, e *i-inID* (142,143) y *hpu* (85). Los correspondientes análisis de transcripción, salvo en el caso de *hpu*, en el que los estudios se están realizando actualmente en nuestro laboratorio (85,471), han demostrado que las unidades transcripcionales a las que pertenecen estos genes están controladas por PrfA (46,143,164,374). En el operón *inIA/B* sólo uno de sus cuatro promotores,  $P_3inIA$ , a partir del cual tiene lugar la transcripción bicistrónica *inIAB* (135,337), es PrfA-dependiente. Las secuencias de las cajas PrfA y su localización con respecto al origen de transcripción de los genes pertenecientes al regulón PrfA no son exactamente iguales: las cajas correspondientes a *hly* y *plcA* (377,314) se consideran “perfectas” dado que no tienen ningún desparejamiento en la secuencia de 14 pb (5'-TTAACANNTGTTAA-3'); en las demás hay sustituciones con respecto al palíndromo perfecto de una (*mpl* (314,405), *actA* (127,199,301,574) e *inIC* (142,143)] o dos (*inIA/B* (135), *i-inID* (143)) pares de bases. Estas secuencias palindrómicas, en el caso de las zonas promotoras de los genes del cluster central de virulencia de *L. ivanovii*, son 2 pb más largas que en *L. monocytogenes*, aunque la relevancia en términos de regulación de este hecho aún se desconoce (299,314). Se ha demostrado que el número de desparejamientos que presenten

las distintas cajas PrfA influye en la afinidad con la que PrfA se une a las mismas, disminuyendo ésta a medida que la secuencia diverge de la estructura palindrómica perfecta (45,162,527). Así, los distintos genes de virulencia PrfA-dependientes muestran un patrón diferencial de respuesta frente al regulador, con una jerarquía definida por la relación  $plcA/hly > mpl/actA/inlC > inlA/B$  en los promotores de *L. monocytogenes* (164). La simetría de las cajas PrfA sugiere que PrfA se une como un dímero a sus secuencias dianas. Existen evidencias experimentales que demuestran que PrfA forma homodímeros en solución, y experimentos de DNA *footprinting* han demostrado su unión, *in vitro*, a las cajas PrfA (123)

La transcripción de *prfA* a partir de *PplcA* en un RNAm bicistrónico está controlada por PrfA a través de la caja situada en la región promotora de *plcA*, lo que conlleva la autorregulación positiva de PrfA, que promueve su propia síntesis al activar la transcripción a partir del promotor de *plcA* (374). El transcrito bicistrónico tiene una importancia fundamental en la obtención de los niveles necesarios de expresión de los factores de virulencia en la infección (74,468).

Las regiones intergénicas *hly-plcA* y *plcA-prfA* están muy conservadas en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (78,2%) (314). No se ha podido detectar ninguna caja PrfA en la región *plcA-prfA*, pero sí se ha detectado un palíndromo, de menor tamaño y localizado entre el inicio de transcripción y el de traducción de *prfA*. Aunque no se ha podido demostrar (526), se le ha atribuido un papel en la autorregulación negativa de *prfA* (162,163,314). Otra particularidad de esta región intergénica es la presencia de repeticiones (dT)<sub>n</sub> y (dA)<sub>4-5</sub> regularmente distribuidas y presuntamente implicadas en la curvatura de la estructura terciaria que presenta esta región, experimentalmente comprobada en el caso de *L. ivanovii* (314).

En *L. monocytogenes* se ha observado que *prfA* no se transcribe de forma constitutiva sino dependiente de la fase de crecimiento y de la temperatura de incubación, actuando sobre la síntesis del bicistrón *plcA-prfA* (330). El control ejercido por la temperatura ambiental es común a numerosas bacterias patógenas, donde la transición 20°C a 37°C puede servir a la bacteria como señal indicadora de “presencia en un hospedador mamífero” y desencadenar un incremento en la expresión de los factores de virulencia (370). La composición del medio extracelular, el pH, y la concentración de hierro son señales ambientales que van a influir también en la expresión de *prfA* (24,45,123,331,379,424,466,469,538). Recientemente se ha determinado que, además de una temperatura adecuada (37°C), *L. monocytogenes* necesita identificar una determinada composición del medio extracelular para lograr una completa activación de los genes del regulón PrfA (469). La necesidad de la concurrencia de dos tipos de señales activadoras para la máxima expresión de los factores de virulencia representaría un sistema de seguridad que utilizaría *L. monocytogenes* para asegurarse de que dicha expresión sólo se produce en el momento y lugar adecuados. En *L. ivanovii*, también se requiere PrfA para la expresión de los genes de virulencia, pero existen diferencias en el patrón de regulación PrfA-dependiente. Así, aunque no se ha publicado ningún estudio analizando el comportamiento transcripcional dependiente de las señales estudiadas en el caso de *L. monocytogenes*, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la expresión de los genes de virulencia sujetos a la regulación por i-PrfA en *L. ivanovii*, también están termostregulados, si bien, a diferencia de *L. monocytogenes*, sería suficiente una elevación de la temperatura a 37°C para desencadenar la activación completa del regulón de virulencia (409).

Sobre la base de análisis de homología de secuencia, la proteína PrfA se ha incluido en la familia Crp-Fnr (*cAMP receptor protein* o proteína receptora de AMP cíclico; *fumarate/nitrate regulator* o regulador de fumarato/nitrato) de factores de transcripción bacterianos (299,314). De todas las proteínas que pertenecen a esta familia la más estudiada y mejor conocida es Crp de *E. coli*, también denominada CAP (*catabolite gene activator protein* o proteína activadora de genes regulados por catabolito) (revisado en 295). Crp tiene una alta afinidad por el cAMP nucleótido cíclico que actúa como su activador alostérico. En ausencia de dicho cofactor, el complejo cAMP-Crp no puede formarse, la proteína reguladora es afuncional y no se produce la expresión de los genes Crp-dependientes. En el momento en que se incrementa la concentración del cofactor, se formara el complejo transcripcionalmente activo cAMP-Crp, dando lugar a la activación de los genes regulados por Crp.

En conjunto, la homología entre la secuencia aminoacídica de PrfA y Crp es bastante pequeña (20-25% de similitud en el total de la proteína). Sin embargo, los residuos de los dominios esenciales para las funciones de modulador de la transcripción están muy conservadas (314,468,527,575). Al igual que Crp, PrfA cuenta con un motivo HTH en el extremo C-terminal responsable de la unión a las secuencias dianas presentes en las regiones promotoras de los genes que controla (cajas PrfA) (43,123,163,526,575). Asimismo, en el extremo N-terminal se han encontrado cuatro glicinas que separan cortas secuencias con alta probabilidad de formar láminas  $\beta$ , formando una estructura  $\beta$ -roll (314). Esta estructura, en Crp, forma el lugar donde el cofactor activador cAMP se introduce en el dominio N-terminal de la proteína (295). Sin embargo, la mayoría de los residuos implicados en la unión de cAMP a Crp no se encuentran conservados en PrfA (575). Por lo que el papel de la estructura en  $\beta$ -roll de PrfA se desconoce actualmente. A diferencia de los demás miembros de esta familia, PrfA tiene un HTH adicional en el extremo N-terminal cuya función se desconoce por el momento. Se ha descrito un motivo de cremallera de leucinas en el extremo C-terminal de PrfA (314), que no existe en las demás proteínas de la familia, y que podría estar implicado en la dimerización de PrfA o en una eventual interacción de PrfA con otra proteína implicada en la regulación de la virulencia (65,316).

Recientemente, se ha demostrado que mutaciones puntuales en el motivo HTH presente en el extremo C-terminal de PrfA, que afectan a residuos que se presuponían implicados en el contacto con el DNA en función de la homología con Crp, alteran la unión al DNA y la activación de los genes de virulencia de *L. monocytogenes* (526). Además, se han caracterizado mutantes *prfA\**, análogos a mutantes *crp\** de *E. coli*, en los que se producía una sobreexpresión constitutiva de los genes dependientes de PrfA en condiciones en las que el regulón PrfA se encuentra normalmente silente (468,469,471). Estos hechos constituyen sólidas evidencias de que las homologías estructurales entre PrfA y Crp son funcionalmente relevantes (468,526,575).

Tomando como base el mecanismo de regulación de Crp, recientemente, en nuestro laboratorio se ha definido el modelo actualmente aceptado (24,250) para explicar el mecanismo de regulación mediada por PrfA (468,575). Según este modelo, los niveles de expresión de los factores de virulencia no dependen primariamente de la concentración de PrfA, como se había sugerido inicialmente (163,169,526), sino del estado conformacional de la proteína PrfA. La

base de este modelo radica en que PrfA puede presentar dos conformaciones funcionales, activa e inactiva, y dependiendo el paso de una a otra de la interacción con un hipotético cofactor cuyos estarían modulados por determinadas condiciones del medio. Un punto crucial en este modelo es la capacidad de *prfA* para expresarse de dos formas diferentes: (i) constitutivamente y a bajos niveles, a partir de transcritos monocistrónicos desde los promotores situados en el espacio intergénico *plcA-prfA*; (ii) de forma dependiente de PrfA, a partir de transcritos bicistrónicos originados en *PplcA* y que dan lugar al circuito de autorregulación positiva. En condiciones normales no activadoras no habría cofactor y, por tanto, PrfA se sintetizaría a niveles basales a partir de los transcritos monocistrónicos. Sin embargo, si *Listeria* detecta condiciones ambientales activadoras (una temperatura de 37°C y una determinada composición del medio extracelular en el caso de *L. monocytogenes*), la concentración intracelular del hipotético cofactor se incrementaría. Este cofactor sería capaz de interactuar con la proteína PrfA inactiva, provocando un cambio conformacional que aumentaría significativamente la afinidad de unión de PrfA por sus dianas en el DNA. La proteína PrfA activa induciría la síntesis de más PrfA (en forma activa por la presencia del cofactor) mediante el circuito de autoamplificación, desencadenando un rápido incremento en la transcripción de los genes dependientes de PrfA. El sistema se mantendrá activado tanto tiempo como el cofactor se encuentre en concentraciones suficientes en el citoplasma bacteriano, pero se reprimirá rápidamente en cuanto las señales ambientales activadoras cesen y la concentración del cofactor disminuya. Un segundo nivel de regulación se establecería en función de la respuesta diferencial de los promotores dependientes de PrfA según la estructura de las dianas de PrfA, que afectan a la afinidad de unión de PrfA (45,74,162,163,527).

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.**

Aunque parecía que las enfermedades transmisibles habían quedado relegadas a un segundo plano gracias a la utilización de vacunas y a la antibioterapia, actualmente nos encontramos a las puertas de una nueva era en la que las infecciones están recobrando la importancia que tuvieron en tiempos pretéritos como primera causa de morbilidad y mortalidad en las poblaciones humanas. Esto es debido a la rápida difusión de las resistencias frente a los antimicrobianos entre los agentes patógenos, la constante aparición de nuevas enfermedades infecciosas y la re-emergencia de otras que, como la tuberculosis, se creían erradicadas o controladas.

La clave para hacer frente a esta amenaza es la investigación. Por un lado, hay que desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan la incorporación de nuevos compuestos antimicrobianos con los que se pueda superar las resistencias a los antibióticos. Por otro, es necesario también promover la aproximación racional en el diseño de nuevas vacunas, dada la ineficacia de la vía empírica utilizada hasta ahora en la elaboración de productos inmunológicos frente a una gran cantidad de enfermedades que hoy por hoy todavía no somos capaces de prevenir.

Para alcanzar estos objetivos es indispensable descifrar previamente los complejos mecanismos moleculares y celulares que intervienen en la patogénesis de los procesos infecciosos y en la consecuente respuesta inmune que generan los microparásitos al interactuar con el hospedador. Sólo de esta forma se pueden identificar nuevas dianas de acción para productos terapéuticos innovadores, nuevos antígenos vacunales de potencial utilidad en el desarrollo de vacunas más eficaces, así como vectores microbianos capaces de vehicular dichos antígenos, o los propios agentes terapéuticos (incluida la terapia génica), hacia el lugar apropiado del organismo.

Las enfermedades microbianas causadas por patógenos intracelulares son especialmente problemáticas en cuanto a prevención o tratamiento. Entre ellas se encuentran algunas especialmente graves por su alta incidencia y prevalencia, como la tuberculosis, paludismo, tripanosomiasis, leishmaniasis, clamidiasis, brucelosis, disentería bacilar y salmonelosis, por citar tan sólo unos ejemplos. Los agentes etiológicos de estas enfermedades, y de otras muchas también importantes, como la propia listeriosis, tienen en común el haber adoptado el interior de la célula eucariota como sitio para la proliferación en el hospedador. En este contexto, aparte de su relevancia intrínseca como importantes patógenos humanos y animales, los microorganismos del género *Listeria* constituyen uno de los mejores modelos de estudio para comprender las bases moleculares y celulares del parasitismo intracelular y la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares.

Los trabajos realizados hasta la fecha con *Listeria* han supuesto un gran avance en el campo de la patogénesis microbiana y la microbiología molecular al conseguir, por primera vez, identificar y caracterizar los factores de virulencia que capacitan a un parásito intracelular para

llevar a cabo cada una de las etapas de su ciclo vital en el interior de las células del hospedador eucariota (189). La aparición y rápido desarrollo de la “microbiología celular”, como nueva disciplina encargada de explorar los aspectos celulares de la interacción parásito-hospedador, ha consolidado durante la última década del siglo XX a los microorganismos del género *Listeria* como modelos de estudio, ocupando actualmente un puesto privilegiado en investigación biomédica que va más allá de la microbiología y las enfermedades infecciosas para adentrarse en el terreno de la biología fundamental (103). No se debe olvidar que el producto de un gen de *Listeria*, ActA, ha contribuido de forma definitiva a descifrar los mecanismos utilizados por la célula eucariota para inducir y regular la motilidad basada en el citoesqueleto de actina, fundamental en procesos tales como la migración celular durante la embriogénesis o la metastatización tumoral (103).

Uno de los aspectos más interesantes dentro de la patogénesis microbiana es el estudio de las bases moleculares del tropismo celular y tisular y la adaptación a un determinado hospedador. Descifrar estos aspectos es esencial para encontrar nuevos sistemas ligando-receptor específicos, vías de transducción de señales hacia el interior de la célula así como sutiles modelos de adaptación molecular resultado de una larga coevolución entre el microparásito y su hospedador. Aquí de nuevo *Listeria* puede jugar un gran papel como modelo de investigación.

Efectivamente, en el género *Listeria* existe, junto a *L. monocytogenes*, una segunda especie patógena que se distingue por presentar un aparente tropismo patogénico y de hospedador. Se trata de *L. ivanovii*. A diferencia de *L. monocytogenes*, que es capaz de infectar y producir listeriosis en un gran número de especies de vertebrados, incluidos tanto el hombre como diferentes especies de mamíferos y aves, *L. ivanovii* parece afectar selectivamente a los rumiantes. Esta especie, además, es incapaz de producir infección del SNC, que es la manifestación más característica de la infección por *Listeria* en los rumiantes, estando la mayoría de sus aislamientos asociados con abortos e infecciones neonatales en ovejas. En el modelo murino, *L. ivanovii* se caracteriza por su incapacidad de proliferar en el bazo y por multiplicarse de forma preferencial en el hígado, mientras que *L. monocytogenes* lo hace igualmente bien en ambos órganos (247,481). La DL50 de *L. ivanovii* para el ratón es, además, significativamente (dos o tres logaritmos) inferior a la de *L. monocytogenes* (272,524). Por otra parte, aunque algunos autores presentan evidencias de que es más invasiva *in vitro*, especialmente en líneas celulares de fibroblastos 3T3 murinos, *L. ivanovii*, a diferencia de *L. monocytogenes*, es incapaz de formar placas de lisis en este mismo tipo celular. Algunos autores han correlacionado esta observación con la menor virulencia de *L. ivanovii* respecto de *L. monocytogenes*, al menos en el modelo murino (272). Aparte de estos aspectos, *L. ivanovii* desarrolla un ciclo de vida intracelular análogo al de *L. monocytogenes*, lo que se correlaciona con la presencia en ambas especies del locus *hly* de virulencia, formado por seis genes esenciales para la supervivencia y proliferación en el interior de las células del hospedador (200,272). Está claro pues que, además de este locus central de virulencia necesario para el parasitismo intracelular, ambas especies patógenas del género *Listeria* deben poseer un equipamiento distinto en genes de virulencia que serían específicamente responsables de las observadas diferencias de tropismo patogénico y de hospedador.

Cuando se cultiva en el laboratorio, *L. ivanovii* se distingue de *L. monocytogenes* por presentar un fenotipo hemolítico muy diferente en placas de agar sangre de cordero. Mientras

que *L. monocytogenes* produce un débil y estrecho halo de  $\beta$ -hemólisis, *L. ivanovii* exhibe un fuerte efecto hemolítico bizonal caracterizado por un halo interno de lisis completa rodeado de un amplio halo de hemólisis incompleta. Este último es similar al producido por la  $\beta$ -toxina estafilocócica y, al igual que éste, resulta totalmente lisado en presencia de *R. equi*, dando lugar a un característico efecto hemolítico sinérgico en forma de pala (87). Este fenómeno, denominado reacción CAMP-like por sus similitudes con la hemólisis sinérgica descrita por Christie, Atkins, Munch y Petersen en la década de 1940 para *Streptococcus agalactiae* y *S. aureus*, es rutinariamente utilizado como criterio fundamental de identificación de *L. ivanovii*.

El factor responsable de las particulares propiedades hemolíticas de *L. ivanovii* ha sido identificado con una esfingomielinasa C (SMasa) funcionalmente similar a la  $\beta$ -toxina que *L. ivanovii* libera al sobrenadante de cultivo (196,300,470,571). Esta SMasa sólo es producida por *L. ivanovii* dentro del género *Listeria*. La esfingomielina es un importante fosfolípido de las membranas eucariotas, por lo que, dadas las características del ciclo de vida intracelular de *Listeria*, en donde un paso fundamental es la lisis eficiente de las membranas de la célula eucariota, es muy posible que este enzima tenga una implicación en el proceso patogénico de *L. ivanovii*. Curiosamente, además, la actividad lítica de este enzima se manifiesta sólo en eritrocitos de oveja, que son los que contienen un mayor porcentaje en esfingomielina de membrana entre todos los mamíferos (en general, todos los eritrocitos de rumiantes) (196,272,399). Esta observación nos sugirió que la SMasa de *L. ivanovii* podría jugar un papel en el tropismo patogénico de esta especie hacia los pequeños rumiantes.

Como una primera etapa en la caracterización de las bases moleculares del tropismo patogénico de *L. ivanovii*, decidimos abordar el estudio de esta SMasa. El punto de partida de este trabajo ha sido la caracterización de un mutante denominado 44/2, que fue obtenido por el grupo del Prof. Kreft en la Universidad de Würzburg mediante el transposón Tn1545 y que estaba afectado en la producción de la SMasa. Nuestro primer objetivo ha sido caracterizar el punto de inserción del transposón en este mutante, lo cual podía conducirnos a la identificación del gen estructural de la propia SMasa o de, al menos, algún determinante genético implicado en la expresión o síntesis de dicho enzima. La disponibilidad del gen de la SMasa era fundamental para nosotros para poder iniciar el estudio de la contribución de este toxina alterante de las membranas a la virulencia de *L. ivanovii* utilizando una aproximación genética.

Con estas premisas, en el presente trabajo de tesis hemos abordado de forma secuencial una serie de objetivos y tareas de investigación que nos han permitido finalmente caracterizar en su totalidad la región cromosómica donde se encuentra el gen de la SMasa de *L. ivanovii*, *smcL*. Esto nos ha conducido a identificar y caracterizar genéticamente una nueva isla de patogenicidad exclusiva de *L. ivanovii*, de gran tamaño (22 kb) y posiblemente implicada en el tropismo patogénico de esta especie. Esta isla de patogenicidad, LIPI-2, es la primera para la que se demuestra la existencia de un locus tRNA en su punto de inserción e inestabilidad genética en bacterias gram-positivas.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

**3.1. Caracterización genética de 44/2, un mutante por transposón afectado en la producción de actividad esfingomielinasa: identificación del locus *lyrA*.**

### 3.1.1. Introducción.

La mutagénesis por transposición se ha revelado como un instrumento muy útil para la identificación de determinantes genéticos involucrados en la virulencia de *Listeria* (168,275). Así, por ejemplo, mediante esta técnica, asociada a la búsqueda de variantes de fenotipo no hemolítico, se pudieron identificar los genes *hly* (373,378) y *prfA* (331,374) en *L. monocytogenes*. De forma análoga, el gen *plcB* de la fosfolipasa C se identificó a través del cribado de un banco de mutantes por transposón a través del criterio de pérdida de actividad lecitinasa en placas de yema de huevo (461,574). Siguiendo este mismo abordaje, en el laboratorio del Profesor Jürgen Kreft (Universidad de Würzburg, Alemania) se obtuvo un banco de aproximadamente 3000 mutantes de inserción mediante mutagénesis de la cepa tipo de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup> con el transposón conjugativo Tn1545 (300). Con el fin de identificar los factores citolíticos de *L. ivanovii*, dicho banco fue rastreado en busca de variantes con fenotipo hemolítico alterado. Se identificaron tres mutantes con fenotipo débilmente hemolítico pero con características diferentes, denominados 8/6, 20/24 y 44/2 (300) (véase tabla 3.1.1). La caracterización del mutante 8/6 permitió identificar el regulador central de los genes de virulencia de *L. ivanovii*, *i-prfA* (314). El análisis de 20/24 demostró que estaba específicamente afectado en la producción de la ivanolisina O, ILO, debido a la inserción del transposón en el gen codificante de esta toxina (300,302). El tercer mutante nos fue cedido para su análisis en el marco de una colaboración que mantenemos con el grupo del Dr. Kreft. Este mutante nos interesaba porque había dejado de liberar al medio extracelular una potente esfingomielinasa C (SMasa), actividad específicamente producida por *L. ivanovii* en el género *Listeria* y que podría contribuir a la virulencia y especificidad patogénica de esta especie (196). Dicha actividad había sido asociada con el particular fenotipo hemolítico de *L. ivanovii* en agar sangre de cordero, caracterizado por un amplio doble halo de hemólisis y un llamativo efecto CAMP en forma de pala en presencia de *R. equi* (272,300,302,470). En consonancia con ello, el mutante 44/2 había efectivamente perdido el segundo halo de hemólisis incompleta y sufrido una alteración en su reacción CAMP, pasando a ser mucho más débil y en forma de cerilla. Es decir, la ausencia de actividad SMasa había hecho adquirir al mutante de *L. ivanovii* un fenotipo en agar sangre similar al de *L. monocytogenes* (Fig. 3.1.1). Este mutante, por tanto, podía ser muy útil para identificar el determinante genético de la SMasa, el cual necesitábamos para abordar el estudio de la contribución de dicha toxina membrano-activa en la virulencia.

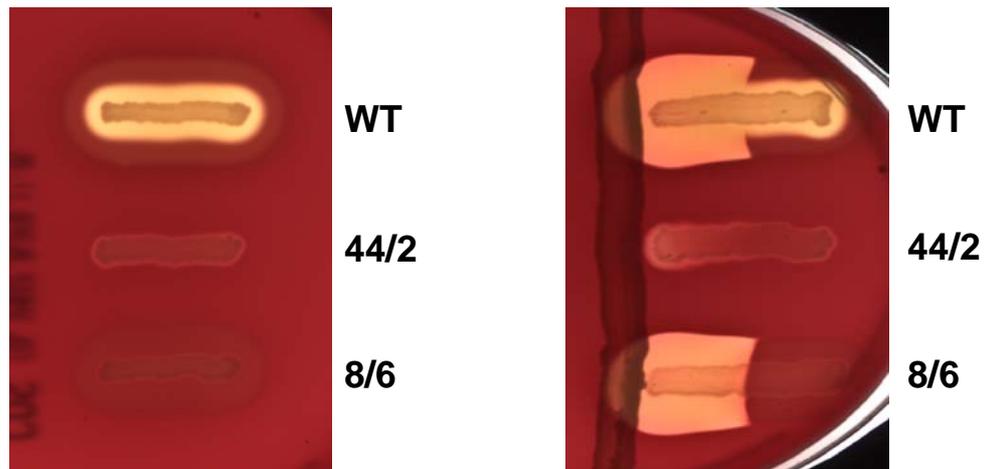
En este primer capítulo describimos la caracterización detallada del mutante 44/2 y los análisis genéticos que llevamos a cabo para determinar la base molecular de su alteración fenotípica.

### 3.1.2. Resultados.

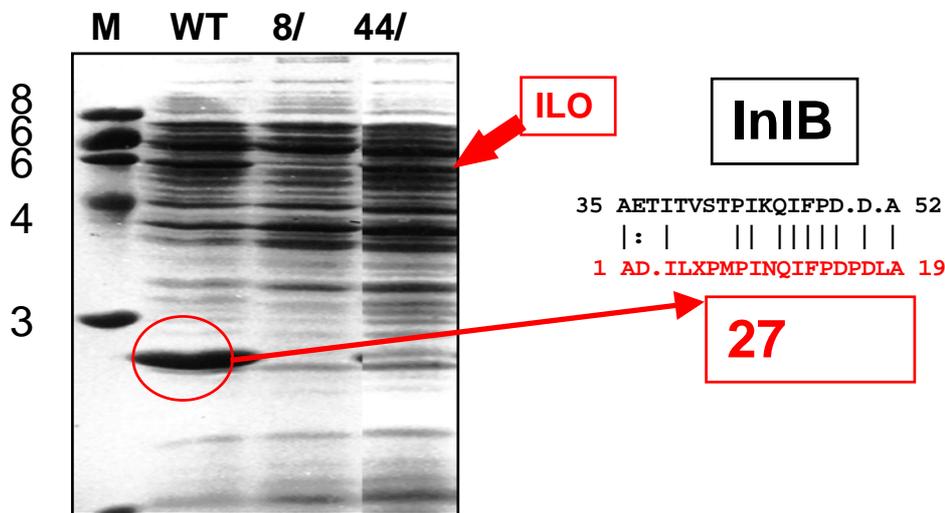
#### 3.1.2.1. Caracterización preliminar y virulencia del mutante 44/2.

Iniciamos el estudio de 44/2 analizando en detalle su fenotipo con el fin de descartar la presencia de alteraciones en otros caracteres, lo cual implicaría que la ausencia de producción de actividad SMasa sería el resultado de una mutación con amplio efecto pleiotrópico, no estrictamente relacionada con el determinante del enzima y en general con la virulencia de la bacteria. Al ser comparado con la cepa parental ATCC 19119<sup>T</sup>, no pudimos detectar ninguna diferencia significativa en la capacidad de crecimiento, morfología macro- y microscópica, motilidad o patrón de utilización de azúcares (analizado con el sistema API-50 CH).

**A.**



**B.**



**Figura 3.1.1.** Principales características fenotípicas de los mutantes 44/2 y 8/6.

**Panel A.** Actividad hemolítica (lado izquierdo) y reacción de hemólisis sinérgica con *R. equi* (estría horizontal) (Test de CAMP) (en el lado derecho) de WT, 8/6 y 44/2 (estrías horizontales). En el efecto CAMP se observan las dos formas características reflejadas en la Tabla 3.1.1: (i) Pala grande, característica del efecto CAMP que exhiben aquellas cepas que presentan un patrón de producción no alterado de actividad SMasa, representado por WT y 8/6, y (ii) efecto en forma de cerilla, se corresponde con una falta total de actividad SMasa, representado por 44/2. La actividades hemolíticas en medio sólido se han valorado semicuantitativamente con la siguiente escala: -, reacción negativa; + a +++, distintas intensidades de reacción positiva. WT, representa el fenotipo caracterizado por un fuerte doble halo de  $\beta$ -hemólisis. El halo interno se corresponde con una hemólisis total asociado a la producción de ILO y el halo externo con una hemólisis incompleta asociada a la producción de SMasa (véase apartado 3.2.1). 44/2, se caracteriza por presentar un débil halo de hemólisis completa y una pérdida del halo de hemólisis incompleta. 8/6, exhibe una pérdida casi total de hemólisis completa y un halo de hemólisis incompleta.

**Panel B.** En el lado izquierdo se presenta una SDS-PAGE de las proteínas de SC precipitadas con TCA. La posición de la ILO (58 kDa) y la proteína de 27 kDa se señalan con flechas. Se observa una ausencia en la producción de ambas proteínas en 8/6, y la falta de la de 27 kDa en 44/2. En el extremo derecho se muestra el alineamiento de la secuencia del extremo N-terminal de la proteína de 27 kDa (en rojo) con el extremo N-terminal (en negro) de InIB, miembro de la familia multigénica de las internalinas.

Una vez comprobado esto, era importante determinar si el defecto genético de 44/2 tenía realmente alguna consecuencia para la virulencia de la bacteria, lo cual justificaría la realización de los correspondientes análisis genéticos para la identificación de los determinantes afectados. Resultados previos *in vitro* habían mostrado que el ciclo de vida intracelular de 44/2 no presentaba diferencias significativas respecto de la cepa parental en fibroblastos 3T3 y macrófagos murinos J774 (272). Utilizando el modelo murino de infección experimental, pudimos observar que 44/2 presenta una significativa atenuación de la virulencia *in vivo*, utilizando tanto el criterio de la  $DL_{50}$  (incremento de un ciclo logarítmico, de  $10^{7.24}$  para el WT hasta  $10^{8.22}$  para 44/2) como el de supervivencia en órganos (Fig. 3.1.2). Estos resultados confirmaron que 44/2 estaba afectado en un locus (o loci) importante(s) para la virulencia de *L. ivanovii*.

El examen mediante SDS-PAGE de las proteínas del sobrenadante de cultivo de 44/2 reveló la ausencia de una proteína mayoritaria de 27 kDa. Este tamaño es similar al descrito para otras fosfolipasas bacterianas (1,385,25,574), por lo que interpretamos que podría corresponder a la SMasa. Sin embargo, un análisis comparativo de los sobrenadantes de cultivo entre 44/2 y el mutante *prfA* 8/6 reveló que la SMasa y la proteína de 27 kDa constituyen dos entidades diferentes (Tabla 3.1 y Fig. 3.1.1). Así, mientras la proteína de 27 kDa está ausente en ambos mutantes, 8/6 presenta una actividad SMasa y una reacción CAMP con *R. equi* idénticas a las de su cepa parental. Esto indica claramente una regulación diferencial de dos caracteres distintos, uno de los cuales sería PrfA-dependiente (proteína de 27 kDa) y el otro PrfA-independiente (SMasa). La no identidad de ambos caracteres fue confirmada al comparar la secuencia del extremo N-terminal de la proteína de 27 kDa, previamente determinada por Kreft et al. (300), con la base de datos de proteínas, encontrando una homología significativa con InIB de *L. monocytogenes* (Fig 3.1.1). Este hallazgo supuso la primera identificación de un miembro de la familia de las internalinas en *L. ivanovii*, i-InIE (veáse más adelante el apartado 3.3.2.1).

Así pues, la mutación en 44/2 afectaba al menos a dos potenciales factores de virulencia de *L. ivanovii*. Dos hipótesis podían explicar la ausencia de expresión de dos proteínas distintas en 44/2:

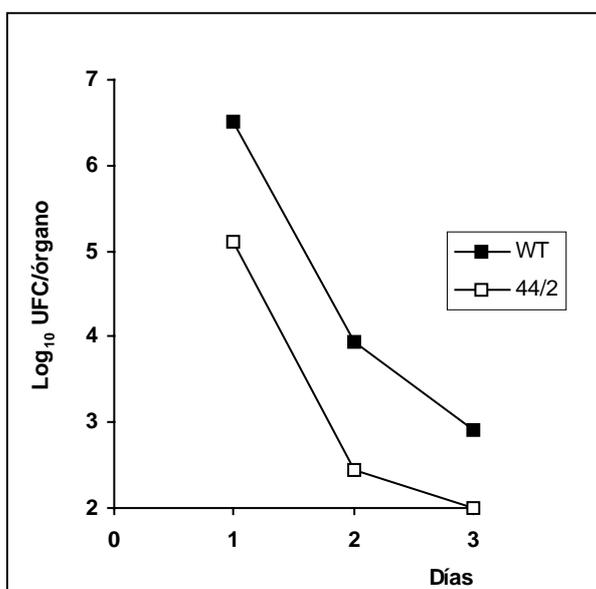
- 1.- La inserción del transposón causa un efecto polar que interrumpe la transcripción de, al menos, los determinantes genéticos responsables de la actividad SMasa y la producción de la proteína de 27 kDa. Por lo tanto, en la región cromosómica afectada por la inserción del transposón se encontrarían los genes cuya expresión está alterada.

- 2.- Como consecuencia de la inserción del transposón se produce la inactivación de un elemento que controla la expresión de la SMasa y que también es necesario para la producción de la proteína de 27 kDa (junto a PrfA). En este caso, la región de inserción del transposón estaría integrada por un gen regulador que ejercería su efecto en *trans* sobre los determinantes de la SMasa y la proteína de 27 kDa (con independencia de si éstos se encuentran juntos o separados en el cromosoma).

**Tabla 3.1.1.** Principales características de los mutantes obtenidos por transposición con Tn1545.

	Hly (58 kDa)	SMasa	27 kDa	CAMP ( <i>R. equi</i> )
<b>WT</b>	+++	35,55	+	pala grande
<b>8/6</b>	-	28,7	-	pala grande
<b>44/2</b>	+++	3,5	-	cerilla

Nótese como mientras en 8/6 no existe producción de la proteína de 27 kDa, si existe actividad SMasa. Por el contrario, en 44/2 no existe producción de la proteína de 27 kDa y la actividad SMasa residual se corresponde probablemente a la actividad SMasa de PlcB (véase apartado 3.2.2.2.4 y 182,196,561).



**Figura 3.1.2.** Ensayos de virulencia en el modelo murino. Curvas de aclaramiento en el hígado de ratones *Swiss* infectados experimentalmente con una misma dosis por ratón de  $2.5 \times 10^5$  de WT y 44/2.

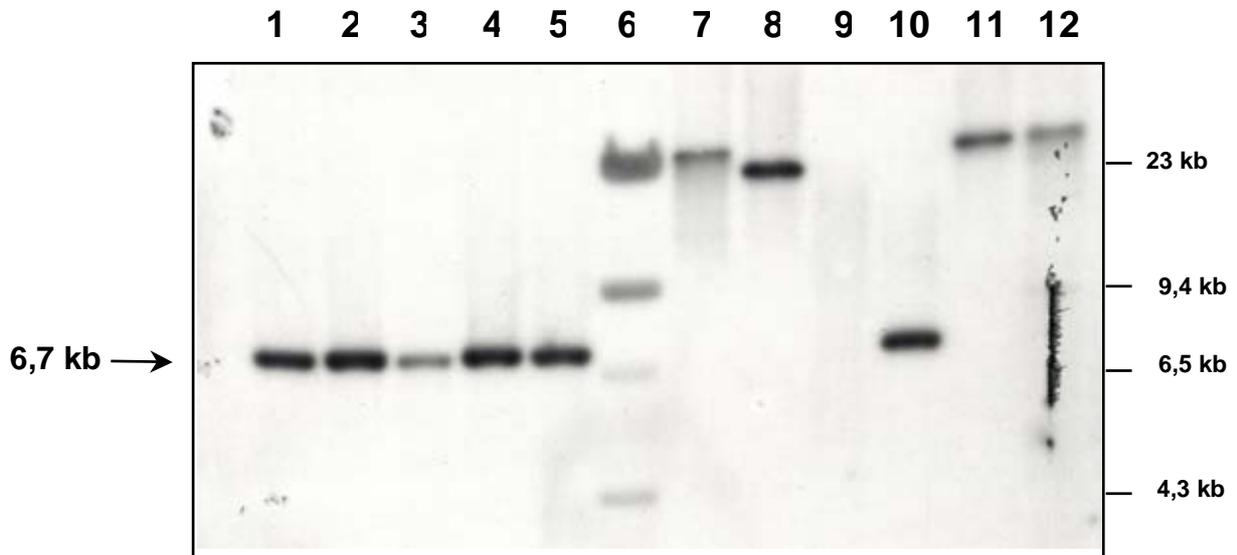
### 3.1.2.2. Mapeo de la inserción de Tn1545 en el mutante 44/2 y clonaje de la región cromosómica flanqueante.

Con el fin de estudiar si la inserción del transposón es la responsable del fenotipo exhibido por 44/2, así como para analizar los posibles determinantes genéticos implicados en la alteración fenotípica que presenta este mutante, procedimos a caracterizar el punto de inserción del Tn1545 y su región flanqueante. Para ello, en primer lugar, determinamos el número de copias del

transposón en 44/2, ya que sólo en el caso de que se hubiera insertado una única copia tendríamos posibilidad de asociar el efecto observado con un punto concreto del cromosoma bacteriano.

Para determinar el número de copias de Tn1545 en el mutante 44/2, se analizó por *Southern blot* el DNA cromosómico del mutante digerido con diferentes enzimas de restricción (Fig. 3.1.3). Como sonda se utilizó el gen de resistencia a la kanamicina (*aphA-3*) situado en el extremo izquierdo del transposón (71). El análisis reveló que el mutante presentaba una sola copia de Tn1545 insertada en el cromosoma (Fig. 3.1.3). Asimismo se observó que, utilizando la enzima de restricción *HindIII*, se obtenía un fragmento de DNA de aproximadamente 6,7 kb que contiene el extremo izquierdo del Tn1545, incluyendo *aphA-3*, y una pequeña parte de DNA cromosómico flanqueante de la inserción. Este fragmento *HindIII* de 6,7 kb fue clonado en el vector pBR322 dando lugar al plásmido pGM10, que fue seleccionado por la resistencia a kanamicina que le confiere el inserto procedente de 44/2 y la resistencia a ampicilina propia del vector. La identificación de pGM10 se confirmó mediante *Southern Blot* (Fig. 3.1.4).

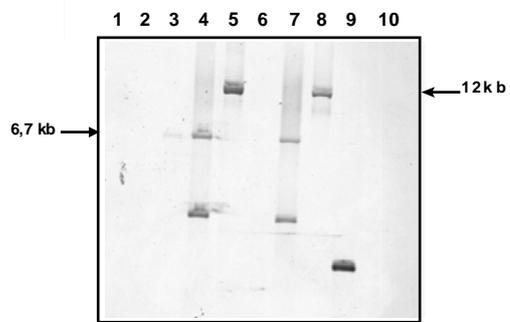
La secuenciación del inserto en pGM10 reveló que éste consistía en un fragmento de 190 bp rico en estructuras secundarias palindrómicas (Fig. 3.1.9), que no correspondía a ninguna fase de lectura abierta. Se ha descrito que la integración del Tn1545 ocurre por una recombinación homóloga entre sus extremos finales y una secuencia diana (118). Utilizando el fragmento de 190 bp como sonda en un nuevo *Southern blot*, mapeamos en el cromosoma de *L. ivanovii* WT la región donde se había insertado el transposón en el caso de 44/2 (Fig. 3.1.4). Se identificó así un fragmento *HindIII* de 2,6 kb apropiado para realizar un clonaje. Se digirió el DNA cromosómico de *L. ivanovii* WT con *HindIII* y se construyó una librería con los correspondientes fragmentos en el vector pBR322. A continuación, se transformó con esta librería *E. coli* DH5 $\alpha$ , y se identificaron aquellos transformantes que poseían el fragmento de 2,6 kb mediante hibridación de las colonias con la sonda de 190 bp anteriormente citada. El nuevo plásmido, con el inserto procedente de WT clonado en pBR322, fue denominado pJ14.



**Figura 3.1.3.** Análisis por *Southern blot* del número de copias del transposón en el mutante 44/2. El DNA cromosómico de 44/2 fue sometido a digestiones simples con las enzimas de restricción *XbaI* (calle 7), *PstI* (calle 8), *KpnI* (calle 9), *HindIII* (calle 10), *EcoRI* (calle 11), *BamHI* (calle 12) y digestiones dobles utilizando cada una de las enzimas anteriores junto con *HindIII* (calles 1-5). Tn 1545 tiene un tamaño de 25,3 kb y no presenta un sitio de corte para *BamHI* ni *EcoRI* pero sí con *HindIII*, uno de los cuales se sitúa a 6,6 kb de su extremo izquierdo (caillaud). La hibridación con una sonda derivada de este extremo del transposón, que contiene el gen *aphA-3* que confiere resistencia a la kanamicina, reveló la presencia de una única banda en todas las digestiones, lo que pone de manifiesto que sólo existe una copia de Tn 1545 en el cromosoma de 44/2. Además, el tamaño más pequeño de banda se consiguió con la digestión sencilla mediante *HindIII* (6,7 kb) que a su vez coincidía con el obtenido mediante las digestiones dobles, lo que nos sugería que a escasa distancia del extremo izquierdo del punto de inserción se encontraba una diana para *HindIII*. En la calle 6 se muestra el marcador de talla de los fragmentos de DNA del fago digerido con *HindIII* y los números a la derecha indican el tamaño de las bandas del marcador.

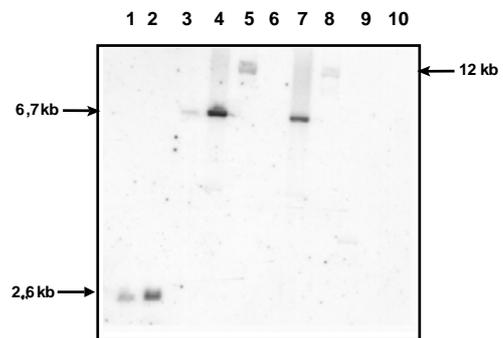


**A.**



**Sonda extremo  
izdo. Tn1545**

**B.**



**Sonda pGM10**



**Figura 3.1.4.** Análisis por *Southern blot* del plásmido pGM10 conteniendo el fragmento *Hind*III que abarca el punto de inserción de Tn1545 clonado en el plásmido pBR322. Se han utilizado los DNAs cromosómicos de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup> (calle 1); *L. ivanovii*-SmR (calle 2) y mutante 44/2 (calle 3) digeridos con *Hind*III, así como pGM10 digerido por *Hind*III (calles 4 y 7) y *Eco*RI (calles 5 y 8). Se empleó como control positivo la sonda clonada en el vector pUC18 (calle 9). La calle 10 muestra el bandeo del marcador de talla de los fragmentos de DNA (DNA del fago digerido con *Hind*III). La calle 6 no tiene muestras.

**Panel A.** Hibridación utilizando como sonda el extremo izquierdo del transposón. Se aprecian señales de talla idéntica en el DNA cromosómico de 44/2 y en pGM10 digeridos con *Hind*III (calles 3, 4 y 7) pero no en el caso de los DNAs cromosómicos WT y SmR-*L. ivanovii* (calles 1 y 2). Las bandas únicas obtenidas en el caso de las calles 6 y 9, corresponden al pGM10 linealizado, cuyo tamaño es igual al vector pBR322 más el fragmento clonado (4,3+6,7=12 kb).

**Panel B.** Hibridación con el vector pGM10. Se comprueba la existencia de una señal con el mismo tamaño (6,7 kb) en pGM10 y el DNA de 44/2 digeridos con *Hind*III (calles 4, 5 y 9) que coincide con la talla del fragmento clonado. Por el contrario, en el caso de los DNAs de las cepas WT y SmR (calles 1 y 2) se puede observar una banda de 2,6 kb que se corresponde con el tamaño del fragmento *Hind*III del cromosoma donde el transposón se insertó en 44/2.

### 3.1.2.3. Caracterización genética de la región de inserción del transposón en 44/2.

Para determinar cuál de las dos hipótesis de trabajo que enunciábamos en el apartado 3.1.2.1 era la que realmente explicaba las consecuencias fenotípicas de la inserción del transposón en 44/2, procedimos a secuenciar el fragmento *Hind*III de 2,6 kb de pJ14. Ello nos permitió identificar una región del cromosoma de *L. ivanovii* integrada por dos fases de lectura abierta, *orfD1* y *orfD2*, cuya organización genética se muestra en la Fig. 3.1.6.

***orfD1.*** Su putativo codón de iniciación, ATG, se encuentra 132 bp corriente abajo del punto de inserción del transposón, precedido por un RBS (AGGAAG) situado 7 bp corriente arriba. Las predicciones del programa GCG versión 10.0 para UNIX de la Universidad de Wisconsin, indican que esta ORF de 450 bp de longitud codifica una proteína de 150 aa, con una posible masa molecular de 17,31 kDa y pI de 5,06. La comparación de esta proteína con las bases de datos disponibles revela que presenta una homología de un 67,1% de similitud y un 54,3% de identidad a lo largo de toda su secuencia con YkuL de *B. subtilis*, para el que aún no se ha descrito una función conocida (167). No presenta péptido señal por lo que constituye una proteína de localización citoplásmica. Como podemos apreciar en la Fig. 3.1.8, los cuatro últimos nucleótidos (incluyendo el codón de terminación TGA) están solapados con el inicio de la siguiente ORF, *orfD2*.

***orfD2,*** comienza con un codón de iniciación ATG precedido en 6 bp por un RBS con la secuencia consenso GGAGGA. *OrfD2* tiene un tamaño de 876 nucleótidos y codifican una proteína de 292 aa con una masa molecular estimada de 33,33 kDa y un pI de 6,86. La ausencia de péptido señal predice una localización citoplasmática. El análisis comparado de esta proteína en las bases de datos indica que presenta una gran homología con miembros pertenecientes a la familia LysR de reguladores transcripcionales (*LysR-type transcriptional regulators*, LTTRs) (507,234). La mayor homología la manifiesta con YkuM de *B. subtilis* (65,4%

de similitud y 53,9% de identidad para el conjunto de la proteína) e YbhD de *E. coli* (33,8% de similitud y 23,0% de identidad en el total de la proteína), de función desconocida (118,167).

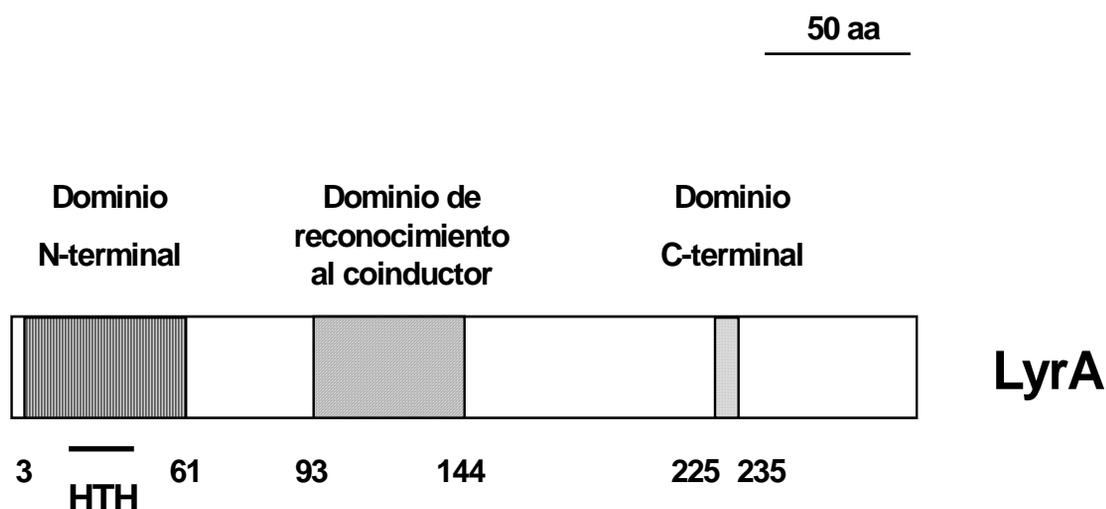
Se han definido tres dominios funcionales presentes en todos los reguladores tipo LysR (507): (i) un dominio N-terminal (residuos 1-66), que incluye un motivo hélice-giro-hélice (HTH) situado entre los aa 23 y 42, implicado en la unión al DNA y altamente conservado entre los distintos miembros de la familia LysR; (ii) un segundo dominio localizado entre los aa 149 y 154, implicado en el reconocimiento del coinductor y en la respuesta al mismo; (iii) situado en el extremo C-terminal, entre los aa 196 y 206, se encuentra un tercer dominio también implicado tanto en la unión al DNA como en la respuesta al coinductor, así como en la dimerización de la proteína. En dicha familia, el dominio HTH es el responsable de la unión a las secuencias diana localizadas en las regiones promotoras de los genes que controla. Los reguladores de la familia LysR reconocen un motivo con la secuencia consenso T-N<sub>11</sub>-A, que forma parte de un palíndromo interrumpido de 15 bp, localizado generalmente en la posición -65 de los genes bajo su control (190,507). Comparando la proteína codificada por *orfD2* con la secuencia consenso establecida para los tres dominios funcionales en los reguladores tipo LysR (507), hemos comprobado que comparten las características estructurales y los dominios funcionales propios de los miembros LTTRs (Fig. 3.1.5). En consecuencia, podemos afirmar que dicha proteína pertenece a la familia LysR de reguladores transcripcionales, por lo que hemos denominado *lyrA* al gen (*lysR-type regulator A*), y *LyrA* a la proteína codificada. En numerosas ocasiones, los genes dianas se encuentran situados próximos al LTTR precedidos en sus zonas promotoras por motivos de unión de esta familia de reguladores (507). En nuestro caso, hemos identificado palíndromos imperfectos con el motivo T-N<sub>11</sub>-A, compatibles con las secuencias diana de LTTRs, en las zonas promotoras de *orfD1* y *orfD2* (Tabla 3.1.1).

Hemos denominado locus *lyrA* a la región cromosómica integrada por *orfD1* y *lyrA*, que se encuentra encuadrada entre la estructura palindrómica situada inmediatamente corriente arriba al lugar de inserción del transposón en 44/2 y el extremo final de *lyrA* (Fig. 3.1.6).

#### **3.1.2.4. Caracterización de la región del locus *lyrA* de *L. ivanovii*.**

Hemos localizado un palíndromo compatible con un motivo de unión de LTTRs al DNA 16 pb corriente arriba del punto de inserción de Tn 1545 (Fig. 3.1.7). Este palíndromo está rodeado por una zona particularmente rica en A+T,

**A**



**B**

**Dominio N-Terminal**

-----  
 HTH  
 -----

**C.6** hpLRpLRxFxxhxpppphSxAApXLphSQPAhSxQhppLEpxLGxxLFxRxpRhxhxxTxA 66  
**L.3** vteyeLlvclaeelnmrksAekLflSQPALsqrllqtiEsrwntkiFiRtqkgllltpeg 61

**Dominio de reconocimiento del coinductor.**

**C. 98** LxIGx<sub>8</sub>hLPx<sub>10</sub>Px<sub>5</sub>Lx<sub>11</sub>LpxxxphDhh 150  
**L. 93** LRIAx<sub>8</sub>WLPx<sub>10</sub>Px<sub>5</sub>Lx<sub>11</sub>LAAGNVHIG 144

**Dominio C-terminal.**

**C. 236** VxxGxGVxVLP 246  
**L. 225** ALNGIGFAILP 235

**Fig. 3.1.5.** Principales características estructurales de LyrA.

**Panel A.** Esquema de los dominios funcionales característicos de un regulador tipo LysR identificados por homología de secuencias en LyrA.

**Panel B.** Alineamiento entre la secuencia consenso (fila superior C.) descrita para cada dominio por Schell y Viale (482), altamente conservada entre los distintos miembros pertenecientes a la familia LysR, y la secuencia de LyrA (fila inferior L.); x representa cualquier residuo; h, residuo hidrofóbico (V, IN-1, L, M); p, residuo hidrofílico (T, S, N, Q, D, E, K, R, H). En mayúsculas y negrita se indican aquellos residuos coincidentes entre la secuencia consenso descrita por Schell y Viale y LyrA. El dominio HTH ha sido identificado utilizando la aplicación NPS@, disponible en <http://pbil.univ-lyon1.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=npsa-htl.html>.

atributo que presentan algunos promotores sujetos al control ejercido por un regulador tipo LysR (577). Además, hemos identificado el regulador *lyrA* que pertenece a la familia LTTRs corriente abajo del punto de inserción del transposón. Estos datos parecen indicar que el transposón se ha insertado en una región que puede afectar a la expresión de un regulador tipo LysR, por tanto, esto refuerza nuestra hipótesis de trabajo de que el fenotipo de 44/2 se debe a la inactivación de un regulador que controla la expresión de los determinantes genéticos responsables de la producción de la proteína de 27 kDa y la actividad SMasa. Los reguladores tipo LysR suelen controlar genes situados en sus inmediaciones (507). Con el fin de determinar la posible presencia en la zona del locus *lyrA* de los determinantes genéticos cuya expresión está afectada en 44/2, realizamos *genome walking* mediante sucesivas PCRs inversas hasta ampliar la región cromosómica analizada a 7,02 kb (véase materiales y métodos y Fig. 3.1.6). Se identificaron seis nuevas ORFs, de las cuales cuatro de ellas, *orfU4*, *orfU3*, *orfU2* y *orfU1* están localizadas en la zona situada a la izquierda de Tn1545 y dos más, *orfD3* y *orfD4*, se sitúan a la derecha del punto de inserción del transposón (Fig. 3.1.6 y 3.1.12).

***orfU4***. Tiene su origen en un codón GTG precedido por un sitio potencial RBS (GGAAAG) localizado 5 bp corriente arriba y finaliza en un codón *ocher* (TAA) seguido a 30 bp de su extremo 3' por una estructura palindrómica de 22 nucleótidos, que podría funcionar como señal de terminación transcripcional. *orfU4* tiene un tamaño de 681 nucleótidos y codifica una posible proteína de 286 aa con un tamaño de 30,16 kDa y un pl de 5,35. La ausencia de péptido señal predice su localización citoplásmica. Presenta un 59,6% de identidad para el conjunto de la proteína con YkwC de *B. subtilis*, de función desconocida, si bien presenta similitudes con la enzima 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa, implicada en el metabolismo de aminoácidos (310).

***orfU3***. Su inicio está precedido por una secuencia RBS consenso (GAAAGG) y su codón de terminación se solapa con la estructura palindrómica descrita para *orfU4*. *orfU3* tiene un tamaño de 1143 bp y se transcribe de forma divergente al resto de los genes presentes en esta región. Codifica una proteína de 381 aa, con una masa molecular de 42,6 kDa y un pl de 5,33. La ausencia de péptido señal predicen una localización citoplásmica. Esta proteína presenta un 54,8% de identidad en el total de su secuencia con PatA de *B. subtilis*, una enzima de la clase I de aminotransferasas dependientes de piridoxal fosfato. Estas transaminasas se han dividido en tres clases (586) y,

Figura 3.1.6 Locus *lyrA*: *apaisada al final de la bibliografía*

basándonos en las características de su secuencia, el producto de *orfU3* pertenecería al grupo representado por las aspartato aminotransferasas de *Sulfolobus solfataricus*, de especies termófilas del género *Bacillus* y de tirosina aminotransferasas eucariotas. Por ello hemos denominado a OrfU3, AmaA (aspartato aminotransferasa A) y *amaA* al gen que codifica esta proteína.

**orfU2.** Se inicia con el codón ATG que está precedido por un probable RBS (AAGGGG) situado a 9 bp del codón de iniciación. Tiene un tamaño de 219 bp que codifican una posible proteína de 73 aa y 8,2 kDa de masa molecular. Su análisis comparado con las bases de datos disponibles indica que no presenta homologías significativas con ninguna proteína. A 2 bp del extremo 3' de su codón de terminación se encuentra una estructura palindrómica de 42 bp que podría constituir un terminador transcripcional.

**orfU1.** Comienza con el codón de iniciación ATG precedido por una posible caja RBS (GAGAGG) situada 9 bp corriente arriba. La secuencia aminoacídica deducida está formada por 77 aa que codifican una proteína de 8,95 kDa y un pI de 4,3. Presenta un alto grado de homología (51,3% de identidad para el conjunto de su secuencia) con la proteína YkuJ de *B. subtilis* con función, por el momento, desconocida (310). A 25 bp del extremo 3' de su codón de terminación se encuentra una estructura palindrómica interrumpida de 51 nucleótidos que finaliza exactamente en el lugar donde ha tenido lugar la inserción del transposón Tn 1545.

**orfD3.** Localizado a 51 nucleótidos del codón de finalización de *lyrA* se encuentra el codón de iniciación de *orfD3*, ATG, precedido en 9 bp por el RBS AGGAGA. Codifica una proteína de 236 aa, con una masa molecular estimada de 24,84 kDa y un pI de 5,32 y de localización citoplásmica por no presentar péptido señal. Muestra una gran homología (74,1% de identidad para el conjunto de la proteína) con YkuQ de *B. subtilis* (310), que es similar a la enzima metabólica tetrahidrodipicolinato succinilasa responsable del cuarto paso en la biosíntesis de diaminopimelato y lisina a partir de aspartato semialdehído (427). Hemos denominado a este nuevo gen *dapD* y DapD a la proteína codificada, por analogía con la nomenclatura de sus genes homólogos en otras especies bacterianas como *E. coli* (148), *Haemophilus influenzae* (156) o *Mycobacterium bovis* (118). Dos nucleótidos corriente arriba del codón de finalización, se inicia una estructura palindrómica de 22 nucleótidos que podría funcionar como terminador transcripcional.

**orfD4.** Tiene un tamaño de 1116 nucleótidos y comienza con el codón de iniciación GTG, precedido a 6 bp por un RBS con la secuencia GGAGAG. Codifica una proteína de 372 aa con una masa molecular de 41,41 kDa y un pI de 5,62. Como el resto de las proteínas localizadas en este locus no presenta péptido señal lo que predice su localización citoplasmática. La búsqueda de homologías en las bases de datos de esta proteína reveló la mayor similitud (59,5% de identidad para el total de su secuencia) con YkuR de *B. subtilis*, de función desconocida pero similar a hidrolasas del hipurato (310), por lo que hemos denominado a este gen *hipA* (*hippurate hydrolase A*) y HipA a la proteína que codifica.

Así pues, ninguno de los genes identificados en las zonas adyacentes al locus *lyrA* codificaba proteínas susceptibles de ser los factores ausentes en el mutante 44/2. Esta

conclusión se vio corroborada por la identificación de los genes codificantes de la actividad SMasa y la proteína de 27 kDa de *L. ivanovii*, *smcL* (196) e *i-inIE* (144), respectivamente, los cuales fueron identificados paralelamente al desarrollo de este estudio, en nuestro laboratorio por B. González-Zorn (*smcL*) o en un entorno de colaboración entre nuestro grupo y el grupo de la Universidad de Würzburg, por F. Engelbrecht (*i-inIE*). Para ello, siguieron una estrategia basada en el uso de oligonucleótidos degenerados. Esto descartaba la hipótesis de que el fenotipo de 44/2 fuese debido a un efecto polar de la inserción del transposón sobre genes situados en sus inmediaciones.

El análisis de las secuencias de las zonas promotoras de ambos genes nos permitió comprobar la existencia de secuencias consenso compatibles con cajas tipo LysR (Tabla 3.1.1). Además, análisis de *Northern blots* realizados con sondas específicas de *smcL* e *i-inIE* (Fig. 3.1.7) mostraron que ambos genes se transcribían independientemente y de forma monocistrónica, por lo que quedaba descartada la hipótesis de que existiera un efecto polar sobre su expresión y cobraría fuerza la hipótesis de que la expresión de *smcL* e *i-inIE* estén sujetos a una regulación común mediada probablemente por un regulador de la familia LysR. Estos hallazgos abrían la posibilidad de que el fenotipo de 44/2 fuese debido a la inactivación (o la alteración de la expresión) de *lyrA*, cuyo producto estaría regulando positivamente en *trans* a *smcL* e *i-inIE*.

**Tabla 3.1.2.** Cajas LysR en las zonas promotoras de distintos genes de *L. ivanovii*.

	<b>Caja tipo LysR</b>
<b><i>orfD1</i></b>	AAGCTGT <b>G</b> AA-N <sub>5</sub> -TTC <b>A</b> CAGCTT
<b><i>lyrA</i></b>	TTTC---N <sub>9</sub> ---G <b>A</b> AA
<b><i>smcL</i></b>	TGA--N <sub>7</sub> --T <b>C</b> A
<b><i>i-inIE</i></b>	TTTt <b>T</b> AA--N <sub>7</sub> --TT <b>A</b> aAAA

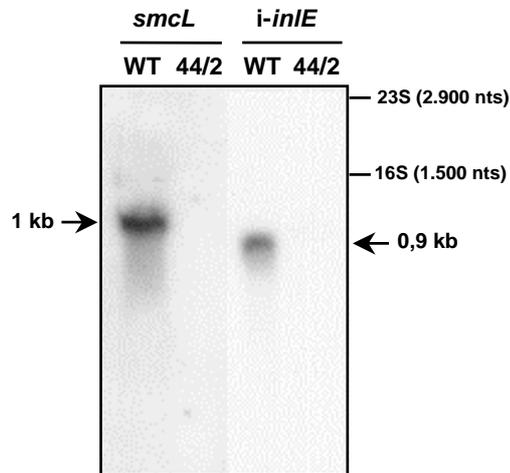
En negrita se destacan los nucleótidos de la caja consenso T-N<sub>11</sub>-A. N representa cualquier nucleótido y los desperejamiento con respecto a la secuencia palindrómica se indican en minúsculas.

Para contrastar esta hipótesis, analizamos el patrón de transcripción de *smcL*, *i-inIE*, y de los genes identificados en la región *lyrA* (*orfD1*, *lyrA*, *dapD*, *orfU1*, *orfU2* y *amaA*) en 44/2 y WT cultivadas en BHI a 37°C y extrayendo el RNA total al final de la fase exponencial de crecimiento. Los niveles de transcripción de los distintos genes se determinaron semicuantitativamente mediante la técnica de *Slot blot*, hibridando con sondas específicas de cada uno ellos. Dichas sondas se obtuvieron mediante PCRs, posteriormente purificadas, utilizando los oligonucleótidos P24A/B (*i-inIE*); SPM-R/S (*smcL*); MD2/24 (*lyrA*); GD12/8 (*orfD1*); GD26/33 (*dapD*); GD29/9 (*orfU1*) y GD50/39 (*amaA*).

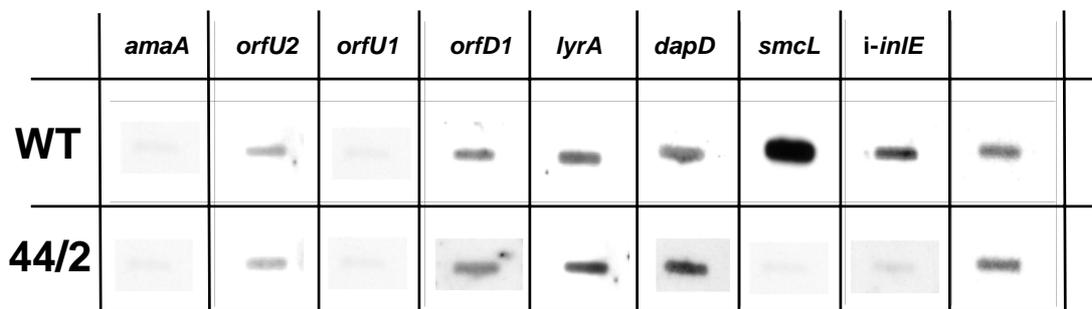
Todos los genes analizados en estas condiciones presentaron un patrón de transcripción similar tanto en el mutante 44/2 como en su cepa parental WT, salvo en el caso de *smcL* e *i-inIE*, cuya transcripción era elevada en WT e indetectable en 44/2 (Fig. 3.1.7). Las comparaciones de los niveles de transcripción se realizaron analizando las hibridaciones con las distintas sondas de radiogramas expuestos durante el mismo tiempo (20 horas).

Por lo tanto, el análisis de la transcripción de los genes situados en la región flanqueante al punto de inserción de Tn1545 demuestra que no existe, al menos en las condiciones analizadas, ninguna diferencia entre la cepa WT y 44/2 por lo que un efecto de la inserción del transposón en la expresión de dichos genes resulta difícilmente probable. Por el contrario, y como era de esperar, *i-inIE* y *smcL*, responsables de la producción de la proteína de 27 kDa y de la actividad esfingomielinasa C, respectivamente (144,196), presentan un patrón claramente diferente de su transcripción. Teniendo en cuenta que la transcripción del regulador *lyrA* no está alterada en 44/2, su posible papel en el control de *i-inIE* y *smcL* que explicaría la ausencia de su expresión en el mutante, tendría una difícil justificación.

**A.**



**B.**



**Figura 3.1.7.** Análisis transcripcional de los genes *smcL*, *i-inIE*, así como del locus *lyrA* y sus regiones adyacentes en la cepa de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup> (WT) y su mutante 44/2. El RNA total ha sido extraído a partir de cultivos en BHI a 37°C al final de la fase exponencial de crecimiento.

**Panel A.** Análisis por *Northern blot* de los genes *smcL* e *i-inIE*. Cantidades equivalentes de cada cepa (10mg) cargadas por cuadruplicado fueron sometidas a electroforesis y posteriormente transferidas a una membrana de Nylon que fue cortada en cuatro fragmentos correspondiente cada uno de ellos con las muestras de cada cepa. Cada uno de estos fragmentos de membrana con las muestras de RNA fueron sometidos a la hibridación con su sonda correspondiente. Las sondas de DNA empleadas son las mismas utilizadas para los *slot blots* y se indican en el texto. Las posiciones y tamaños aproximados de los rRNAs 23S y 16S son utilizados como marcadores de talla molecular. Los distintos transcritos están indicados por una flecha con el tamaño aproximado a su derecha. Las sondas utilizadas están indicadas en la parte superior de cada calle.

**Panel B.** Análisis por *slot blot* de la transcripción de los genes del locus *lyrA* (*lyrA*, *orfD1*); de la región flanqueante *dapD*, *orfU1*, *orfU2* y *amaA*; y de los genes *smcL* e *i-inIE* en las cepas WT y 44/2. Se utilizaron como sondas los fragmentos internos a cada gen obtenidos por PCR empleando los oligonucleótidos indicados en el texto, posteriormente purificadas y marcadas radioactivamente. Se hibridó con el plásmido pKK3535 que contiene el operón *rnmB* de RNA ribosómico de *E. coli* (61), como control de la cantidad de RNA total fijado para cada muestra en la membrana. No se observa ninguna diferencia entre ambas cepas en el patrón de expresión de los genes pertenecientes al locus *lyrA* o a sus regiones flanqueantes. Por el contrario, a diferencia de lo que ocurre en WT, no existe expresión de *i-inIE* y *smcL* en el mutante 44/2.

control de *i-inIE* y *smcL* que explicaría la ausencia de su expresión en el mutante, tendría una difícil justificación.

---

**Figura. 3.1.8.** Secuencia de nucleótidos de las regiones flanqueantes al punto de inserción de Tn1545 obtenido a partir de *L. ivanovii* ATCC 19119 (registrada con el número de acceso: X98994). La correspondiente traducción a aminoácidos aparece debajo en código unilettra. La posición nucleotídica se indica a la izquierda. Nótese como desde la posición 1201 hasta la 2400 se representa la cadena complementaria, es decir, la cadena con sentido para la transcripción de *amaA*. Los codones de inicio de la traducción y los tripletes de terminación están resaltados en negrita. El inicio de traducción de los distintos genes está indicado con el nombre del gen correspondiente seguido de los signos >/< que indican su sentido de traducción. Las flechas en la parte inferior de la secuencia de nucleótidos indican repeticiones invertidas susceptibles de actuar como terminadores de la transcripción. El posible dominio hélice-giro-hélice de LyrA aparece recuadrado. En las regiones intergénicas de *orfD1* y *lyrA* los puntos de inicio de la transcripción, identificados experimentalmente mediante *Primer extension*, están indicados por "P<sub>1</sub>" y "P<sub>2</sub>"; las posibles secuencias -10 y -35 así como el RBS se encuentran subrayados. Los motivos T-N<sub>11</sub>-A presentes en secuencias palindrómicas invertidas compatibles con cajas tipo LysR se señalan con una doble línea discontinua en la parte superior de la secuencia (los nucleótidos consenso T y A están en negrita). Las principales enzimas de restricción empleadas se encuentran indicadas con una línea en la parte superior de su secuencia diana. Un triángulo indica el lugar de inserción del transposón en el mutante 44/2.

TaqI

1 TCGAAAAAGAAAATGGATGCGATTATGTCTGAGTATAATAGCTTGTTTTCAACAAATAAT  
61 TTTTCATTTATTCCGAGCAAGTTTGTACGTTAAAAAAGCAGGTTTGAAGAGTCAAGGGATA

121 GGTGCAAAAACAGCATTATATTATATACCCAATGCGCTTATAAGAGAGTTTATTGCGATT  
181 GTCGTTATGTATAAAAAAGTACATATTTTTTTAGTTGGATTAATTAGTATCTTTTTTTGCG

RBS

241 GTTTTATCTATTATTGGACTTAGCTTTAGGTAGGAGGTTTTTTGGAAATGAAGAAAATAGG  
M K K I G

301 ATTTGTAGGCACCGGTGTTATGGGTGTGAGCATGGCTTCTCACTTGCTTGAAGCAGGGTA  
F V G T G V M G V S M A S H L L E A G Y

361 TGAGTTTTTTGTGTATACGCGAACTAAATCAAAGCAGAAGGGCTTTTAGAGAAAGGTGC  
E V F V Y T R T K S K A E G L L E K G A

421 GCACTGGGAAGCGGAGCCAAATGACTTAGCGGCGAAAGTAGATGTGCTCATTTCATGGT  
H W E A E P N D L A A K V D V L I S M V

481 AGGCTATCCAAAAGATGTTGAGACACTCTATTTAGGTGAAGCGGGCTTTTAAATCATT  
G Y P K D V E T L Y L G E A G F L N H L

541 GAAACCGGGATCTATAGCTATTGATATGACAACCTTCTCTCCAGCATTAGCAAAAAAAT  
K P G S I A I D M T T S S P A L A K K M

601 GGCTCAAGTTGGTAGTAAAAAGGAATCGGCGTTTTGGATGCTCCAGTTTCAGGTGGGGA  
A Q V G S E K G I G V L D A P V S G G D

661 TATTGGTGCAAAAATGGAACACTAGCGATTATGGTTGGTGGGGATGAAGCTATTTTTCT  
I G A K N G T L A I M V G G D E A I F L

721 AAAAGCAGAACCAATTTTCGCTATTTCTGGTAGTAGTGCTATTTTACAAGGAGAAGCAGG  
K A E P I F A I L G S S A I L Q G E A G

HincII

781 TTCCGACAACATACGAAAATGGTTAACCAAATTGCGATTGCATCCAATATGATTGGTGT  
S G Q H T K M V N Q I A I A S N M I G V

841 AACAGAAGCGATTATTTATGCGAAAAAGCCGGACTTAACCCCTCTCGTGTACTGGAATC  
T E A I I Y A E K A G L N P S R V L E S

901 TATTTCTGGTGGAGCGGCAGGTAGTTGGTCACTTACCAATTTGATTCCTCGCGTACTCAA  
I S G G A A G S W S L T N L I P R V L K

961 AGATGATTTTTACCAGGCTTTTTTATAAAGCATTATTAAGATATGGGAATTGCTAT  
D D F S P G F F I K H F I K D M G I A I

1021 TTCGGAAGCACAACAAATGGGACTGGAGTTACCAGGGCTTATGCTAGCTGAAAAATGTA  
S E A Q Q M G L E L P G L M L A E K M Y

1081 CGAAACATTGGCTGAACGCGGGCTAAGTGAAGAAGGAACACAAGCATTAAATTAATATTA  
E T L A E R G L S E E G T Q A L I K Y Y

TaqI

1141 TCGTTAAAGAACAGCTACTAAGATTAGTAGCTGTTTCGAAAAGCCAAAGTAGAAAGTTGCT  
R end  

1201 AACCAAAAATAACGAATTCTTTCGTCGGTAAGCCAGATCACGAAGACGATCAAATAAT  
end K S L F A A M R D L A E A L K N

1261 TTTCTTACCCTATCTTTTCAGCCTTTTTGCCAGCGGAAAAAGACTTTTTTCGTAACGGA  
F S T A Y S L R F F R D G K E S F A N G

HindIII

1321 CCTTGATGACGTTGAAAACGAAGAAGACGTTTCGAACTGTTCGGGTCAGTTTTCTTAAAGC

P V V A V K A E E A L K V A W D F S N E

1381 CATTAGAGTAGACCGTCAAAATGCTTCTTTATTTTTTCGCGGTAGTCCACCTTGTGGCAC  
T I E D P L K V F F Y F A G D P P V V T

1441 TTAGGGTAAAAAGATTTGCTAGAACACACTTCAAACGAGATCAAAATATAAGCCATGCG  
F G M K E L R D Q T F N A R T K Y E T R

1501 TAACTTTTCGTAGTAGGAACGGTAAACACTACCGAAGATTTTCGACGAAAACTCTTTAT  
M Q F A D D K G N T I A E L A A K Q S I

1561 CTCGAGCGCGTTCATTGCCTTATAACTACCTAAAAGTTGTAAACAAACCACTAATAAAGT  
S S A C T V S Y Q H I K L M Q K T I I E

1621 CCACGTTTCGTCTTTTGGTTAAGCGGTTCGGTTAGTAGCGCACCTAAACCTATCCGGCAAT  
P A L L F G I R W G I M A H S K S L G N

1681 TAGTGCTAACAAACAAGAGCTTCGTATCCTCGCTATGATCGTACAAGAAGCACTATCTAA  
I V I T Q E R L M P A I S A H E E H Y I

1741 TTAAGCGATATCTAAAGTAGTCGTTATTGTTTTTATGGTCAAGAGAATTTTGTAACGA  
L E S Y I E D A I V F I G A E R L V N A

1801 TTTAGGTGGTCAAGAAGAAAACAATTTGATTGTGGTCAACCTAACCTTCCATTCCCTTAT  
L D V L E E K T L S V G T P N S P Y P I

1861 TATTCGCGAAAAACAAAATCCACATTACACAAAGGCATTAACGCATCCCCAATTAACCTT  
I L A K T K P T I H K R L Q T P T L K F

1921 AATCAAAGACAACACAGATAAGAATAGCCTACACGAAACAAATTTTCATTATTCACCAAGT  
N T E T T D I R I P H A K N L T I L P E

1981 ATCGGTCCTATTTAGCCTAGTCCATTTTATTGAAGTAGTGGACCGAGTTCTTACCAAACG  
Y G P Y I P D P L I V E D G P E L I T Q

2041 TCACGTTGGCTCTATCGAAGACATCGGGGTGACACTGCTATTAAAGTAAACACAACATA  
L A V S I A E T A G V T V I I E N T N Y

2101 AGATTCAATATAAAAAAGAACTTTTCATTCATCTTCGACGGAGATTGTCAAGACCGTATGGC  
E L N Y K E Q F Y T S A A E L L E P M G

2161 CGTAATCCTCATATCAACCACTTTAATAGGACTTAACGAACTTACCGCCGAACAACTGT  
A N P T Y N T F N D Q I A Q I A A Q K V

2280 ACAAGACCACAACCTTTTAGTCCAAGTGGTTCACAGTTTGCTTAGTATAGACCTTATGGT  
H E P T P F D P E G L T L R I M D P I G

2340 CACTGAGAACATAACTTTTCGAGACTATGGTGAATGAACTTATAGCACATTAAGTCCAGCG  
T V R T N F A R I G S V Q I D H L E P R

Clal < **amaA** RBS

2341 GTAGCTAA**AA**ACAGTAAAAGCAGTGGAAAGAAAGCATCTTTTAGGGCCGCTCAAATCGACC  
W R N Q

HindIII

2401 GAGTAAGCTTCATAATTTTCATTCCATTATAGCCTAAAAAGTAAAAAAGCAAAATGTCTG  
2461 AAAATATTACTAAAAACCTTGCACCTTCATTTAGAATGCTATAAGATAGTTTTTAATAAT

RBS **orfU2**>

2521 GATAATCGTTTTTCAGTTAGAGATGATTGGTTGAAATTGG**AA**GGGGCCAGTGGAT**AT**GATG

M M

2581 AAACCAGGTAATATGAAGCTCTCTTTTCCCAACAAAAGATGGCTTGTAAAAATACAT  
K P G K Y E A L F F P T K D G L L K I H

2641 GCATACGGCTTTAATCCTTGTGGCTCTTGGGGCGAGGTATTTGCGACAATTGGTGACCAA  
A Y G F N P C G S W G E V F A T I G D Q

2701 ACGATTTGTGTAAGGATTTAATCGTCATAAAACCATTGTTGCGCGACAAAGATGATT  
T I C V K G F N R H K T I V R A T K M I

2761 ATTAGTACAACAGCCAACCGCAAAAATGAATTT**TAAT**TAAAAAAGACTATAAAAAAGTTT  
I S T T A N R K N E F end 

2821 **TGACT**TTTTTATAGTCTTTTTTTAGGATTAAAAGTGCATAAAACAGAACAAAAAGTACT  


2881 TTCTAGTTACATTTAAAAATAATTTCTTTTCTGAATATTTCCAGAACCCTTGCGTTATACG

2941 TGCGTTTTCGATATAAATTTGGTAGTATAGTGAAAGAAAATAAGATGTGGCGAAAAAACCA

3001 GATTTGAGGAAATATGTAAAAAGCATTGCCACGCCAGTAAAACAGCAAGGTATGCCAAT

RBS *orfU1*>

3061 TTTTGCACGTCAGTTGGTAGATTTGAGAGGAGAGTTAAT**ATGT**CTCAGTTATTGGGAATT  
M S Q L L G I

3121 ATTCAACGTTTACATGCAATGCAAGAAGATGAGTCTGCTGAAACACAAGCAAGACGGTTT  
I Q R L H A M Q E D E S A E T Q A R R F

*HindIII*

3181 GAAAAAACGGTACACCAGTGTGCGAAGTGAAGTTTTTTCAAGCTTCTAACTCATTGAA  
E K N G T P V C E V K F F Q A S N S F E

3241 GTAGAAATTTATGGCGACAATAGCAAATATCAATTTGATGATATTGATATGACAGCTATC  
V E I Y G D N S K Y Q F D D I D M T A I

3301 GAAATTTTTGAAACGCTACAAGAAAACGAATAACATTGTAAGAAACGACTTATCTTTGTT  
E I F E T L Q E N E end - 

3361 TTTTACGTCGAAGCTGTGAATCATT**TTCA**CAGCTTTTTTTATGTAAAAAATTAACTTTTA  


-10 P<sub>1</sub> P<sub>2</sub>

3421 AACACTAAATGAAAGAAATCTCCCCAGATAGTATGAT**TAGAA**TAGGAGATGGAAAAGTTTC  
RBS

3481 GATTTATTTTTTTAGTTGAAAGAACTTCGAACATGAAAATACGAGGAAG**AGGA**AGATTTC

*orfD1*>

3541 TAA**ATG**ATCTCTAATAGATTTGGACAGTTTATTGATAACGAATTAGCTGATTCGATGATT  
M I S N R F G Q F I D N E L A D S M I

3601 TCTGCTGAAAAAGTAGCCACGTACAGCTTGGTAATAATTTAGAACATGCATTGCTTGT  
S A E K V A H V Q L G N N L E H A L L V

3661 TTAACGAAATGTGGTTATTTCGGTTATTCAGTACTAGACTTTGAGTTTAAACTTCACGGA  
L T K C G Y S V I P V L D F E F K L H G

3721 TTAATAAGTGCCGCAATGATAACAGATGCAATACTAGGGCTCGAGCGCATTGAATTTGAG  
L I S A A M I T D A I L G L E R I E F E

3781 CGTTTGGAAGAGCTGAAAGTAGAAGATGTTATGCAAAGTATTTCCAGTGATTAAGAT  
R L E E L K V E D V M Q T D F P V I K D

.....  
3841 TTCTAAATAACGAAAGAATTGTTCACTTACTTGTGATCATCCTTTTGTGGTTATC  
F L N N E R I V H L L V D H P F V C V I  
-35 -10 P<sub>1(WT)</sub> P<sub>2(44/2)</sub>

3901 GATAATGAGTTCCATTTTGAAGGGATTGTGACAAGACGGGTTGTCTTGAAGCAAGTCAAT  
D N E F H F E G I V T R R V V L K Q V N

RBS *lyrA* >  
3961 CGTTATATTCATTTACAGGTGGAGGAAATAGATGATTGTAACGGAATATGAATTACTTG

R Y I H L Q V E E N R end  
M I V T E Y E L L V

4021 TCTGTTTAGCGGAAGAACTCAATATGCGTAAAAGTGCAGAAAACTTTTTTAAGTCAAC  
.....  
.....  
.....

C L A E E L N M R K S A E K L F L S Q P

4081 CAGCTTTATCGCAGCGTTTGCAAACAATTGAAAGTAGATGGAATACAAAGATTTTCATTC  
A L S Q R L Q T I E S R W N T K I F I R

4141 GTACACAAAAGGTCTACTACTTACACCAGAAGGAGAAGCGATTGTCCGTCATGCTTCAA  
T Q K G L L L T P E G E A I V R H A S S

4201 GTGTTATTGAGCGAGAACATACCATTCAAGAAAACTAGAAGCAATGGAAGGTGTCGTGC  
V I E R E H T I Q E K L E A M E G V V R

4261 GTGGACCTTGCGAATTGCTTGTGCTAGTGTGTGGCTCAAATGTGGCTTCTCGTGTCT  
G T L R I A C A S V V A Q M W L P R V L

4321 TAAAAACATTCACTAGCGCATATCCAAATGTCCAAATTTGCTTGTAAACAGGTTGGAGCA  
K T F T S A Y P N V Q I S L V T G W S S

4381 GCGAAGTGACGCAGCAACTTGCAGCTGGAAATGTGCATATTGGCATCGTTGCGGAAATT  
E V T Q Q L A A G N V H I G I V R G N S

4441 CTAATTGAAAAGTGTCCAAAAGCCACTTTTTAATGATAAATTAATTTAGTAGATACAG  
T W K S V Q K P L F N D K L I L V D T E

4501 AAATCACGAAAATTGAAGAGGTTTTCCAGACGAACAGACCTTTTGTACAGTTTCGAAGTG  
I T K I E E V F Q T N R P F V Q F R S D

4561 ATTCTAACTACTATCAGGTAATTCAAGACTACTGGCAACGAAATTTGGAATAATGCCAC  
S N Y Y Q V I Q D Y W Q R N F G K M P R

4621 GTCAGGCGATGTTAATGGATCAAATGAAACATCGCGTCAAATGGCTCTTAATGGGATTG  
Q A M L M D Q M E T S R Q M A L N G I G

4681 GCTTTGCTATTTTACCAGAAGTAACAATGTTAGGTTATCCCAGAAAAATCAATAAAATAC  
F A I L P E V T M L G Y P D K I N K I P

4741 CACTTACAGAAAAAGACGGTTCCATTTCTTAGCCGAGAACTAATTTATGACGTATGAAC  
L T E K D G S I L S R E T N L L T Y E Q

4801 AATCGCTTGGCTTACCACAAGTAAATGCATTTTTTAGAAATAATAGATAAATTCCTTGAAC  
S L G L P Q V N A F L E I I D K F L E Q

RBS                    **dapD**

4861 AAGTGAATAGCTATGGCAAAATAGAAATCAGAACGAATTGGAAGGAGACAATTATTCAT  
M  
V K end  
>

4921 GAAACAAATGGATGCACACCAAATTATTTCTTTTATTCAAATAGCAAGAAAGCAACACC  
K Q M D A H Q I I S F I Q N S K K A T P

4981 AGTCAAAGTATACCTTAAAGGTGACTTAGAAAAAATTACTTTTCCAGTGGATGTAAAAAC  
V K V Y L K G D L E K I T F P V D V K T

5041 ATTTATTACTGGAAATGCGGGAACGATTTTTGGAGAATGGGCGATTGTTGAACCATTACT  
F I T G N A G T I F G E W A I V E P L L

5101 TGAAGCAAATAAAGCGAATATTGAAGATTACGTAATTGAAAATGATCGTCGTAATTCTGC  
E A N K A N I E D Y V I E N D R R N S A

5161 TATCCACTTTTAGATATGAAAAATCAATGCTAGAATTGAACCGGGTGCTGTCATTCG  
I P L L D M K N I N A R I E P G A V I R

5221 CGATCAAGTAACGATTGGCGACAATGCAGTTATTATGATGGGAGCAAGCATTAAATATCGG  
D Q V T I G D N A V I M M G A S I N I G

5281 TGCTGTTATTGGTGACGGTACAATGATTGATATGAATGTAGTTCTTGGAGGCCGCGCAAC  
A V I G D G T M I D M N V V L G G R A T

5341 AGTTGGAAAAATGCCATATTGGTGCTGGATCAGTACTTGCTGGTGTAGTAGAACACC  
V G K N C H I G A G S V L A G V V E P P

5401 ATCCGCACAACCTGTCATTGTAGAAGATAATGTTGTTATTGGTGCGAATGTGGTTGTTTT  
S A Q P V I V E D N V V I G A N V V V L

5461 AGAAGGCGTGCCTATTGGAGAAGGTGCTGTTGTTGCCGCTGGAGCAATTGTTACAAAAGA  
E G V R I G E G A V V A A G A I V T K D

5521 TGTAGCTCCTGGTACCGTTGTTGCTGGAATCCCAGCTCGCGAACTAAAAAACTAGATGC  
V A P G T V V A G I P A R E L K K L D A

5581 AAAACAGCGTCTAAAAAGAAATCATGCAAGAACTTCGTCAACTTTAAAAAATGAAGGA  
K T A S K T E I M Q E L R Q L end

RBS                    **hipA** >

5641 AACTGTTTCGTCTTTTGGCGGAACAGTCCTTTTTTAAAAGGAGAGGAAACGTGGACTTA  
 V D L

5701 AATCAATTTATTTTCGATTGCGCCGCGAGTTGCATCAAATTCAGAAACAGGTTACAAAGAA  
N Q F I S I R R E L H Q I P E T G Y K E

5761 TGGAAAACACAAGCTTACTTACTTGATTATATAAATAAATTACCAAGCAGGTATTTGGAA  
W K T Q A Y L L D Y I N K L P S R Y L E

5821 GTGAAGAAATGGCGCACTGGTCTGTTAGTTCGAGTAAGCGGAACGAGTCCAACGAAAACA  
V K K W R T G L L V R V S G T S P T K T

5881 ATTGTTACCCTACGGATATTGATGCTTTGCCAATTACGGAAGAACTGGTTTAGCTTTT  
I G Y R T D I D A L P I T E E T G L A F

5941 GAGTCAAAGCATGCAGGAAATATGCATGCTTGTGGACATGATTTACATATGAGTATTGCA

E S K H A G N M H A C G H D L H M S I A  
 6001 CTTGGCGTATTAACCTCATTGCTAGTAAGCCAGCAAAAGATAATTTATTATTTGTGT  
 L G V L T H F A S K P A K D N L L F V F  
 6061 CAACCAGCAGAAGAAGGACCTGGAGGAGCTAAGCCAATTATGGAAAAGTGCTGAGTTT  
 Q P A E E G P G G A K P I M E S A E F A  
 6121 GAATGGCGTCCAGATTTCGATTTACGGGTTGCATATTGCACCGGAATACAAAGTTGGC  
 E W R P D S I Y G L H I A P E Y K V G Q  
 6181 ATCGCCATTAACCAGGGCTATTATTCGCCAATACATCTGAACATTTCATTTCTTTTAA  
 I A I K P G L L F A N T S E L F I S F K  
 6241 GGAAAAGGTGGTCACGCAGCATATCCGCATTTAGCTAATGATATGGTAGTGGCAGCAAG  
 G K G G H A A Y P H L A N D M V V A A S  
 6301 GCTTTTGTAGGTCAAATGCAAACGATTATTAGCCGAAATATCGACCCAATGGATAGTGC  
 A F V G Q M Q T I I S R N I D P M D S A  
 6361 GTCATTACCATTGGTAGGATTCATGGCGGTGAAATTCAAAATGTTATCGCAGAAACAGCT  
 V I T I G R I H G G E I Q N V I A E T A  
 6421 TTTTATAGATGGAACAATCCGAACACTTTACCTGAAACAATGGAAAATCGTTTGGACTCGA  
 F L D G T I R T L S P E T M E I V W T R  
 6481 TTAAAAAATTAGCGAAAGGCTGGGAAGAAGCTTATCAATGCGAAGTGACTTTTTCATGCA  
 L K Q L A K G W E E A Y Q C E V T F H A  
 6541 GGTCTGATTACTATCAAGTGGATAACGATCCAGCAGAAACAGCAGCGTTTATTGACTTT  
 G S D Y Y Q V D N D P A E T A A F I D F  
 6601 TTAAAAGAAAGCTATCCAAAGAGTTATGTACCGCAAAGTCAGCGATGACAGGAGAAGAT  
 L K E S Y P K S Y V P A K S A M T G E D  
 6661 TTCGGTACTTTTTATCAGGAATTAAGGCTTTATGTTTTGGCTTGGTGTGACTCAGAG  
 F G Y F L S G I K G F M F W L G V D S E  
 6721 TACAGCCTACATCATGCAAAATTAATCCAAAAGAAGAGGCCATTCCATTTGCGATTGAA  
 Y S L H H A K L N P K E E A I P F A I E  
 6781 GTATTAATCCACTTTTATAGAAAGTAAGTAAAAAAGACGTAAATTCGCTCACTTATTGAAC  
 V L I H F L E S K end  
 6841 GAATTTACGTCTTTTAAATTGTTGTTTGGTCCAAACGTGCTTACAAAGCTTAGAGGTAAT  
 6901 TTGATTTTGTCTCTGTCAATGCTTCACGGATATCTTTTAAACAAGTCACGTTGAACGGAG  
 6961 TATTGTTCCCGTTTACCGCTTTACCAACTACTCGAATAACCATATTAGTTGCATCGAT

### 3.1.2.5. Ensayos de complementación de 44/2 con *lyrA*.

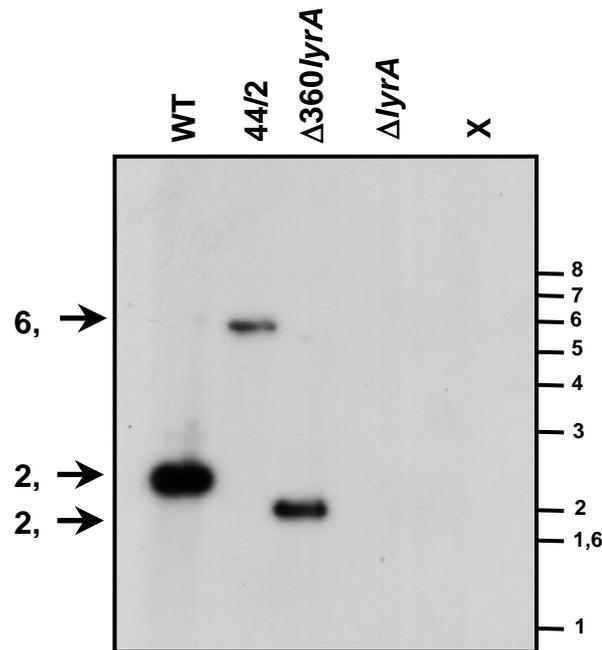
Con el fin de determinar de forma directa si el responsable del fenotipo presentado por 44/2 es *lyrA*, realizamos ensayos de *trans* complementación con dicho gen en construcción monocistrónica y bicistrónica (junto a *orfD1*), incluyendo las respectivas zonas promotoras. Para ello, amplificamos por PCR y clonamos ambos fragmentos en el vector bifuncional pHP59 (223) (véase apartado 4.15 de material y métodos). Al ser introducidas en 44/2, ninguna de las dos construcciones fue capaz de restablecer el fenotipo silvestre original.

### 3.1.2.6. Construcción de un mutante *lyrA* de *L. ivanovii*.

Sin embargo, los ensayos de complementación dejaban abierta la posibilidad de que las construcciones no hubieran funcionado. Con el fin de descartar cualquier relación de LyrA con las características fenotípicas presentadas por el mutante 44/2 de *L. ivanovii*, elegimos una estrategia basada en la delección en fase de la totalidad del gen mediante doble recombinación homóloga (véase sección 4.14 de materiales y métodos), dando lugar al correspondiente mutante  $\Delta$ *lyrA* de *L. ivanovii* ATCC 19119. La mutación fue analizada mediante *Southern blot* (Fig. 3.1.9), PCR y posterior secuenciación para comprobar el mantenimiento de la fase de lectura tras la delección.

En consonancia con las evidencias previas obtenidas mediante el análisis transcripcional y los ensayos de complementación, la mutación  $\Delta$ *lyrA* no reprodujo el fenotipo de 44/2. Así, tanto el halo de hemólisis incompleta, como la reacción CAMP con *R. equi*, la actividad SMasa y la producción de la proteína de 27 kDa fueron totalmente idénticas en  $\Delta$ *lyrA* y en la cepa parental de *L. ivanovii*.

Este resultado confirmaba de forma definitiva la no implicación de LyrA en la activación de la expresión de *smcL* e *i-inIE* en *L. ivanovii*. Esta evidencia nos llevaría a contemplar una explicación alternativa en la que el fenotipo del mutante 44/2 no tendría nada que ver con la inserción del transposón y obedecería a una mutación espontánea afectando de algún modo a la expresión de dos unidades transcripcionales diferentes, *smcL* e *i-inIE* (véase apartado 3.3.2.1).

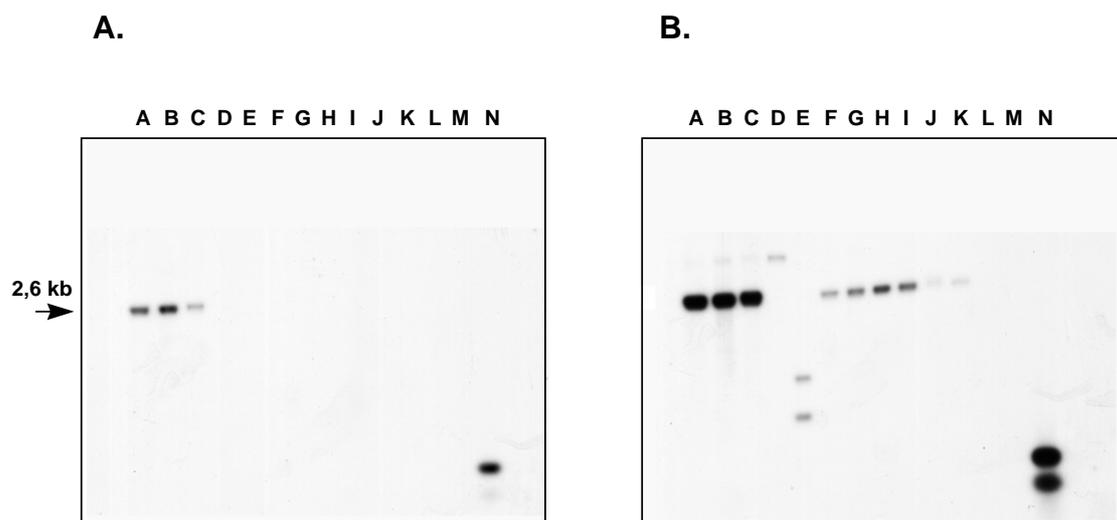


**Figura 3.1.9.** Comprobación, mediante *Southern blot*, de la mutación en fase de *lyrA* total por doble recombinación homóloga. Se utilizaron como controles los DNAs cromosómicos de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup> y el mutante 44/2, y se analizaron los DNAs cromosómicos de los posibles mutantes *lyrA* y de una mutante de 360 pb de *lyrA*, *360lyrA* no descrito en el texto. Los DNAs de las cuatro cepas fueron digeridos con la enzima de restricción *Hind*III. Mediante la hibridación con una sonda obtenida por amplificación mediante los oligonucleótidos MD2/GD24 de un fragmento interno del gen *lyrA*, posteriormente purificado y marcado radioactivamente (véase materiales y métodos) se pone de manifiesto la ausencia de señal en el caso de la cepa mutada en la totalidad del gen *lyrA* (calle 4), una disminución en aproximadamente 360 bp del tamaño de la banda que aparece en el mutante *360lyrA* (calle 3) y en el mutante 44/2 se aprecia una señal de mayor peso molecular como consecuencia de la inserción del transposón en esta región cromosómica. Los tamaños de los distintos fragmentos están indicados en kb en la izquierda. A la derecha, se muestra (en kb) el bandeo del marcador de talla molecular X (Boehringer Mannheim).

### 3.1.2.7. Presencia de *lyrA* en *L. monocytogenes* y análisis genómico comparado del locus.

Excluida la implicación de LyrA en el control de la expresión de genes de virulencia exclusivos de *L. ivanovii*, y asumiendo un posible papel de dicho gen como regulador de los loci circundantes, presumiblemente implicados en el metabolismo de aminoácidos, era posible que el locus *lyrA* estuviese conservado en *L. monocytogenes* y otras especies del género *Listeria*. Para comprobar esto, realizamos *Southern blots* en condiciones de alta y baja astringencia de hibridación (Fig. 3.1.10) utilizando DNAs de distintas cepas de las diferentes especies de *Listeria* digeridos mediante *HindIII*. Empleamos como sonda la secuencia completa de *lyrA* amplificada con los oligonucleótidos MD2/GD24 (Tabla 4.4). En condiciones de alta astringencia, detectamos una única copia de *lyrA* representada por una banda de 2,6 kb en las tres cepas de *L. ivanovii* analizadas (una de ellas perteneciente a *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*), mientras que no se observó ninguna señal de hibridación en el resto de las especies. En condiciones de baja astringencia, sin embargo, además de la señal de 2,6 kb observada anteriormente, se detectó una nueva banda de mayor tamaño en las tres cepas de *L. ivanovii*, lo que sugiere que, al igual que ocurre en otras especies bacterianas (40,310), existirían varios miembros pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR en *L. ivanovii*. Además, en estas condiciones de baja astringencia se pudieron observar señales de hibridación en *L. monocytogenes* así como en el resto de las especies del género *Listeria*, salvo en *L. grayi* y *L. grayi* subsp. *murrayi*, que son las dos especies más divergentes genéticamente.

Estos resultados fueron corroborados mediante PCR. Así, empleando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *L. ivanovii*, correspondientes a la zona que codifica el extremo N-terminal, muy conservada en los reguladores tipo LysR, pudimos clonar y secuenciar el alelo *lyrA* de *L. monocytogenes* P14. Mediante distintas PCRs inversas hemos identificado y clonado sus regiones flanqueantes, las cuales mostraron una estructura idéntica a la del locus *lyrA* de *L. ivanovii* (Fig. 3.1.11). Este hecho no es sorprendente, puesto que la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR (234) constituye, junto con la familia de reguladores CRP y el sistema de regulación de dos componentes (507,543) uno de los grupos de reguladores más importantes y más ampliamente distribuidos en los organismos

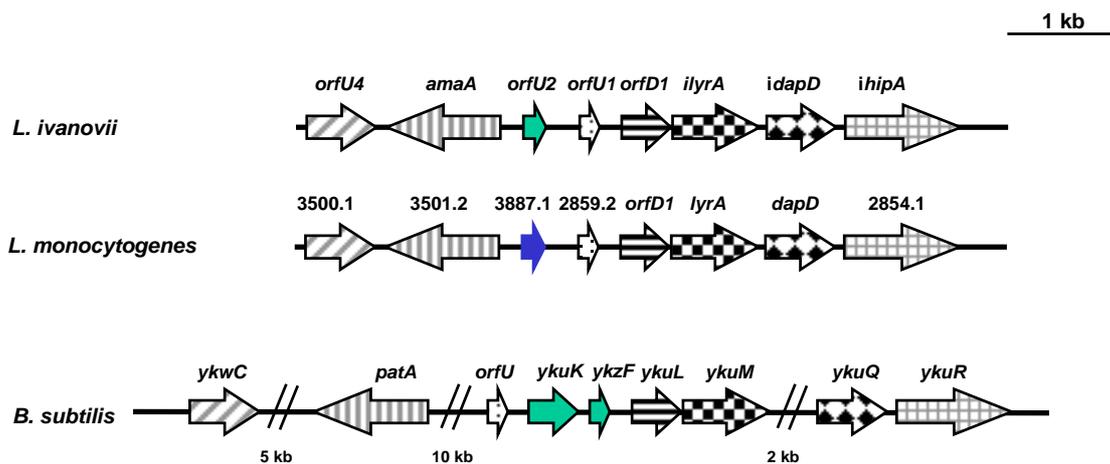


**Figura 3.1.10.** Análisis mediante *Southern blot* de la presencia de homólogos a *lyrA* en las seis especies que integran el género *Listeria*. Los DNAs cromosómicos digeridos con *Hind*III de diferentes serovares de las distintas especies fueron hibridados en condiciones de alta (**panel A**) o baja (**panel B**) astringencia (véase Materiales y métodos), utilizando como sonda un fragmento interno del gen *lyrA* amplificado por PCR mediante los oligos MD2/GD24, posteriormente purificado y marcado radioactivamente. Líneas de la **A** a la **C**, *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>, D-23, y subsp. *londoniensis*, respectivamente; **D** y **E**, *L. monocytogenes* P14, y EGD-e, respectivamente; **F** y **G**, *L. seeligeri* CIP 100100, y SLCC 5921, respectivamente; **H** e **I**, *L. innocua* ATCC 33090, y ATCC 33091, respectivamente; **J** y **K**, *L. welshimeri* SLCC 5334 y C20, respectivamente; **L**, *L. grayi*; **M**, *L. grayi* subsp. *murrayi*; **N**, sonda empleada para la hibridación utilizada como control positivo. En condiciones de alta astringencia se observa que el patrón de hibridación de las dos cepas de *L. ivanovii* y la subsp. *londoniensis* es el mismo y presenta una única señal de hibridación de 2,6 kb. Sin embargo, no aparecen señales positivas en el resto de las especies del género. Por el contrario, en condiciones de baja astringencia de hibridación se observan no sólo señales de hibridación positiva en el resto de las especies del género *Listeria*, excepto en el caso de *L. grayi* y *L. grayi* subsp. *murrayi*, las dos más alejadas filogenéticamente, sino que aparecen nuevas bandas en el caso de los tres miembros de *L. ivanovii* que indican la presencia de genes homólogos a *lyrA* en su cromosoma. Además, se puede observar como las dos cepas de *L. monocytogenes* presentan un patrón diferente que refleja una divergencia genética entre ambas cepas. Esta diferencia ha sido confirmada analizando la secuencia de *limR* que no posee un punto de corte para *Hind*III en P14 y sí en EGD-e.



procariotas. De hecho, solo en el caso de *B. subtilis* se ha descrito la existencia de 19 miembros pertenecientes al grupo de LTR, de los que tan sólo se conoce la función de 4 (310).

Nuestro grupo de investigación forma parte del Consorcio Europeo que está llevando a cabo la secuenciación del genoma de *L. monocytogenes*. Además, en este marco de colaboración, tenemos acceso a la base de datos del genoma de *L. innocua*. Aprovechando estas circunstancias, hemos comparado la estructura del locus *lyrA* en *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* y *L. innocua*. Asimismo hemos extendido el análisis a los loci homólogos presentes en otros genomas bacterianos, según la información depositada en el TIGR (*Institute for Genomic Research*) (<http://www.tigr.or>). Así, hemos comprobado que únicamente en *L. monocytogenes*, *L. innocua* y especies pertenecientes a géneros Gram-positivos con bajo contenido en G+C, filogenéticamente próximos a *Listeria*, como *B. subtilis*, se encuentran homólogos con un alto porcentaje de identidad de todas las proteínas analizadas. Además, sus respectivos genes comparten una organización similar en el cromosoma (Fig. 3.1.11), sugiriendo claramente una evolución a partir de un ancestro común.



**Figura 3.1.11.** Representación de la estructura del locus *lyrA* y sus regiones flanqueantes en los géneros bacterianos filogenéticamente más próximos a *Listeria*. Las barras horizontales indican interrupción de la secuencia. Se indican con el mismo entramado de flechas los genes ortólogos.

**Tabla 3.1.3.** Porcentajes de homología entre las proteínas codificadas en los loci representados en la Fig. 3.1.11.

	OrfU4	AmaA	OrfU2	OrfU1	OrfD1	LyrA	DapD	HipA

<i>L. ivanovii</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>L. monocytogenes</i>	2858	3501	3887	2859	OrfD1	LyrA	DapD	2854
	85%	93%	97%	100%	96%	97%	97%	92%
<i>B. subtilis</i>	YkwC	PatA	—	YkuJ	YkuL	YluM	YkuQ	YkuR
	60%	55%	—	51%	54%	54%	74%	59%

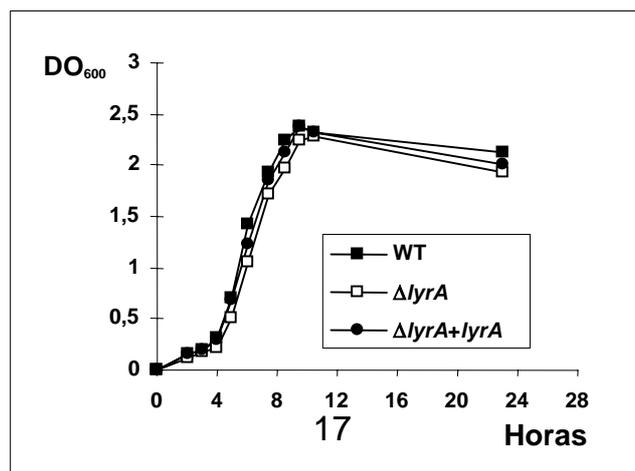
Los valores indican % de identidad a nivel aminoacídico con respecto a las secuencias de *L. ivanovii*. Estos valores se han obtenido a partir de alineamientos de las secuencias de aminoácidos realizados utilizando el programa BESTFIT utilizando un tamaño de Gap de 8, del paquete informático GCG de la Universidad de Wisconsin, versión 10.0 para UNIX (121).

### 3.1.2.8. Caracterización de mutantes *lyrA* en *L. ivanovii*.

Para obtener una indicación preliminar acerca de la importancia de este regulador en la fisiología y virulencia de *L. ivanovii*, decidimos por último analizar el efecto de la anulación de la expresión de su locus codificante. Como aproximación inicial al estudio de la función de LyrA en *Listeria*, investigamos el efecto de la mutación  $\Delta lyrA$  y de la presencia en multicopia del gen sobre el crecimiento bacteriano en BHI a 37°C. Como se observa en la Fig. 3.1.14, las curvas de crecimiento de  $\Delta lyrA$  y del mutante complementado con múltiples copias de *lyrA* presentaron cinéticas idénticas a las de la cepa parental de *L. ivanovii*. Estos datos muestran que en medio rico y a una temperatura óptima de crecimiento el regulador LyrA no es importante para la multiplicación de *Listeria in vitro*.

Una vez demostrado que *lyrA* no es esencial para el crecimiento bacteriano en condiciones óptimas, investigamos si este locus podría jugar algún papel en la proliferación en los tejidos del hospedador animal. Para ello determinamos la  $DL_{50}$  del mutante  $\Delta lyrA$  y de su cepa parental de *L. ivanovii* tras inoculaciones intravenosas en ratones BALB/c. No se observó ninguna diferencia en los valores de  $DL_{50}$ , lo que descartó una implicación de LyrA en la virulencia de *Listeria*, al menos en el modelo murino.

Tampoco se vieron afectados por la mutación  $\Delta lyrA$  ninguno de los marcadores de virulencia relacionados con el regulón PrfA dependiente, tales como la actividad hemolítica, lecitinasa o la capacidad de utilización de G-1-P, lo que permite descartar un efecto de LyrA sobre el regulador central de la virulencia, PrfA.



**Fig. 3.1.12.** Curvas de crecimiento de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>, los dos mutantes por delección  $\Delta lyrA$  así como el mutante  $\Delta lyrA$  *trans* complementado con el alelo *lyrA* introducido en multicopia en el vector pHP59 cultivadas en BHI a 37°C. La densidad óptica se midió a 600 nm. Se puede observar que las cuatro cepas presentan cinéticas de crecimiento prácticamente idénticas.

### 3.1.3. Discusión.

En este primer capítulo de la tesis hemos caracterizado un mutante de *L. ivanovii*, 44/2, obtenido mediante transposición con Tn1545 y que fue seleccionado por su carácter débilmente hemolítico y por la pérdida de reactividad CAMP con *R. equi*. Dicho mutante resultó estar afectado en la producción de una potente actividad SMasa, presumiblemente responsable del particular fenotipo hemolítico bizonal de *L. ivanovii* y de la mencionada reacción CAMP con *R. equi*. Este enzima alterante de las membranas despertó nuestro interés ya que, dentro del género *Listeria*, es específico de *L. ivanovii*, por lo que podría tratarse de un factor de virulencia implicado de alguna forma en el tropismo patogénico de esta especie.

Para estudiar la contribución en la patogénesis de esta SMasa mediante una aproximación genética necesitábamos, obviamente, disponer de su gen codificante, todavía no identificado en el momento de iniciarse el presente estudio. Del sobrenadante de cultivo del mutante 44/2 estaba también ausente una proteína mayoritaria de 27 kDa, un tamaño molecular compatible con el descrito para las fosfolipasas bacterianas (1,25,385). Cabía por tanto la posibilidad de que, en 44/2, el Tn1545 (del que comprobamos que existía una única copia en el cromosoma del mutante) hubiese inactivado el gen estructural de la SMasa. Si este fuese el caso, el mutante 44/2 podía sernos muy útil para la identificación de dicho gen (o de cualquier otro determinante genético necesario para la síntesis del enzima) siguiendo el rastro genético específico dejado por el transposón al insertarse en el cromosoma de *L. ivanovii*.

Existían sin embargo datos que nos hacían albergar dudas acerca de la posible identidad de la proteína de 27 kDa con la actividad SMasa. La proteína de 27 kDa fue purificada por el grupo de J. Kreft en Würzburg (300) a partir del sobrenadante de cultivo de *L. ivanovii*, determinándose la secuencia de su extremo N-terminal. En el momento de realizarse dicho estudio, en 1989, no se detectaron secuencias homólogas en las bases de datos. En particular, dicha secuencia N-terminal no presentaba ninguna similitud con la estructura primaria deducida a partir del gen codificante de la SMasa de *S. aureus* ( $\beta$ -toxina) (385), a pesar de presentar el enzima de *L. ivanovii* evidentes homologías funcionales en lo que respecta a la actividad citolítica (las dos SMasas producen una alteración subléctica de las membranas de eritrocitos muy semejante, dando lugar a un amplio halo de hemólisis incompleta alrededor de las colonias, y una reactividad CAMP con *R. equi* morfológicamente

idéntica -en forma de pala- (véase Fig. 3.1.1). Un detallado análisis comparativo entre 44/2 y otro mutante de *L. ivanovii* procedente del mismo banco obtenido con el Tn1545, denominado 8/6 y que fue igualmente seleccionado por su fenotipo débilmente hemolítico, permitió aclarar nuestras dudas acerca de la posible relación de la proteína de 27 kDa y la SMasa. En el mutante 8/6, todos los genes PrfA-dependientes se encontraban silenciados debido a la inserción del transposón en el gen *i-prfA*. Así, 8/6 tenía abolida la expresión de la hemolisina ILO y la lecitinasa (los productos génicos de los genes PrfA-dependientes *hly* y *plcB*) y no utilizaba las hexosas fosfato (un carácter igualmente PrfA-dependiente). En 8/6, la proteína de 27 kDa también estaba ausente (sugiriendo expresión dependiente respecto de PrfA) pero sin embargo todavía seguía produciendo un efecto CAMP y una actividad SMasa idénticos a los de la cepa silvestre parental. Con estos resultados quedaba claro pues que la proteína de 27 kDa no tenía nada que ver con la SMasa. La no relación de ambas proteínas fue confirmada definitivamente mediante una búsqueda de homologías realizada un tiempo después, en la que pudimos comprobar que la secuencia N-terminal publicada para la proteína de 27 kDa presentaba un alto grado de similitud con el extremo N-terminal de InIB de *L. monocytogenes* (véase Fig. 3.1.1 y 129). De esta forma, detectábamos por primera vez la presencia de un miembro de la familia multigénica de internalinas en *L. ivanovii*. Este hallazgo nos condujo a la identificación, en un trabajo realizado en colaboración con el grupo de la Universidad de Würzburg, de la internalina secretada PrfA-dependiente, i-InIE (144).

Así pues, nos encontrábamos con dos caracteres que, aunque exhibiendo una regulación diferencial respecto de PrfA, resultaban ambos abolidos por la mutación presente en 44/2. Este efecto pleiotrópico nos condujo a considerar dos posibles explicaciones para el fenotipo del mutante: i) los determinantes genéticos de la SMasa y la proteína de 27 kDa se encontrarían en la misma región cromosómica y su expresión resultaría abolida por un efecto polar creado por el transposón al insertarse en esa zona del cromosoma; ii) el transposón podría haberse insertado en un elemento regulador que controla la expresión de ambos determinantes genéticos.

Con el fin de caracterizar la base genética responsable del fenotipo de 44/2, clonamos la región de inserción del transposón utilizando el gen de resistencia a la kanamicina presente en Tn1545 como sistema de selección positiva. De esta forma logramos aislar un pequeño fragmento flanqueante del cromosoma de *L. ivanovii*. Dicho fragmento fue utilizado como base para rescatar la región de inserción a partir de la cepa parental. La caracterización de esta región, abarcando un fragmento de DNA de 7,02 kb, permitió descartar definitivamente como explicación del fenotipo de 44/2 el que el transposón hubiese afectado a un locus conteniendo los genes estructurales de la SMasa y la proteína de 27 kDa, ya que no encontramos ninguna secuencia susceptible de codificar ninguna de estas proteínas. Quedaba por tanto una explicación basada en la inactivación de un elemento genético requerido para la expresión de ambas proteínas. En línea con esta hipótesis, encontramos que la inserción del transposón había ocurrido en una zona intergénica situada 582 pb corriente arriba de una ORF que codificaba una proteína reguladora de la familia LysR (LTTR). Esta proteína, a la que denominamos LyrA (y *lyrA* a su gen codificante) (de *L. ivanovii lysR-type regulator A*), es el primer miembro de esta familia de reguladores transcripcionales descrito en el género *Listeria*.

Los miembros de la familia LTTR suelen actuar como activadores transcripcionales y comparten características estructurales comunes, entre las que se incluyen un tamaño similar

(30-35 kDa) y un alto grado de homología en el extremo N-terminal, donde se encuentra el motivo hélice-giro-hélice (HTH) implicado en la unión al DNA diana (233,489). El grado de homología es mucho más reducido a nivel del extremo C-terminal y en la región central, implicados en funciones específicas de cada regulador, como por ejemplo el reconocimiento del coinductor, una pequeña molécula señal requerida para la actividad transcripcional (489). Las funciones controladas por los miembros de la familia LTTR son muy diversas, incluyendo la biosíntesis de amino ácidos, el transporte de hierro, la resistencia a antibióticos o la propia virulencia (227,297,507).

Los LTTRs se unen por su dominio HTH a las zonas promotoras de los genes sometidos a su control mediante una secuencia diana compuesta por pequeñas repeticiones invertidas de 15 bp. Estas secuencias presentan un motivo conservado T-N<sub>11</sub>-A centrado generalmente alrededor de la posición -65 con respecto al inicio de la transcripción de los genes regulados. Es muy posible que el hecho de que se mantenga la estructura del motivo T-N<sub>11</sub>-A esté relacionado con la conservación del dominio HTH en las proteínas reguladoras tipo LysR (193). Ya hemos señalado anteriormente que durante la ejecución del presente trabajo se logró aislar, empleando una estrategia de clonaje basada en PCR con oligonucleótidos degenerados, el gen *i-inIE* codificante de la proteína de 27 kDa. Utilizando la misma estrategia y también durante la ejecución de este trabajo de tesis, logramos identificar en nuestro laboratorio el gen estructural de la SMasa de *L. ivanovii*, *smcL*. El examen de las presuntas regiones promotoras de *i-inIE* y *smcL* nos permitió localizar secuencias perfectamente compatibles con cajas consenso para la unión de un regulador tipo LysR. Todas estas evidencias, tomadas en conjunto, nos hicieron considerar como hipótesis de trabajo el que fuese una alteración de la expresión de *lyrA*, inducida por la inserción del transposón corriente arriba, la responsable del fenotipo de 44/2 (véase la Fig. 3.1.6).

Para contrastar la anterior hipótesis y comprobar el posible papel de *LyrA* como activador transcripcional de *smcL* e *i-inIE*, utilizamos tres aproximaciones experimentales distintas. En primer lugar, realizamos un análisis transcripcional de los genes de la región de inserción del transposón. Era evidente que si la inserción del transposón era responsable del fenotipo en 44/2 por crear un efecto polar sobre la expresión de *lyrA*, no debía existir en este mutante transcripción de dicho gen ni de la *orf1* que le precede (véase Fig. 3.1.6). El análisis transcripcional de 44/2 confirmó la ausencia de expresión de *smcL* e *i-inIE* pero, sin embargo, no reveló efecto alguno sobre los niveles de expresión de *lyrA* ni de ninguno de los genes de la región. En segundo lugar, tratamos de *trans*-complementar el mutante 44/2 con un plásmido conteniendo el gen *lyrA* tanto en construcción monocistrónica como en compañía de la *orf1*. La lógica de este análisis era que si *lyrA* estaba efectivamente implicado en la activación transcripcional de *smcL* e *i-inIE*, con la introducción de *lyrA* en 44/2 deberíamos obtener una reversión del fenotipo hacia niveles de expresión de la actividad SMasa y de la proteína de 27 kDa similares a los observados en la cepa silvestre. Este análisis tampoco arrojó un resultado positivo. Finalmente, como aproximación definitiva produjimos una delección del gen *lyrA* en *L. ivanovii*. Esta mutación debería reproducir el fenotipo de 44/2 en el caso de que *lyrA* controlara la expresión de *smcL* e *i-inIE*. El resultado fue de nuevo negativo. La conclusión no podía ser otra más que *lyrA* realmente no ejercía efecto alguno sobre la expresión de *smcL* e *i-inIE* y, lo que era más importante, que la inserción del transposón no tenía nada que ver con el fenotipo de 44/2. Esta conclusión concuerda perfectamente con el hecho de que toda la región del locus *lyrA* se encuentra perfectamente conservada en *L. monocytogenes*, lo cual no sería

de esperar en el caso de que LyrA hubiese sido un regulador de *smcL* y *i-inIE*, ya que se trata de dos genes presentes exclusivamente en *L. ivanovii* (144,196). La perfecta conservación del locus *lyrA* completo en *L. monocytogenes* y *L. innocua* así como la presencia de sus distintos componentes -con una estructura genética similar- en *B. subtilis*, sugieren para el gen *lyrA* una función *housekeeping*. Cualquiera que sea esta función, por el momento desconocida, está claro que el producto de *lyrA* no es esencial para *Listeria* ya que hemos podido comprobar que su ausencia no afecta al crecimiento bacteriano ni en medio rico ni en el ambiente hostil de los tejidos del hospedador infectado.

Así, la única explicación plausible que queda para el fenotipo de 44/2 es que éste es el resultado de una mutación espontánea ocurrida en algún lugar desconocido del cromosoma de *L. ivanovii*, que afecta a la expresión de, al menos, los genes *smcL* e *i-inIE* y que se seleccionó durante el proceso de escrutinio del banco de mutantes de transposición en placas de agar sangre siguiendo el criterio de "débil actividad hemolítica".

### **3.2. Aislamiento y caracterización de mutantes espontáneos de *L. ivanovii* con fenotipo hemolítico alterado.**

### 3.2.1. Introducción.

A lo largo del anterior capítulo hemos caracterizado un mutante de *L. ivanovii* obtenido por transposición, 44/2, que había dejado de producir al menos dos potenciales factores de virulencia (una esfingomielinasa y una internalina pequeña secretada) y que fue seleccionado por su fenotipo débilmente hemolítico. Los análisis genéticos practicados en 44/2 nos llevaron a concluir que el fenotipo de este mutante no se debía a la inserción del transposón sino que obedecía a una mutación espontánea no relacionada con el evento de transposición. De ser correcta esta interpretación, debería ser posible volver a obtener un mutante con el mismo fenotipo que 44/2 utilizando los mismos criterios de selección y sin la participación del elemento móvil. En este capítulo describimos la obtención y caracterización de distintas variedades de mutantes de fenotipo débilmente hemolítico a partir de *L. ivanovii*, entre los cuales hemos podido identificar un tipo que reproduce enteramente las características de 44/2. Trabajando con estos mutantes, en este capítulo hemos logrado identificar la naturaleza del defecto genético de 44/2.

### 3.2.2. Resultados.

#### 3.2.2.1. Identificación de variantes hemolíticas de *L. ivanovii*.

Partiendo de la cepa ATCC 19119<sup>T</sup>, aproximadamente  $5 \times 10^4$  colonias fueron analizadas en placas de agar sangre durante dos meses para aislar variantes alteradas en su fenotipo hemolítico. Nuestra prolongada experiencia con *L. ivanovii* nos ha permitido observar que ciertas condiciones de cultivo *in vitro*, como una permanencia prolongada en placas de ASO o la exposición a temperatura elevada, favorecen la aparición de colonias con fenotipo hemolítico alterado. Ante la posibilidad de que la mutación que buscábamos pudiese estar influida por las condiciones de manipulación en el laboratorio, para aumentar la probabilidad de su aislamiento utilizamos cuatro protocolos distintos:

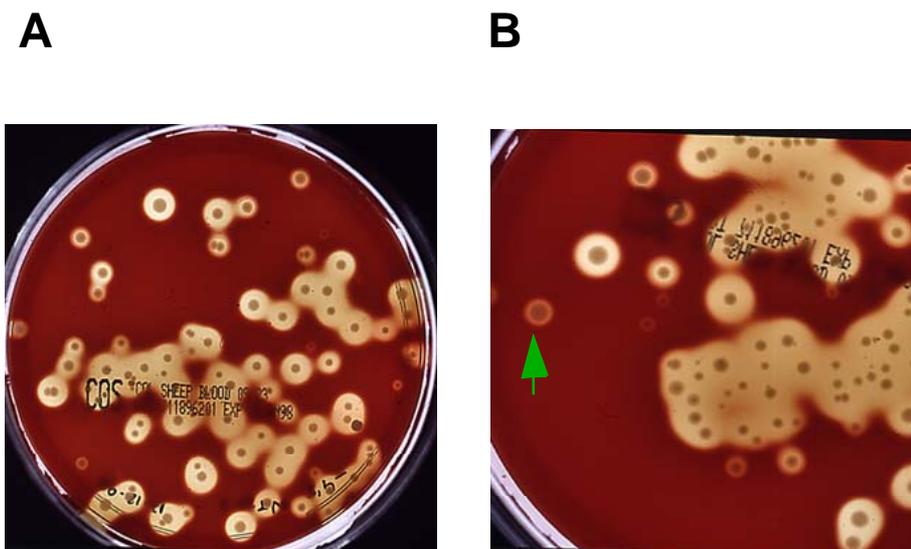
A) Incubación a temperatura óptima (37°C) y permanencia prolongada en fase exponencial de crecimiento mediante subcultivos periódicos antes de alcanzar la fase estacionaria (cada 8 h).

B) Incubación a temperatura subóptima (30°C) y subcultivo periódico inmediatamente tras la transición a fase estacionaria (cada 12 horas).

C) Incubación a la máxima temperatura de crecimiento para *L. ivanovii* (41,5°C, previamente determinada experimentalmente por nosotros) y subcultivo tras permanencia prolongada en fase estacionaria (cada 48 h) en las mismas condiciones.

D) Permanencia prolongada (1 mes) en fase estacionaria en condiciones de estrés térmico (41,5°C).

En todos los casos se empleó como medio de cultivo el BHI. A partir de estos cultivos se sembraron diariamente diluciones apropiadas en placas de agar sangre de oveja (ASO), que se incubaron a 41,5°C durante 48 ó 72 horas en los procedimientos A y B y a 37°C durante 24-36 horas en los restantes. Las diluciones se ajustaron para obtener un número óptimo de unidades formadoras de colonias (UFCs) por placa comprendido entre 150 y 200 UFCs, que permitía claramente la identificación de variantes en el fenotipo hemolítico.



**Figura 3.2.1.** Variantes hemolíticas obtenidas tras someter a diversas condiciones de estrés térmico y prolongada fase estacionaria de crecimiento a *L. Ivanovii*.

**A.** Heterogeneidad de fenotipos hemolíticos presentados por *L. ivanovii* después de haber sido cultivada durante 7 días a 41,5°C.

**B.** Obtención de la variante espontánea débilmente hemolítica M4, mediante siembra sobre una placa de agar sangre de la dilución  $10^{-4.5}$  de un cultivo mantenido durante 9 días a 41,5°C.

En todos los procedimientos, salvo en el caso del protocolo A, en algunas ocasiones se obtuvieron, en los cultivos primarios en ASO, un gran número de variantes de fenotipo hemolítico con distintos grados de reducción en la actividad hemolítica (Fig. 3.2.1). Estas variantes coloniales revertían, sin embargo, al fenotipo silvestre tan pronto como eran subcultivadas en ASO a 37°C. Sólo cinco colonias, aisladas siguiendo los procedimientos A (variantes IN-1 y NH-1), B (variante GD-1) y D (variantes GD-3 y M4), mantuvieron de forma estable unas características hemolíticas alteradas.

IN-1 se identificó en el décimo subcultivo y NH-1 fue aislado a partir de las colonias de IN-1 durante los subcultivos periódicos a que fue sometido en ASO a 37°C para la comprobación de su estabilidad fenotípica. GD-1 fue obtenida en el sexto subcultivo. Las variantes GD-3 y M4 se obtuvieron en dos experimentos independientes, tras 3 y 9 días respectivamente, de permanencia a 41,5°C.

### 3.2.2.2. Clasificación de las variantes.

La actividad hemolítica de *L. ivanovii* resulta principalmente de la acción sobre las membranas de los eritrocitos de la hemolisina, ILO, y la SMasa, SmcL. Existen otros dos factores membranolíticos en *Listeria* que también pueden contribuir a la actividad hemolítica, PlcA y, especialmente PlcB, aunque su papel es sólo accesorio. A esta actividad lítica contribuyen también las fosfolipasas PlcA y, especialmente, PlcB, aunque sólo de forma accesorio. La actividad ILO se traduce en un estrecho halo de lisis circunscrito al perímetro de las colonias bacterianas mientras que la actividad de SmcL se manifiesta en forma de amplio halo de hemólisis incompleta que se extiende alrededor del primero, dando lugar al ya mencionado efecto lítico bizonal que caracteriza a *L. ivanovii*. SmcL, además, es responsable del efecto CAMP en forma de pala con *R. equi* (196,300,470,571) (véase capítulo anterior). La actividad de PlcB, por otro lado, se puede detectar fácilmente en placas de agar yema de huevo a través del halo de opacidad que aparece alrededor del crecimiento bacteriano como resultado de la degradación de la lecitina y consecuente precipitación de los ácidos grasos del fosfolípido. La expresión de ILO y PlcB depende estrechamente del activador transcripcional PrfA, de tal forma que estos factores membranolíticos están ausentes en un mutante *prfA*. SmcL, en cambio, es totalmente independiente de PrfA y un mutante deficiente en este regulador produce el enzima a los mismos niveles que la cepa silvestre.

Para clasificar las variantes obtenidas y caracterizar de forma preliminar la posible base molecular de su defecto, estudiamos la producción de ILO, SmcL y PlcB. Para ello utilizamos tanto los marcadores morfológicos indirectos anteriormente mencionados como determinaciones específicas para los mismos. Estas determinaciones consistieron en la detección, en el sobrenadante de cultivo, de la hemolisina, (mediante *Western blot* con anti-ILO), y de las actividades SMasa y lecitinasa, (mediante la detección de sus correspondientes productos de reacción a través de ensayos *ad hoc*: véase sección de Material y Métodos). El análisis de las variantes se completó con el estudio de los perfiles de proteínas del sobrenadante de cultivo (SC), realizado principalmente con el fin de detectar la producción de la proteína PrfA-dependiente de 27, kDa i-InIE, ausente en el mutante 44/2.

Los resultados de estos análisis aparecen en las Figs. 3.2.2 a 3.2.5 así como en la Tabla 3.2.1. En virtud de estos resultados, hemos clasificado a las variantes fenotípicas en cuatro categorías o tipos distintos, designados I a IV.

**Clase I.** Esta clase se ha definido para la variante M4, que muestra una alteración pleitrópica consistente en una drástica reducción en la producción de las actividades hemolítica y lecitinasa pero manteniendo un patrón análogo al de la cepa silvestre en lo que respecta a los marcadores asociados a SmcL (actividad SMasa y efecto CAMP en forma de pala). Este patrón era compatible con una alteración en el regulador PrfA. Para comprobar esta posibilidad, investigamos si otro carácter dependiente de PrfA, como es la utilización de G-1-P, también estaba afectado. Observamos un retraso muy considerable en la utilización de dicho azúcar, no asociado a una disminución general en la capacidad de crecimiento de M4 con respecto a la cepa parental (Fig. 3.2.6), lo cual afianzaba la hipótesis de que, efectivamente, esta variante era deficiente en PrfA. Esta posibilidad era igualmente sugerida por la ausencia en el sobrenadante de cultivo de la proteína i-IlnIE (Fig. 3.2.4 y Tabla 3.2.1), cuya expresión ya demostramos que es también PrfA-dependiente (véase capítulo anterior).

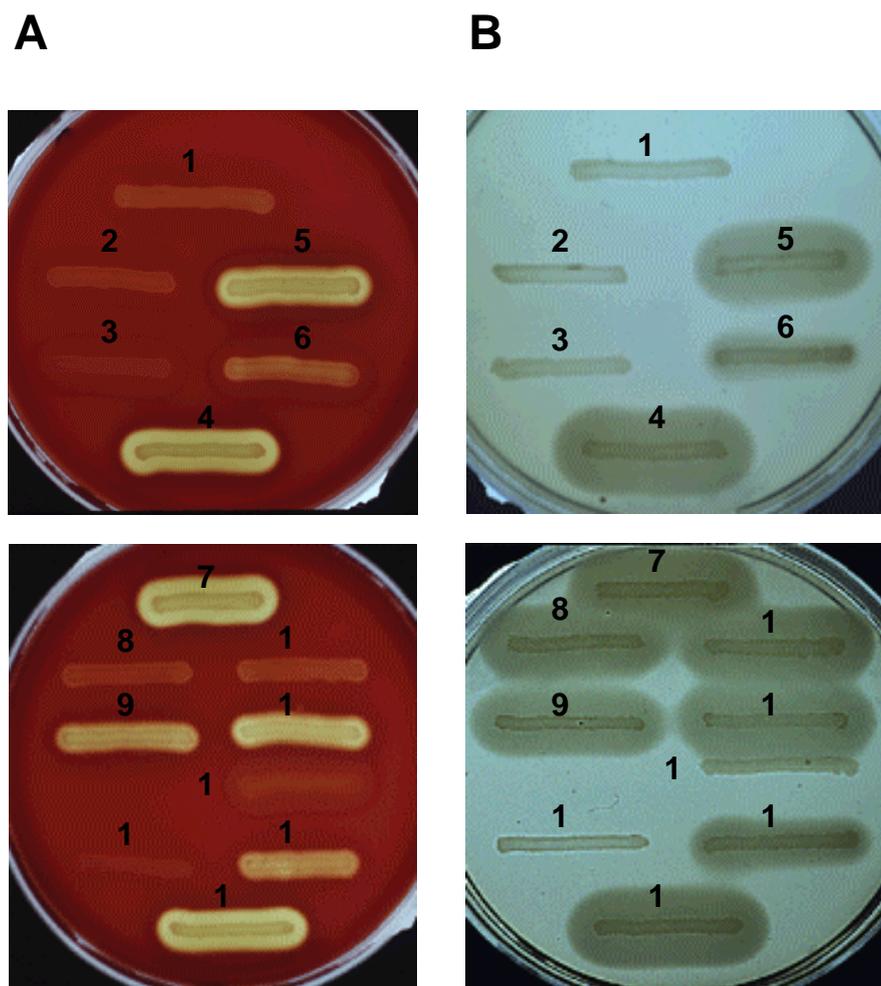
Para determinar si el fenotipo de M4 se debía realmente a una alteración en PrfA, amplificamos y secuenciamos el gen regulador (incluyendo su región promotora) y lo comparamos con el de la cepa silvestre, ATCC 19119. Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado a partir de DNA cromosómico, utilizando una *Taq* polimerasa de alta fidelidad para evitar introducir errores en las amplificaciones (véase Material y Métodos, apartado 4.11). Pudimos comprobar que existía una mutación puntual en *prfA* de M4 consistente en la delección de una A en la posición 649 a partir del ATG de iniciación de la traducción (triplete 216). Esta mutación producía un cambio en la fase de lectura, dando lugar a una proteína PrfA mutante 11 residuos más corta y cuyos últimos 10 aa eran nuevos (216-LPLNLTGSI-226) (Fig. 3.2.7). Esta modificación era suficiente para explicar la alteración fenotípica dependiente de PrfA.

Un mutante  $\Delta prfA$  puede ser complementado en *trans* con *prfA* clonado en un plásmido multicopia (143,144). Con el fin de analizar de forma directa si la mutación presente en el alelo M4 de *prfA* (*prfAM4*) es realmente la responsable del fenotipo de clase I, introdujimos tanto *prfAM4* como el alelo silvestre clonados en el vector bifuncional pHP59 (223) (véase apartado 4.11 de Materiales y Métodos) en un mutante  $\Delta prfA$  así como en M4. El fenotipo de las bacterias complementadas se analizó utilizando los criterios arriba descritos para la caracterización de las variantes. La introducción del alelo *prfA* restauró el fenotipo silvestre en M4, descartando la implicación de una mutación secundaria en el origen del fenotipo de clase I. Por otro lado, el alelo *prfAM4* confirió a  $\Delta prfA$  un fenotipo similar a M4. Estos resultados permitieron confirmar la deficiencia funcional de la proteína PrfA mutante.

Al comparar el fenotipo de M4 con el del mutante  $\Delta prfA$  de *L. ivanovii* (144), en el que la expresión PrfA-dependiente está totalmente impedida debido a la ausencia del regulador, observamos que si bien ambas cepas no expresaban actividad lecitinasa, en placas de ASO los niveles de actividad hemolítica de M4 eran superiores a los de  $\Delta prfA$  (Fig. 3.2.2). Mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), el perfil de las proteínas precipitadas del SC no nos permitió detectar presencia de ILO. No obstante, corroborando

nuestros resultados en placa, mediante *Western immunoblotting* comprobamos que, aunque a un nivel muy bajo, había producción de ILO (Fig. 3.2.4). Esta producción no fue detectada utilizando la misma técnica en el caso del mutante  $\Delta prfA$ .

La producción residual de ILO por parte de M4 y el retraso en la utilización de la G-1-P, pero no la incapacidad total de utilización de dicho azúcar como en el caso del mutante  $\Delta prfA$  (Tabla 3.2.1), indican una actividad residual de la proteína reguladora sintetizada a partir del alelo *prfAM4*. Esta



**Figura 3.2.2.** Actividades hemolítica y lecitinasasa en agar sangre (panel **A**) y agar yema de huevo (panel **B**) de las variantes débilmente hemolíticas y sus correspondientes *trans* complementaciones con los alelos silvestres y mutados de *prfA*. En medio sólido las actividades se han valorado semicuantitativamente con la siguiente escala: -, reacción negativa; + a +++, distintas intensidades de reacción positiva.

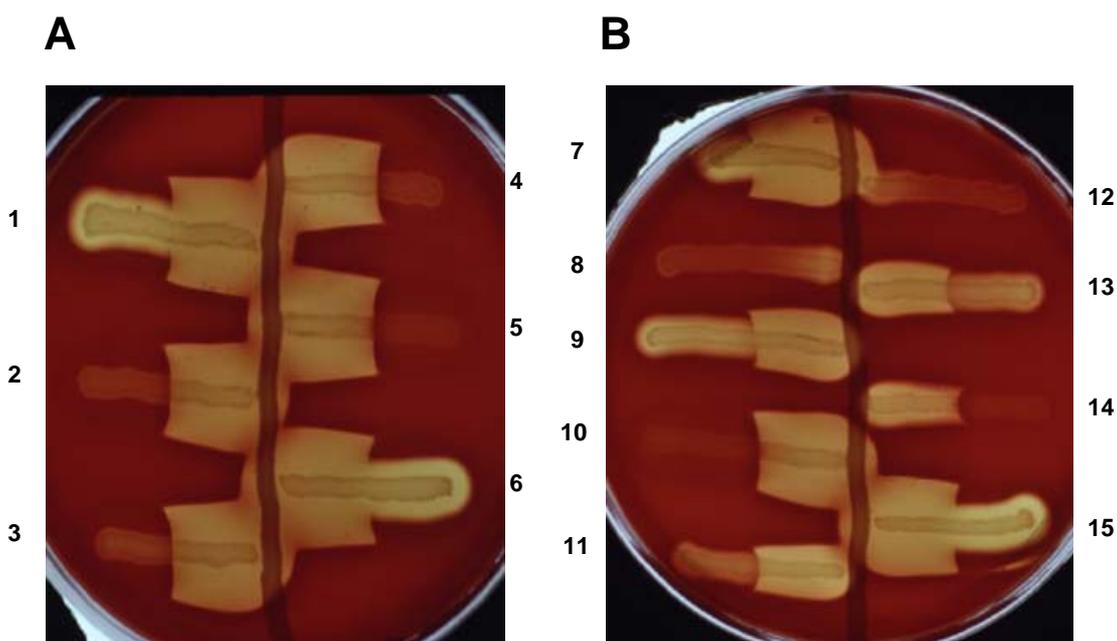
**1**, Mutante  $\Delta prfA$  *trans* complementado con el alelo *prfAM4* (pHM4); **2**, variante M4 perteneciente a la clase I; **5**, variante M4 *trans* complementado con el alelo salvaje *prfA*; **3**, mutante  $\Delta prfA$ ; **6**,  $\Delta prfA$  *trans* complementado con el alelo salvaje de *prfA* (144); **4**, *L. ivanovii*<sup>T</sup> (WT); **7**, mutante  $\Delta i-inIE$  (148); **8**, mutante en *smcL*, *smcL::ΩKm* (196); **12**, GD-3 perteneciente a la clase IV; **9** variante IN-1 perteneciente a la clase II; **13**, IN-1 complementado con el alelo silvestre *prfA*; **14**, mutante  $\Delta prfA$  (144) *trans* complementado con el alelo *prfA* mutado de NH-1 (pHNNH-1); **10** se corresponde con la variante NH-1 perteneciente a la clase III; **15**, variante NH-1 complementada en *trans* con el alelo salvaje *prfA* (pHprfA) y **11** *L. ivanovii*<sup>T</sup> (WT).

WT, representa el fenotipo caracterizado por un fuerte doble halo de  $\beta$ -hemólisis. El halo interno se corresponde con una hemólisis total y el halo externo con una hemólisis incompleta (véase apartados

1.2.1 y 3.2.1).  $\Delta prfA$ , su fenotipo se corresponde con una pérdida casi total de hemólisis completa (+) y con un doble halo de hemólisis incompleta inalterado. M4 y  $\Delta prfA+pHM4$ , sus fenotipos se corresponden con un disminución drástica de hemólisis total (++) y un halo de hemólisis incompleta inalterado. NH-1, exhibe una disminución casi total de su fenotipo hemolítico correspondiente al halo de hemólisis total (+), presentando una disminución a la mitad de del halo externo de hemólisis incompleta (+). IN-1 y NH-1+pHprfA, se corresponden con una disminución en el doble halo de hemólisis tanto del halo externo de hemólisis incompleta (+) como del halo de hemólisis completa (+++). GD-3/*smcL:: $\Omega$ Km*, se corresponden con el fenotipo caracterizado por presentar un débil halo de hemólisis completa (+) y la pérdida del doble halo de hemólisis incompleta (-). Las actividades lecitinasas se manifiestan por la presencia de halos de opacidad alrededor de las estrías de crecimiento bacteriano. Se corresponden exactamente con un patrón salvaje o alterado de la expresión PrfA dependiente.

actividad residual sería suficiente para inducir bajos niveles de expresión del promotor de *hly*, cuya caja PrfA es perfecta y por tanto altamente sensible a la activación por PrfA, pero insuficiente para inducir la expresión a partir del promotor *Pmpl* del operón *mpl-actA-plcB*, responsable de la producción de la actividad lecitinasa y cuya caja PrfA contiene un desapareamiento, requiriendo por tanto niveles superiores de de regulador funcional para su activación (véase apartado 1.3.3 y Fig. 1.2).

En conclusión, hemos determinado que el fenotipo de clase I se debe a una mutación puntual en *prfA* que da lugar a la síntesis de una proteína reguladora alterada, con una función transcripcional muy reducida pero no totalmente anulada.



**Figura 3.2.3.** Reacciones de hemólisis sinérgica (test de CAMP) de las variantes débilmente hemolíticas (estrias horizontales) con *R. equi* (estrias verticales).

1, M4+pHprfA; 2,  $\Delta prfA+pHM4$ ; 3,  $\Delta prfA+pHprfA$ ; 4, M4; 5,  $\Delta prfA$ ; 6, *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>(WT); 7,  $\Delta i-inlE$ ; 8, *smcL:: $\Omega$ Km*; 9, IN-1+pHprfA; 10  $\Delta prfA + pHNH-1$ ; 11, NH-1+pHprfA; 12, GD-3; 13, IN-1; 14, NH-1 y 15, *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>(WT). Se ha empleado la cepa MAD (470) hiperproductora de colesterol oxidasa para de *R. equi*.

Se pueden observar las tres formas diferentes de efecto CAMP descritas en la tabla 3.2.1 y en el texto. (i) Pala grande: característica del efecto CAMP que exhiben aquellas cepas que presentan un patrón de producción no alterado de actividad SMasa dependiente exclusivamente de SmcL (véase texto) representado por WT (6 y 15),  $\Delta i-inlE$  (7), M4 (4) y  $\Delta prfA$  (5). (ii) Pala pequeña: característica de un efecto CAMP que se corresponde con una producción disminuida a la mitad de la actividad SMasa dependiente de SmcL (véase tabla 3.2.1 y texto). Se presenta en las variantes NH-1 (14), IN-1 (3) y sus complementaciones con *prfA* (9 y 10). (iii) Efecto en forma de cerilla análogo al presentado por

*L. monocytogenes*: se corresponde con una falta total de actividad SMasa dependiente de SmcL característica de los mutantes pertenecientes a la clase IV como GD-3 (12) y al mutante *smcL::ΩKm* (8) (utilizado como control de una cepa incapaz de producir SmcL por presentar una inserción en *smcL* (196)).

Tabla 3.2.1. Propiedades de los mutantes débilmente hemolíticos

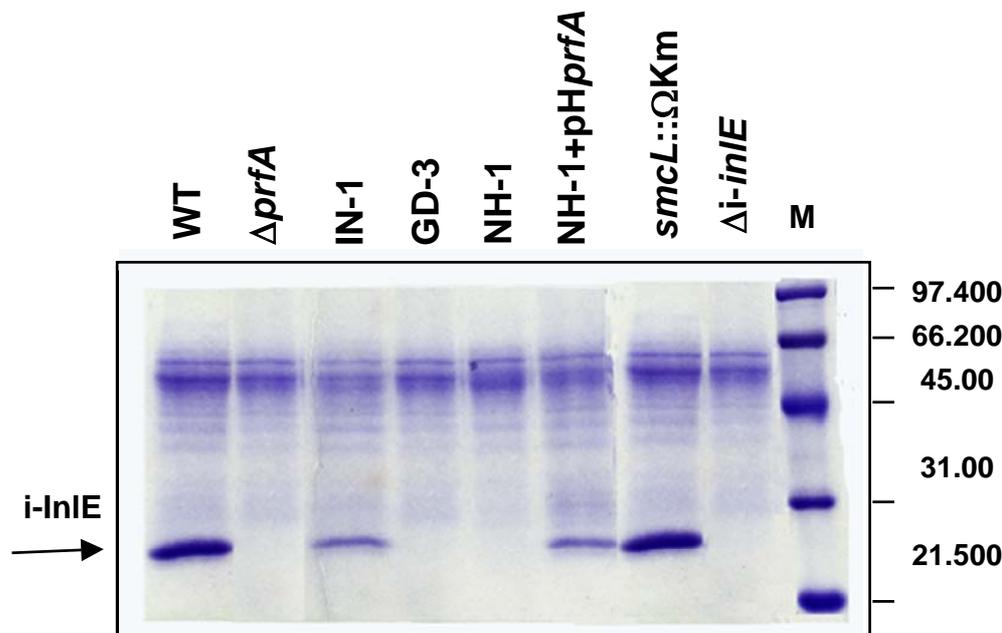
DESPUÉS DE LA BIBLIOGRAFÍA.

Figura 3.2.4. al final de la bibliografía

**Figura 3.2.4.** SDS-PAGE y *Western immunoblot* con anti-ILO de los SC del inicio de la fase exponencial precipitados con TCA.

**A.** Una misma cantidad correspondiente a 800  $\mu$ l de SC precipitado con TCA ha sido cargada en cada carril y SDS-PAGE en un 12% de acrilamida. La posición de ILO (58kDa) e i-InIE (27kDa) está indicada mediante flechas horizontales. Se observa una ausencia en la producción de ILO en todos los mutantes tanto deficientes (M4) como impedidos (NH-1,  $\Delta prfA$ ) en la expresión PrfA-dependiente. Debido a la gran cantidad de proteína no se aprecian prácticamente diferencias en la producción de i-InIE en el mutante IN-1. La producción de i-InIE está ausente en todos los mutantes con un fondo genético deficiente o impedido en *prfA* (M4, NH-1,  $\Delta prfA$ ), un mutante  $\Delta i-inIE$  y la variante perteneciente a la clase IV (GD-3). Aunque en el mutante  $\Delta i-inIE$  se aprecia claramente una débil banda de 27kDa, no se corresponde con SmcL como se ha propuesto (144) ya que, no se detecta en aquellos mutantes con un fondo genético deficiente o alterado en *prfA* y, por tanto, una ausencia en la expresión de *i-inIE* aunque la expresión de *smcL* sigue estando inalterada.

**B.** *Western immunoblot* con anti-ILO de las proteínas mostradas en A. Se observa una misma cantidad de ILO producida en los mutantes con fenotipo hemolítico alterado independiente de PrfA. Debido a la mayor sensibilidad se puede apreciar, que en el mutante M4 y la complementación de  $\Delta prfA$  con el alelo mutado *prfAM4* existe una pequeña producción de ILO (están señaladas mediante dos flechas horizontales), corroborando los resultados observados previamente en placas de ASO en los que M4 y  $\Delta prfA$ +pHM4 presentan una hemólisis ligeramente superior a los mutantes PrfA-impedidos (NH-1,  $\Delta prfA$ ).

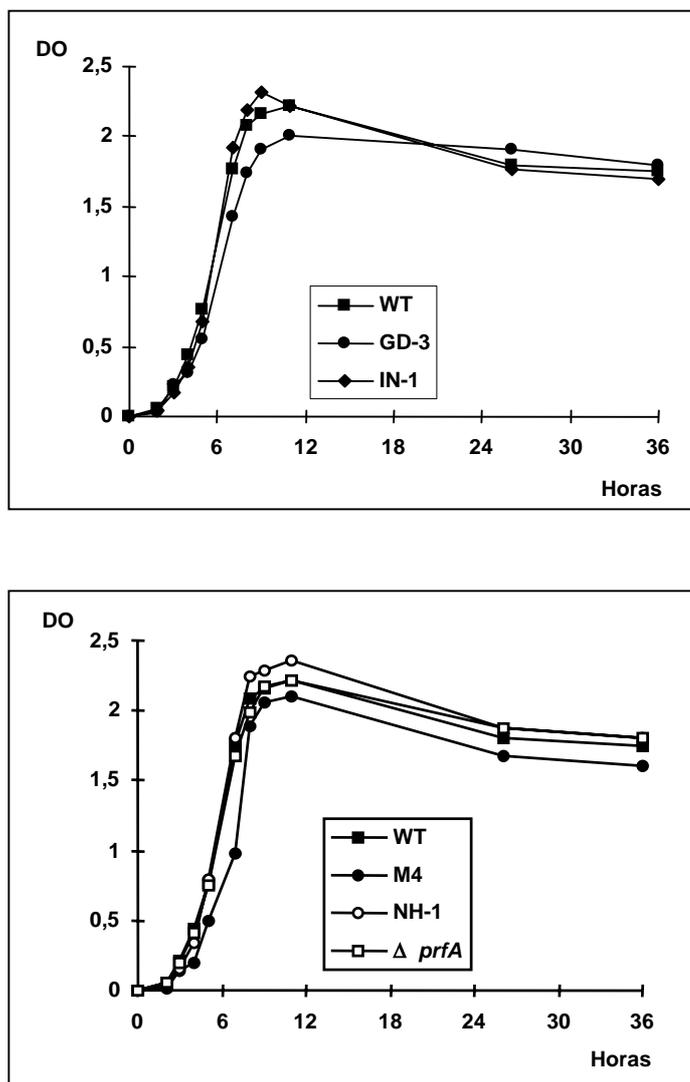


**Figura 3.2.5.** SDS-PAGE de concentraciones diluidas de las proteínas de SC mostradas en la Fig 3.2.4. Así, se pueden observar diferencias en el patrón de producción de i-InIE entre los distintos mutantes. Una reducción del 50% en la producción de i-InIE se observa en el mutante IN-1 y en NH-1+pHprfA. Aunque el mismo volumen de SC precipitado fue cargado en cada carril, el cálculo de la cantidad de i-InIE ha sido normalizada con la cantidad de proteína de cada carril. La cuantificación y la normalización de i-InIE se ha realizado mediante el *software* del *Gel Doc 1000 system* de *Bio-Rad*.

**Clase II.** En esta clase se encuadra la variante IN-1. Aunque muestra una disminución significativa en la actividad hemolítica (Fig. 3.2.2), a diferencia del anterior, no manifiesta alteraciones en el patrón de expresión de los caracteres dependientes de PrfA (ILO, PlcB, utilización de G-1-P y producción de i-InIE). En este tipo, la reducción de la actividad hemolítica está asociada con una disminución del halo de hemólisis incompleta atribuible a SmcL. Ello a

su vez se correlaciona con una disminución del 50% en la actividad SMasa liberada al SC (Tabla 3.2.1) y una reacción sinérgica con *R. equi* de menor en la que la característica pala aparece con un menor tamaño (Fig. 3.2.3).

Del análisis por SDS-PAGE de las proteínas del SC cabe resaltar cómo la producción de *i-InIE*, pero no la de *ILO*, se encuentra reducida en un 50% (Figs. 3.2.4 y 3.2.5). Esto indica una disminución coordinada, independiente del control ejercido por *PrfA*, en la expresión de *i-inIE* y *smcL*. Comprobamos que las curvas de crecimiento de la variante IN-1 y ATCC 19119<sup>T</sup> eran idénticas y que por lo tanto las diferencias fenotípicas observadas no estaban relacionadas con alteraciones en la capacidad de multiplicación (Fig. 3.2.6).



**Figura. 3.2.6.** Curvas de crecimiento de las variantes débilmente hemolíticas cultivadas en BHI a 37°C. La densidad óptica se midió a 600 nm. Las curvas de crecimiento en los distintos variantes son prácticamente superponibles con respecto a la cepa parental de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>, indicando que las diferencias observadas en el patrón de producción de los distintos

factores de virulencia observados no se debe a una diferencia en su cinética de crecimiento. En la gráfica de la parte superior se comparan las variantes que no presentan una alteración en el patrón de regulación dependiente de PrfA. En la gráfica de la parte inferior se comparan las variantes que presentan un patrón de expresión dependiente de PrfA alterado junto con un mutante en *prfA* derivado de la cepa tipo de *L. ivanovii*.

Ya hemos comentado en el capítulo anterior que paralelamente a este estudio logramos identificar los determinantes genéticos responsables de la producción de i-InIE (144) y SmcL (196). Dichos genes, *i-inIE* y *smcL*, se encuentran en la misma región cromosómica (véase siguiente capítulo) y se transcriben de forma divergente, estando separados por un tercer gen, *i-inIF*, transcrito en la misma dirección que *i-inIE* y que, al igual que este último, codifica una internalina secretada de pequeño tamaño. Hemos determinado que los tres genes se transcriben principalmente de forma monocistrónica (véase Fig. 3.1.7 y ref. 144). Sin embargo, *i-inIF* e *i-inIE* pueden también expresarse, alternativamente, a partir de un transcrito bicistrónico, el cual es mucho más tenue (148).

Aunque físicamente en la misma región, *i-inIE* y *smcL* presentan un patrón de regulación diferente. Mientras *i-inIE* se ha descrito como estrictamente dependiente de PrfA (144), la expresión de *smcL* es, como ya hemos señalado antes, independiente del regulador central de la virulencia de *Listeria* (196,300,470). A pesar de esta regulación diferencial, la producción de i-InIE y SmcL en el variante IN-1 se caracteriza por mostrar una reducción coordinada en la que no participa PrfA. Existirían dos posibilidades para explicar este defecto concomitante en la expresión de *i-inIE* y *smcL*:

(i) Presencia de una alteración en la zona intergénica entre *smcL* y el locus *i-inIFE*, que afectaría a las zonas promotoras de dichos determinantes y que afectaría de forma similar a su expresión. Para analizar esta posibilidad, amplificamos por PCR y secuenciamos las regiones intergénicas entre *i-inIF* e *i-inIE* y entre *smcL* e *i-inIF* en el variante IN-1 y en la cepa parental. Al comparar las secuencias comprobamos que existía una diferencia en la zona intergénica *smcL/i-inIF* de ambas cepas consistente en la ausencia en IN-1 de una A en la posición -210 con respecto al inicio de la transcripción de *i-inIF* y -62 con respecto al triplete de inicio de la traducción de *smcL*. Aunque esta mutación podría a priori afectar a la expresión de *smcL* y del (débil) transcrito bicistrónico *i-inIEF*, la significación de la misma en cuanto a posible causa del fenotipo de IN-1 queda cuestionada por el hecho de que *i-inIF* e *i-inIE* se transcriben, como hemos señalado, fundamentalmente de forma monocistrónica. Así, la mutación no tendría por qué afectar a la expresión de *i-inIE*, salvo en el caso de que ejerciese un fuerte efecto *cis* corriente abajo por un mecanismo indeterminado.

(ii) Existencia de un regulador no identificado que controlaría la expresión de *smcL* e *i-inIE* y cuya funcionalidad (o expresión) se habría visto alterada por una mutación espontánea.

**Clase III.** El variante de este tipo fue aislado a partir de un subcultivo de IN-1. Además de las características del fenotipo de clase II, presenta una pérdida total de los caracteres PrfA-dependientes (Tabla 3.2.1 y Fig. 3.2.2 y 3.2.3). Así, no se detectó en el perfil SDS-PAGE del

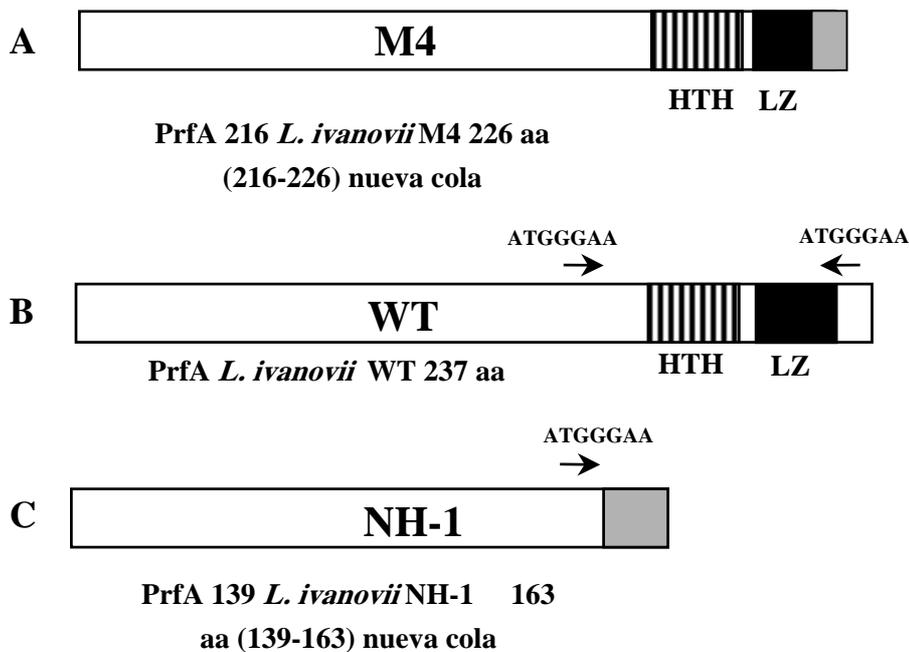
SC la presencia de la banda de 27 kDa de i-InIE, ni de ILO mediante *Western immunoblotting* (Fig. 3.2.5). En lo que se refiere a esta toxina, el fenotipo del variante NH-1 se diferencia del manifestado por el mutante PrfA-deficiente M4 (clase I), en donde la producción de ILO no se encuentra totalmente abolida. Se parecía, en cambio, al del mutante  $\Delta prfA$ , que no produce cantidades detectables de la hemolisina (Fig. 3.2.4).

Para determinar si existía en NH-1 algún tipo de alteración en *prfA*, amplificamos mediante PCR y secuenciamos el locus siguiendo una estrategia similar a la descrita para M4. Una alteración en este locus fue puesta inmediatamente de manifiesto al comprobar el tamaño del producto amplificado, el cual era significativamente más pequeño que el de la cepa silvestre parental. El análisis de la secuencia del alelo mutado *prfANH-1* demostró la existencia de una deleción en fase de 395 nts, entre la posición 410 a la 805. Al analizar la secuencia de *prfA* pudimos identificar la presencia de una repetición directa con la secuencia 5'-ATGGGAA-3' coincidiendo con los extremos de la zona delecionada, quedando una sola copia de la misma en el alelo mutado. Es muy posible por tanto que la mutación en *prfANH-1* haya sido debida a la deleción espontánea por un mecanismo de recombinación homóloga del fragmento comprendido entre ambas unidades de la repetición. La proteína resultante es un PrfA truncado de 163 aa, con 22 aa nuevos en su extremo C-terminal y del que está ausente el motivo de unión al DNA (Fig. 3.2.7). Esto sería suficiente para explicar la total ausencia de expresión PrfA-dependiente en NH-1.

Para confirmar el defecto funcional de la proteína PrfA truncada de NH-1, realizamos ensayos de *trans* complementación con los alelos silvestre y *prfANH-1* utilizando el vector pHPS9 (véase Material y Métodos). La introducción del alelo mutante no produjo ningún efecto sobre el fenotipo de  $\Delta prfA$  (Figs. 3.2.2 y 3.2.3). En cambio, la complementación de NH-1 con *prfA* silvestre hizo que este mutante readquiriese el fenotipo clase II de su cepa parental, IN-1. Estos resultados confirmaron de forma directa la completa afuncionalidad de la proteína PrfA mutante sintetizada a partir del alelo delecionado *prfANH-1* y demostraron que NH-1 tiene dos mutaciones independientes, una de ellas la presente en su cepa parental, todavía por caracterizar genéticamente, y la otra en PrfA, contribuyendo ambas de forma acumulativa al fenotipo débilmente hemolítico de esta clase de mutante.

Resulta interesante constatar que, a pesar de que la actividad SMasa que presenta NH-1 es ligeramente inferior a la que muestra IN-1, sus efectos CAMP exhiben la misma forma de pala pequeña (véase Tabla 3.2.1 y Figs. 3.2.2 y 3.2.3). Por otro lado, un mutante  $\Delta prfA$ , y por tanto impedido en la expresión de *plcB* (314), presenta una reducción en su actividad SMasa (Tabla 3.2.1) a pesar de exhibir un patrón silvestre de expresión de *smcL* (196). Estas observaciones encuentran una explicación en el hecho de que la fosfolipasa PlcB, de amplio rango de sustrato, tiene cierta actividad sobre la esfingomielina (182,196,561). Dado que NH-1 e IN-1 se diferencian en la expresión PrfA-dependiente – y por ende en la producción de PlcB – pero mantienen un efecto CAMP de morfología e intensidad idénticas, podemos concluir que la reacción de hemólisis sinérgica con *R. equi* depende exclusivamente de la actividad SMasa de SmcL. Esto implica que no es sólo la capacidad de desdoblar la esfingomielina sino otra característica propia de la molécula de SmcL, posiblemente relacionada con su capacidad de interaccionar e insertarse en la bicapa lipídica de la membrana, la que influye sobre el fenómeno lítico.

**Clase IV.** Este tipo de variante, representado por GD-1 y GD-3, presenta un patrón silvestre de expresión PrfA-dependiente pero muestra una falta absoluta de actividad SMasa y, concomitantemente, un efecto CAMP modificado en forma de cerilla, similar al que exhibe *L. monocytogenes* en presencia de *R. equi* (161,470,488,534,569). Además, el análisis de los perfiles proteicos del SC mediante SDS-PAGE reveló la ausencia total de producción de i-InIE (Tabla 3.2.1 y Figs. 3.2.2 y 3.2.3). Al ser comparados con 44/2, encontramos que el patrón fenotípico de dichas cepas variantes, obtenidas en experimentos independientes (véase más arriba), era absolutamente idéntico al del mutante previamente caracterizado (Tabla 3.2.1, Figs. 3.2.2 y 3.2.3 y capítulo anterior). Este hallazgo confirmaba que el fenotipo de 44/2 podría obedecer a una mutación espontánea reproducible en *L. ivanovii*.



## D

		*	
PrfAWT	101	D L K N L V S S D I T Q L F Y I I Q A L Q K Q V S Y S L A K F N D F S V N G K L G S I C G Q L L I L T Y V Y G E K N P D	
PrfAM4	101	D L K N L V S S D I T Q L F Y I I Q A L Q K Q V S Y S L A K F N D F S V N G K L G S I C G Q L L I L T Y V Y G E K N P D	
PrfA8/6	101	D L K N L V S S D I T Q L F Y I I Q A L Q K Q V S Y S L A K F N D F S V N G K I Q N S I K Y Y D Y K K N R I S L K E W L	
		HTH	LZ
PrfAWT	161	G I K I A L D N L T M Q E L G Y S S G I A H C S A V S R I L S K L K K E K V I E Y K H S S F Y V Q N L D Y L K K I A P K	
PrfAM4	161	G I K I A L D N L T M Q E L G Y S S G I A H C S A V S R I L S K L K K E K V I E Y K H S S F Y V Q N L D Y L K K L P L N	
PrfA8/6	161	G I K I A L D N L T M Q E L G Y S S G I A H C S A V S R I L S K L K K E K V I E Y K H S S F Y V Q T K Y K F L I I F L Y	
		E K S C F ~ ~ ~ ~ ~	
PrfAWT	221	L D E W F Y L A C P S S W E K F N ~ ~ ~ ~ ~	
PrfAM4	221	L T N G S I ~ ~ ~ ~ ~	
PrfA8/6	221	F L K C S ~ ~ ~ ~ ~	

**Figura 3.2.7.** Esquema de las principales características de organización de la estructura primaria de PrfA comparado con los dos PrfA mutados. Alineamiento de las secuencias de sus extremos C-terminales.

**B.** Representación de PrfA WT en el que se indica en su extremo C-Terminal el posible dominio **HTH** (*helix-turn-helix*, se corresponde con la zona rayada) y el motivo de cremalleras de leucinas **LZ** (*leucine zipper*, indicado por una zona punteada). Las dos repeticiones directas de secuencias de nucleótidos se encuentran señaladas por dos flechas horizontales.

**A.** Representación de PrfA del mutante M4 (PrfAM4). La región resaltada por una zona con fondo gris representa la secuencia nueva de PrfAM4, originada por el cambio en la fase de lectura producido por la delección de una A en su secuencia nucleotídica. La nueva secuencia de aminoácidos (representados por código unilettra, debajo) está representada en la parte final del esquema de PrfA.

**C.** Esquema de PrfA del mutante NH (PrfANH-1). El nuevo extremo generado en PrfANH-1 está representado esquemáticamente por un recuadro con fondo gris.

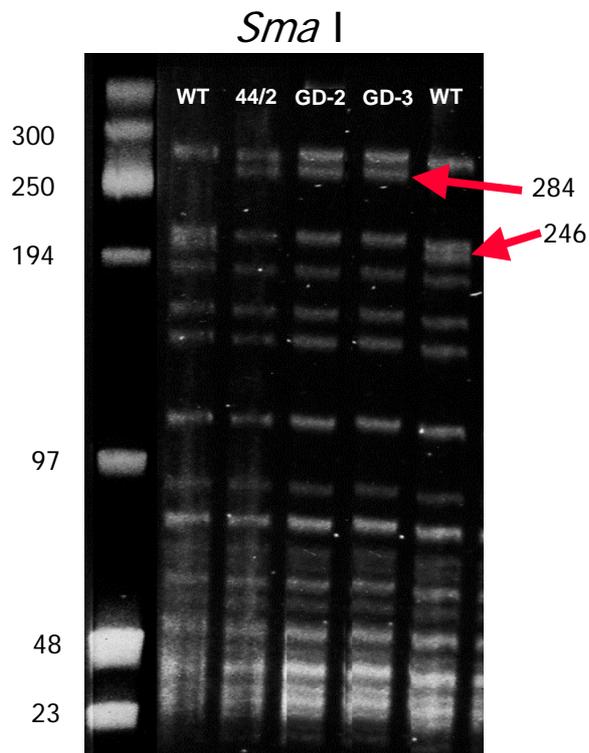
**D.** Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las proteínas mutantes PrfAM4, PrfANH-1, PrfA8/6 y PrfAWT. Las posiciones de los residuos aminoacídicos y la nombres de cada proteína se indica en el margen izquierdo. El dominio **HTH** y la cremallera de leucinas (**LZ**) se señalan mediante segmentos. Cabe destacar que la secuencia del gen *prfA* de la cepa silvestre ATCC 19119<sup>T</sup> determinada por nosotros difiere de la anteriormente publicada para esta cepa por Lampidis *et al.* (314) en el nucleótido 527 donde el cambio A→T produce la sustitución Ph→Tyr del aminoácido 115 que se resalta con un asterisco.

### 3.2.2.3. Caracterización genética del fenotipo variante de clase IV.

En la sección 3.1.2.4 mostramos que los transcritos específicos de *smcL* e *i-inIE* están totalmente ausentes en 44/2 (véase Fig. 3.1.7). En una primera aproximación para comprender el defecto genético asociado con la mutación espontánea presente en 44/2, GD-1 y GD-3, decidimos analizar mediante PCR la estructura de la región cromosómica donde se encuentran los loci afectados. Para nuestra sorpresa, no logramos obtener productos de amplificación para los genes *smcL* e *i-inIE* en ninguno de los tres mutantes. Tampoco obtuvimos producto de PCR para *i-inIF*, situado entre dichos genes, ni para el conjunto de la región *smcL/i-inIFE* utilizando oligonucleótidos flanqueantes (véase apartado 3.3.1 y Fig. 3.3.1). Estos resultados nos sugirieron la existencia de una deleción en la región que abarca los genes analizados. Para comprobarlo, realizamos un *Southern blot* con DNA cromosómico de la cepa silvestre y de los tres mutantes, utilizando como sonda el gen *smcL*. Sólo se detectó señal de hibridación en la cepa silvestre (Fig. 3.3.1), indicando la ausencia de secuencias homólogas a *smcL*.

Con el fin de determinar la especificidad de la mutación y la magnitud de la lesión cromosómica provocada por ésta, realizamos un análisis de macrorrestricción del DNA cromosómico de 44/2, GD-1 y GD-3 y de la cepa silvestre utilizando las enzimas *Apal*, y *SmaI* y electroforesis de campo pulsado. Con *Apal*, que genera tan sólo grandes fragmentos, en la zona de discriminación no se observaron diferencias. Con *SmaI*, sin embargo, pudimos observar una clara modificación del perfil de macrorrestricción, idéntica en los tres mutantes y consistente en la aparición de una banda de 284 kb y la desaparición de una de 246 kb (Fig. 3.2.8). Estos resultados indican que la región delecionada abarca al menos un sitio *SmaI* y que su tamaño es considerable. La presencia en tres mutantes de igual fenotipo, obtenidos en experimentos totalmente independientes, de una misma alteración cromosómica asociada con la deleción de varios loci, sugería que el defecto genético obedecía a un evento específico de recombinación.

De esta forma, lográbamos caracterizar por fin la base genética del fenotipo de 44/2: se trataba de una deleción específica, probablemente extensa y que ocurre en el cromosoma de *L. ivanovii* de forma espontánea con cierta frecuencia.



**Figura 3.2.8.** Perfiles de macrorrestricción obtenidos mediante digestión con *Sma*I y electroforesis con campo pulsado de los DNA cromosómicos de WT y los tres mutantes encuadrados en la Clase IV. En el lado izquierdo se indican en kb el tamaño de las bandas del marcador de talla molecular. A la derecha se resaltan con flechas las dos bandas que diferencian los perfiles, cuya talla se señala en kb a la derecha.

### 3.2.3. Discusión.

El principal objetivo del presente estudio ha sido confirmar la existencia de una mutación espontánea como causa del fenotipo del mutante denominado 44/2, tratando de reproducirla en condiciones controladas de laboratorio. Hemos logrado identificar dos mutantes, GD-1 y GD-3, con características fenotípicas idénticas a las de 44/2. La disponibilidad de estos mutantes y el análisis genético comparado con 44/2 nos ha permitido determinar la base molecular del fenotipo alterado. Se trata de una delección relativamente extensa del cromosoma de *L. ivanovii* que abarca la región donde se encuentran los genes cuyos caracteres están ausentes en 44/2, GD-1 y GD-3: *smcL* e *i-inIE*. El hecho de que hayamos sido capaces de obtener dos mutantes en experimentos independientes, examinando tan sólo un total de  $5 \times 10^4$  colonias, indica que la mutación ocurre con cierta frecuencia en *L. ivanovii*. En las tres cepas, esta mutación está asociada con un mismo cambio en el perfil de macrorrestricción del DNA cromosómico, lo que parece indicar que la misma ocurre a través de un mecanismo genético específico. Esta mutación nos ha conducido a la identificación de un extenso locus cromosómico exclusivo de *L. ivanovii* e implicado en la virulencia de esta especie (véase capítulo siguiente).

Para obtener estas mutaciones, hemos sometido a *L. ivanovii* a subcultivos periódicos y examinado éstos regularmente para la detección de alteraciones en el fenotipo hemolítico. Se emplearon cuatro protocolos distintos que incorporaban siempre, en alguna de las etapas, condiciones de estrés asociadas con elevada temperatura y/o fase estacionaria. La razón de elegir estas condiciones deriva de observaciones previas en las que pudimos constatar la mayor frecuencia de aparición en *L. ivanovii* de fenotipos hemolíticos aberrantes tras incubaciones prolongadas en condiciones disgenéticas. Precisamente, dos de los cinco mutantes estables de fenotipo hemolítico alterado que identificamos en el presente estudio, M4 y GD-3, representando cada uno de ellos una mutación distinta (clases I y IV), fueron aislados utilizando el protocolo D, que implicaba el mayor grado de estrés (permanencia prolongada en fase estacionaria en condiciones de choque térmico). En cambio, no se aisló ningún mutante utilizando el protocolo A, que, de los cuatro utilizados, era el que suponía para las bacterias unas menores condiciones de estrés (subcultivo regular en fase exponencial a temperatura óptima seguido de plaqueo a 41.5°C para el escrutinio del fenotipo hemolítico).

Una mayor frecuencia de aparición de mutaciones asociada a situaciones de estrés es un hecho bien conocido en bacterias. Este fenómeno refleja un mecanismo básico de evolución a corto plazo por el cual las bacterias tratan de adaptarse a situaciones biológicamente difíciles, tales como las que representan el choque térmico, la exposición a productos tóxicos o la escasez de nutrientes, a través de un incremento de la variabilidad genética. Mediante este mecanismo, el azar hace que algún miembro de la población bacteriana expuesta al estrés encuentre, bien sea por mutación endógena o adquisición de material genético exógeno, una combinación genética que facilite la adaptación y supervivencia a las condiciones hostiles, las cuales a su vez actúan como elemento selector de la variación (149,334).

Bajo esta óptica, no es difícil comprender el que se puedan seleccionar fácilmente en el laboratorio mutaciones que, como en nuestro caso, impliquen la pérdida de expresión de factores de virulencia (278,333). Por definición, estos factores de virulencia sólo son necesarios para la colonización y proliferación en los tejidos del hospedador animal y son, por tanto,

totalmente superfluos para el crecimiento *in vitro* en medios de cultivo ricos (332). En estas condiciones, y especialmente cuando concurren además situaciones de estrés que comprometen la homeostasis, mutaciones que conlleven la pérdida de expresión de factores de virulencia pueden suponer una ventaja selectiva para la bacteria ya que ésta se libera de la carga de tener que expresar (y replicar, cuando se trata de una delección) un material genético que no le es indispensable, con el consiguiente ahorro energético cuyo coste puede ser reinvertido en funciones vitales más importantes en ese momento (332).

En este contexto, en *L. ivanovii* concurren además unas circunstancias que pueden favorecer la selección de fenotipos asociados con un menor nivel de expresión de factores de virulencia en condiciones comprometidas para la fisiología bacteriana. Así, la expresión PrfA-dependiente se produce a máximos niveles en cuanto la bacteria detecta una temperatura superior a 37°C (409). Esto no ocurre en *L. monocytogenes*, en donde además de la temperatura, se requiere la detección de determinados factores derivados de la composición del medio de cultivo (24,45,123,329,377,424,466,469,538). Como consecuencia de ello, una característica diferencial muy prominente de *L. ivanovii* es la sobreexpresión constitutiva de sus factores de virulencia en condiciones normales de laboratorio. Además, *L. ivanovii* sobreexpresa también de forma constitutiva - en este caso independientemente de PrfA- al menos otro factor importante de virulencia, la SMasa SmcL, que está ausente en *L. monocytogenes* (196,300,571).

Esto explicaría la observada propensión en *L. ivanovii* a sufrir defectos transitorios en los niveles de expresión de sus factores citolíticos en respuesta a situaciones de estrés. Estas variaciones no han sido observadas en *L. monocytogenes*, lo cual puede obedecer sencillamente a una imposibilidad de la detección en un contexto ya de por sí caracterizado por muy bajos niveles de expresión, o bien a que éstas no aportan ninguna ventaja debido precisamente a que la débil producción de dichos factores no supone un coste metabólico significativo.

La síntesis constitutiva a niveles elevados de los factores de virulencia en *L. ivanovii* debería favorecer igualmente la aparición de mutaciones asociadas con la reducción o pérdida definitivas en la expresión de los mismos. Así ha sido efectivamente ya que, utilizando simplemente la actividad hemolítica como criterio de cribado, hemos sido capaces de seleccionar diferentes tipos de mutaciones estables asociadas con defectos en la expresión de los distintos tipos de factores citolíticos conocidos en *L. ivanovii*. Entre estas mutaciones hemos identificado no sólo la ya mencionada delección que afecta al gen codificante de la SMasa, sino también dos tipos de lesiones en el gen *prfA* asociados con defectos severos en la función del regulador central de la virulencia de *Listeria*, que es responsable de la síntesis de la hemolisina y de dos fosfolipasas que contribuyen a la desestabilización de la membrana eucariota (314,330,374).

Una de estas mutaciones *prfA*, identificada en el mutante M4 (clase I) consistió en una delección puntual de una A en el nucleótido 649 que determina un cambio en la fase de lectura y la formación de una proteína PrfA 11 residuos más corta y funcionalmente deficiente pero que, no obstante, mantiene una pequeña actividad residual. El cambio de fase de lectura en PrfAM4 da lugar, además, a la aparición de 10 aa nuevos en el acortado extremo C-terminal, de tal forma que se modifica el extremo final de un dominio similar a una cremallera de leucinas (LZ).

Este dominio LZ está definido por la presencia de residuos L a intervalos regulares y es exclusivo de PrfA dentro de las proteínas reguladoras pertenecientes a la familia Crp/Fnr (314). Se supone que podría jugar un papel en la dimerización de PrfA así como en otras posibles interacciones proteína-proteína heterólogas, aunque su función real no está ni mucho menos definida (316). Las características fenotípicas de M4 son similares a las que presenta un mutante PrfA deficiente denominado 8/6 (véase apartado 3.1.1 y ref. 314), obtenido por transposición y en donde la inserción del elemento móvil ocurrió en fase, dando lugar a un PrfA quimérico caracterizado por un extremo C-terminal 12 residuos más corto y dotado de 16 aa nuevos (Fig. 3.2.7). En ambos mutantes el dominio funcional HTH situado por delante del posible motivo LZ se encuentra intacto pero este último está alterado. Estas evidencias apuntarían hacia un papel relevante del dominio LZ y de los 10 aa C-terminales en la funcionalidad de PrfA.

El segundo tipo de mutación *prfA* ha ocurrido en el mutante NH-1 (clase III) como resultado de un proceso mutacional diferente que, muy probablemente, ha implicado un fenómeno de recombinación homóloga entre dos repeticiones directas situadas, respectivamente, en la parte central y 3' del gen regulador y que ha tenido como consecuencia la delección del fragmento flanqueado por las mismas. Mutaciones similares, implicando la delección de una porción de tamaño similar del gen regulador, han sido descritas en *prfA* de *L. monocytogenes*. En este caso, sin embargo, el proceso de delección no parece obedecer a un mecanismo de recombinación homóloga ya que la caracterización de dichas mutaciones no ha permitido revelar secuencias repetidas en las regiones que delimitan la zona eliminada (332,374). La consecuencia funcional ha sido la pérdida total de la actividad transcripcional, reflejada por el fenotipo del mutante NH-1, totalmente deficiente en la expresión de los genes del regulón PrfA, debido a que la delección abarca la región del dominio HTH implicado en la unión del regulador a su secuencia diana en el DNA (43,123,526,575).

Finalmente, hemos aislado un mutante, IN-1, cuya alteración consiste en una reducción coordinada de los niveles de expresión de *smcL* e *i-inlE*, dos genes situados en la misma región cromosómica de *L. ivanovii*. Uno de estos genes, *smcL*, se expresa constitutivamente (196), mientras que el otro, *i-inlE*, está estrechamente regulado por PrfA (144). No hemos podido identificar una alteración física de las zonas promotoras de dichos genes que pueda explicar convincentemente el defecto observado en su expresión. Esto nos lleva a plantear la existencia de un hipotético regulador que sometería a dichos genes a un control común. La modulación de la expresión de los factores de patogenicidad es el resultado de complejas interacciones entre múltiples niveles de control interrelacionados que permiten al microorganismo controlar y adaptar de forma óptima la utilización de sus recursos en los distintos ambientes y circunstancias donde se desarrolla su ciclo vital. Hasta ahora PrfA es el único regulador de genes de virulencia descrito en *Listeria* (142,303,337,374,468). El defecto caracterizado en IN-1 revela la existencia de un nivel de regulación que coordina la expresión de dos factores de virulencia sometidos inicialmente a un control diferencial de la expresión. Se trata del primer caso de corregulación entre un componente del regulón PrfA y un factor de virulencia expresado de forma independiente a dicho regulón y constituye un nuevo ejemplo de regulación coordinada de los genes de virulencia.

### **3.3. CARACTERIZACIÓN DE LIPI-2, UNA NUEVA ISLA DE PATOGENICIDAD DE *L. ivanovii*.**

### 3.3.1. Introducción.

En el capítulo precedente hemos identificado cuatro clases de mutantes de *L. ivanovii* con distintos grados de afectación en la expresión de su fenotipo hemolítico. La caracterización genética de tres mutantes obtenidos en experimentos independientes y que pertenecían a una de dichas clases, designada clase IV, nos permitió identificar una región cromosómica asociada con la virulencia en la que se encuentran los genes de la SMasa, *smcL*, y de dos pequeñas internalinas secretadas, *i-inIF* e *i-inIE*. En este capítulo describimos la caracterización genética del conjunto de la región afectada por la delección. Se trata de un segmento cromosómico que alberga una extensa isla de patogenicidad (PAI, de *pathogenicity island*) de 22 kb a la que hemos denominado LIPI-2 (*Listeria pathogenicity island 2*), formada por múltiples miembros de la familia multigénica de las internalinas. El estudio de la región de inserción de dicha PAI indica que puede tratarse de un “punto caliente” de variabilidad genética en el genoma de *Listeria*.

### 3.3.2. Resultados.

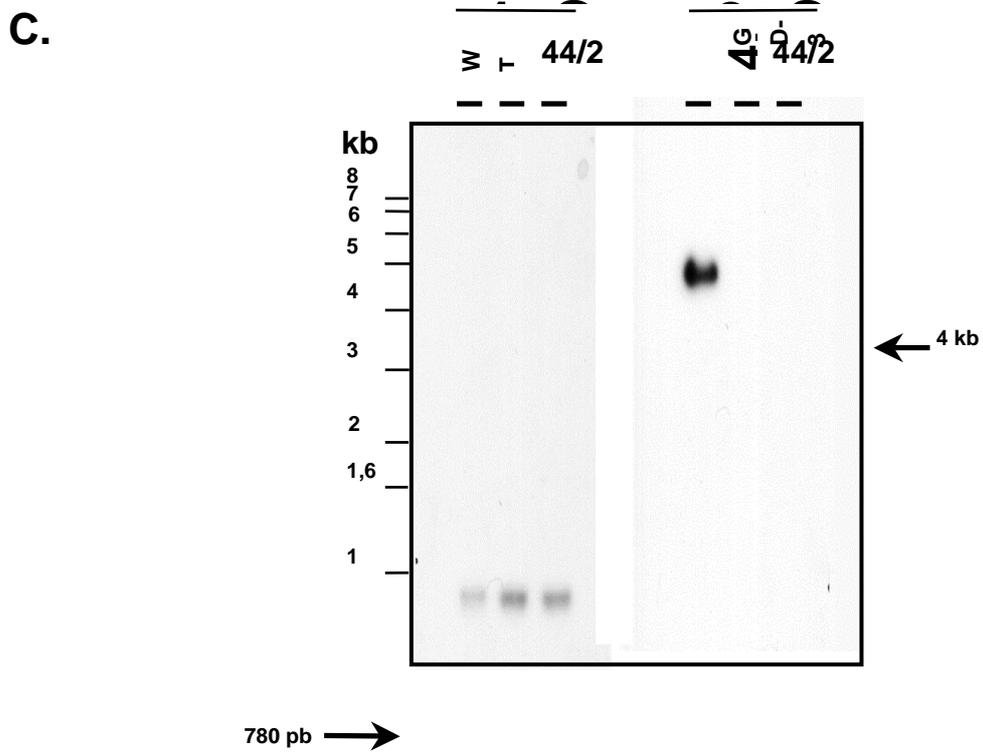
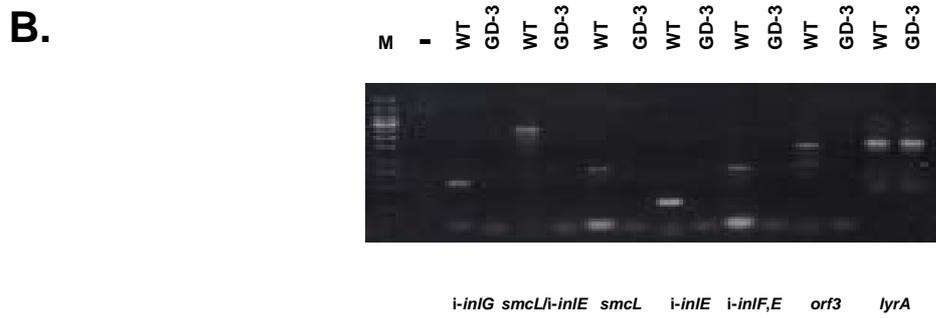
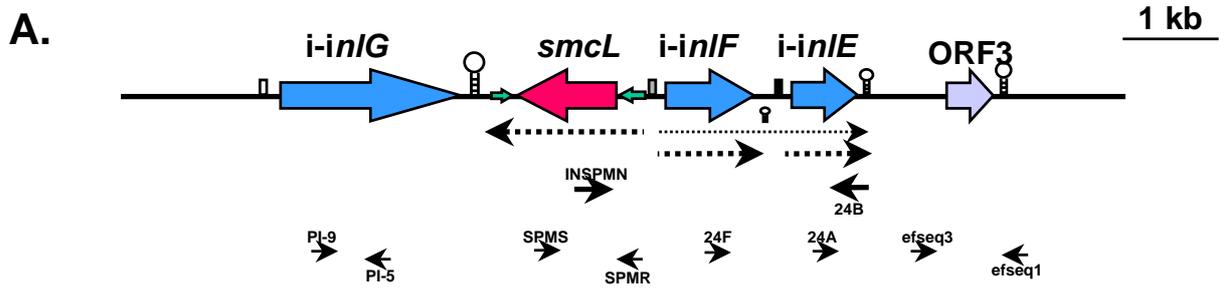
#### 3.3.2.1. Identificación del cluster *smcL* / *i-inIF* / *i-inIE*.

Como hemos visto en los dos capítulos anteriores, la producción de i-InIE y la actividad esfingomielinasa C están ausentes en los mutantes pertenecientes a la clase IV. Recordemos, además, que a través de proyectos independientes realizados en paralelo, ya habíamos identificado y secuenciado los determinantes genéticos que codifican la SMasa, *smcL*, (195), y la internalina secretada i-InIE, *i-inIE*, (144). Durante el proceso de caracterización de los variantes de clase IV, basándonos en la ausencia de la producción de i-InIE y *SmcL*, asociada a la pérdida conjunta de sus correspondientes determinantes genéticos por delección (véase apartado 3.2.2.3), decidimos analizar la posibilidad de que dichos genes pudieran encontrarse físicamente próximos en la misma región cromosómica en *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup> (WT). Para ello, diseñamos dos pares de oligonucleótidos en los extremos de ambos genes y realizamos reacciones de PCR empleando distintas combinaciones (Fig. 3.3.1). Obtuvimos una banda amplificada de 2,6 kb tan sólo con los oligonucleótidos P24B e INSPMN (Fig. 3.3.1 y Tabla 4.4), lo que nos permitió situar en la misma región, aunque con sentidos de transcripción divergentes, a *i-inIE* y *smcL*. El estudio de la secuencia del fragmento obtenido nos reveló la existencia de *i-inIF*, que codifica un nuevo miembro perteneciente a la familia de las internalinas pequeñas y secretadas (véase apartado 3.3.2.5 para una descripción detallada de esta internalina y de i-InIE). Por otro lado, cuando abordamos el análisis de esta región cromosómica en los mutantes 44/2, GD-1 y GD-3, fuimos incapaces de obtener resultados positivos en las distintas amplificaciones. Para descartar que este resultado fuera debido a un defecto en la hibridación de los oligonucleótidos, empleamos nuevas combinaciones de cebadores diseñados tanto en las regiones intergénicas como a partir de los propios genes (Fig. 3.3.1). Sólo logramos un producto amplificado del tamaño esperado en WT mientras que

nunca se obtuvieron resultados positivos en los mutantes. Este sorprendente resultado era compatible con un proceso de deleción que englobaría, al menos, a todo el cluster formado por los loci *smcL* e *i-inlF,E*. La existencia de esta deleción –que se acompaña de un cambio significativo en el perfil de macrorrestricción (véase Fig. 3.2.8)– fue corroborada mediante análisis por *Southern blot* (Fig. 3.3.1).

### **3.3.2.2. Identificación y caracterización genética de la región delecionada en los mutantes de clase IV.**

Con el fin de conocer la naturaleza y organización genética de los loci incluidos en el fragmento delecionado, así como para determinar el tamaño exacto de la región, decidimos realizar *genome walking* mediante sucesivas PCRs inversas a partir de los extremos de los loci *smcL* e *i-inlE* (Fig. 3.3.2). Los fragmentos de DNA obtenidos por PCRs inversas fueron sistemáticamente secuenciados y utilizados como moDLeS para diseñar nuevos oligonucleótidos y continuar avanzando en la caracterización de la región. Además, se emplearon los mismos oligonucleótidos para analizar por PCR si los sucesivos segmentos de DNA obtenidos continuaban formando parte de la región delecionada en las cepas mutantes. Finalmente, obtuvimos un resultado de amplificación positivo con los oligonucleótidos PI-17/PI-22, diseñados a 6 kb del extremo 3' de *smcL* (Fig. 3.3.2 y Tabla 4.4), tanto en las cepas mutantes como en WT.



**Figura 3.3.1.** Análisis del locus *smcL/i-inlFi-inIE* en *L. ivanovii* WT y los mutantes GD-3 y 44-2.

**A.** Organización física y transcripcional del locus *smcL/i-inlFi-inIE*. Los genes se representan a escala por flechas. Las estructuras secundarias compatibles con constituir señales de termino de la transcripción están representadas por bucles cuyo tamaño está relacionado con la longitud de los brazos de la estructura palindrómica. Las cajas PrfA están señaladas por cuadros que presentan una escala graduada en gamas de intensidades de grises en función del número de desviaciones con respecto a la secuencia consenso "perfecta", representando a ésta con el negro y aclarándose al aumentar en número de desviaciones. En la parte inferior, las flechas punteadas en trazo grueso representan los transcritos monocistrónicos. La flecha punteada en trazo fino se corresponde con una débil transcripción bicistrónica de *i-inlFi-inIE* (144). Por último, las flechas pequeñas representan las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para las PCRs que se muestran en el panel B.

**B.** Análisis por PCRs del locus de *smcL/i-inIE*. En primer lugar se muestra el patrón de marcador de talla molecular. A continuación se presentan los resultados de las amplificaciones de los genes que se señalan en la parte inferior de la foto en WT y GD-3. El amplicón de 2,6 kb obtenido como resultado de la amplificación con los oligos INSPMN/24B nos ha permitido localizar en el mismo locus a *smcL* e *i-inIE*. Se puede comprobar como únicamente en el caso de WT pudimos amplificar los distintos genes, y no obtuvimos amplicones en GD-3. A la derecha se presenta como control positivo la amplificación del locus *lyrA* obtenida con los oligonucleótidos GD-5/34 en ambas cepas.

**C.** Análisis por *Southern blot* de la delección de este locus en GD-3 y 44/2. Los DNAs cromosómicos de las tres cepas fueron digeridos con *HindIII* e hibridados utilizando como sondas un fragmento específico de *smcL* amplificado con los oligos SPM-R/S (véase tabla 4.4) (sonda B) y un fragmento específico del gen *hipA* del locus *lyrA* utilizando los oligonucleótidos GD-38/44 (sonda A)(véase capítulo 3.2 y Tabla 4.4). A la izquierda se muestra el bandeado del marcador de talla molecular X (Boheringer Mannheim). La ausencia de hibridación con la sonda B en GD-3 y 44/2, pero sí utilizando la sonda A corrobora las delecciones mostradas por PCRs en el panel B.

Para identificar exactamente el punto en el que se había producido el fenómeno de deleción, procedimos a realizar una PCR inversa utilizando como molde DNA cromosómico del mutante GD-3 digerido con *HincII* y empleando los oligonucleótidos PI-16/17, situados en la zona que flanquea por la izquierda a la región delecionada (Fig. 3.3.2). El análisis comparado de la secuencia del producto obtenido (3,115 kb) con la secuencia de esa misma región en WT nos ha permitido determinar el punto exacto donde comienza la diferencia entre ambas cepas. Este punto de divergencia está situado a 815 pb del extremo 5' del producto amplificado a partir del mutante GD-3 y define el lugar donde se ha producido el fenómeno de deleción. Los siguientes 2211 pb del amplicón constituyen la región de cromosoma que flanquea por la derecha al segmento delecionado. Para asegurarnos de que esta secuencia se encontraba presente tanto en WT como en las cepas mutantes, se diseñaron oligonucleótidos (ED-3 y ED-4; véase Tabla 4.4 y fig. 3.3.2) específicos de esta región. Se obtuvo un producto de PCR específico en todas las cepas analizadas, WT y mutantes, el cual fue secuenciado para su comprobación.

Para determinar el extremo derecho de la región delecionada en las cepas mutantes, diseñamos los oligonucleótidos ED-1 y ED-2 (Fig. 3.3.2 y Tabla 4.4) a partir de la secuencia del fragmento que flanquea por la derecha a dicha región en WT. Estos oligonucleótidos fueron empleados para realizar diversas PCRs inversas en la cepa WT. El mayor producto amplificado se obtuvo utilizando la enzima *RsaI* (450 bp). Siguiendo una estrategia similar a la descrita anteriormente para el extremo izquierdo, el análisis comparado de la secuencia de este fragmento nos permitió comprobar el punto exacto de divergencia entre las secuencias de WT y las tres cepas mutantes.

De esta forma logramos identificar un total de 14 kb de la zona izquierda de la región delecionada. Con el fin de calcular exactamente el tamaño total del segmento delecionado, nos propusimos amplificar por PCR el fragmento comprendido entre el final del extremo derecho de la región conocida y la zona que flanquea por la derecha a la región delecionada. Para ello diseñamos el oligonucleótido ED-5 y lo utilizamos junto con ED-4 (Fig. 3.3.2 y Tabla 4.4) en las condiciones apropiadas para amplificar fragmentos de elevado tamaño (véase Materiales y métodos). Obtuvimos un fragmento de aproximadamente 3,5 kb que actualmente se encuentra en fase de secuenciación.

Siguiendo esta estrategia, hemos logrado determinar que el fragmento delecionado en las cepas mutantes tiene una extensión de 17,5 kb. El análisis comparado de su secuencia con el genoma de *L. monocytogenes* EGDe nos ha permitido diferenciar dos porciones física y funcionalmente diferentes: (i) la primera comprende las 10 kb próximas al extremo izquierdo del segmento delecionado, para cuyos determinantes genéticos no se encontraron homólogos en *L. monocytogenes*; (ii) la segunda corresponde a las restantes 7,5 kb, para los cuales encontramos ortólogos en *L. monocytogenes* (véanse los datos en la Tabla 3.3.1), con la misma organización genética (Fig. 3.3.2). Esta estructura "compuesta" del fragmento delecionado se correlaciona con el hecho de que el porcentaje estimado de G+C varía bruscamente desde un 31% para la porción izquierda y un 36% para la derecha, sugiriendo que ambas partes poseen un origen genético diferente.

La primera de las dos regiones está formada por 7 ORFs que poseen posibles cajas RBS con secuencias consenso a distancias que oscilan entre -4 y -15 respecto de los codones

de inicio de la traducción (Tabla 3.3.2). Tres de estas ORFs corresponden a las previamente caracterizadas *smcL* (195), *i-inIF* e *i-inIE* (144). El análisis de las proteínas codificadas por los determinantes genéticos situados en la zona que se extiende a partir del extremo 3' de *smcL* reveló la existencia de tres nuevos genes codificando a miembros de la subfamilia de pequeñas internalinas secretadas: *i-inIG*, *i-inIH* e *i-inII*. En el apartado 3.3.2.5 se presenta un estudio detallado de estas internalinas, *i-InIG*, *i-InIH* e *i-InII*. En virtud de los hallazgos experimentales hasta ahora obtenidos, todos los miembros de la familia multigénica de las internalinas son considerados como potenciales determinantes de patogenicidad (véase introducción) y para tres de los genes de esta región, *smcL*, *i-inIE* e *i-inIF*, se ha demostrado que efectivamente juegan un papel en la virulencia de *L. ivanovii* (144,195). Todos los determinantes genéticos situados en esta región, exceptuando *smcL*, muestran un mismo sentido de transcripción. En el extremo derecho de la misma, inmediatamente a continuación de *i-inIE*, se encuentra una ORF, denominada *orf3*, cuyo producto no presenta ninguna homología significativa con las proteínas depositadas en las bases de datos. La ausencia de péptido señal así como la falta de dominios transmembrana predicen una localización citoplásmica para la misma.

El análisis de la secuencia disponible (4,5 de un total de 7,5 kb) en la segunda de las dos regiones que forman el fragmento deleciónado, situada en la zona derecha del mismo, reveló la existencia de 5 ORFs: *orf4*, *orf5*, *orf6*, *orf7* y *orf8*, que presentaron, con la excepción de *orf6* y *orf8*, un mismo sentido de transcripción, opuesto al que muestran los genes de la porción izquierda (exceptuando a *smcL*). El análisis de homología indica que, de estas 5 ORFs, dos codifican diversas enzimas metabólicas, y el resto, proteínas de función desconocida (véase Tabla 3.3.1).

En conclusión, la región de 17,5 kb deleciónada en los mutantes pertenecientes a la clase IV está compuesta por dos zonas claramente diferentes, un extremo izquierdo específico de *L. ivanovii* y asociado con la virulencia y una segunda porción sin obvia relación con la patogenicidad, que se encuentra presente también en *L. monocytogenes* EGDe. El hecho de que, como ya hemos comentado en el apartado 1.3.3, *L. monocytogenes* pertenezca a una rama filogenética disitinta a la de *L. ivanovii*, indicaría que muy probablemente esta porción derecha forma parte del núcleo genético común que comparte el genoma de todas las especies del género *Listeria*, tanto patógenas como apatógenas (véase Fig. 1.3).

Figura 3.3.2. AL FINAL DE LA BIBLIOGRAFÍA APAISADA

**Figura 3.3.2.** Organización física y definición de los extremos derecho (ED) e izquierdo (EI) de la región deleciónada. Análisis genómico comparado con *L. monocytogenes* EGDe.

**A.** Estructura física del fragmento deleciónado de 17,5 kb. Este segmento está encuadrado en un triángulo de líneas discontinuas y sus bordes delimitados por EI y ED. Los genes están representados por flechas cuya orientación indica el sentido de su transcripción. En negro se señalan los que se encuentran también en *L. monocytogenes* EGDe, en azul se indican los miembros pertenecientes a la familia de las internalinas (para más detalles véase la leyenda de la Fig. 3.3.5). Los segmentos situados encima de los genes se corresponden con fragmentos cuyo contenido en G+C, que se indica en la parte superior, es diferente. El color de los mismos coincide con el de los genes que integran las distintas regiones. Las flechas pequeñas señalan los oligonucleótidos y la posición de los mismos que han sido utilizados para la identificación por PCR de los extremos de la deleción. Los resultados de estas amplificaciones se indican en

la foto. Los genes amplificados se muestran en la parte inferior de la foto y se corresponden con los amplicones obtenidos en las cepas WT y GD-3. Nótese como *i-inII* es el último gen que se encuentra deletado en GD-3. Los segmentos localizados en la parte superior del esquema indican las PCRs inversas realizadas para obtener la secuencia de los extremos de la región deletada. Asimismo, se indican las parejas de oligonucleótidos utilizados y las enzimas de restricción empleadas: H<sub>2</sub>, *HincII*; R, *RsaI*.

**B.** Organización física de la región homóloga en *L. monocytogenes* EGDe. Las flechas en negro indican que presentan homólogos en *L. ivanovii*, el gris claro de 2302.1 señala que es exclusivo de EGDe, y las tres ORFs resaltadas en gris oscuro se encuentran en la región de 3,5 kb de la que se acaba de concluir su secuenciación pero no incluimos en este trabajo.

**C.** Representación esquemática de los extremos de la región deletada y su análisis por PCR en WT y GD-3. En la parte superior se muestran las fotos correspondientes a la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con las parejas de oligonucleótidos que se representan en el esquema inferior. Obviamente, únicamente en WT obtuvimos amplicones cuando utilizamos oligonucleótidos que hibridaban en la región (ED-5/4 y PI-26/12) y tan sólo en GD-3 logramos resultados positivos utilizando oligonucleótidos flanqueantes a la zona deletada (PI-26/ED-4). El tamaño de los productos obtenidos está indicado con una flecha.

Tabla 3.3.1. AL FINAL DE LA BIBLIOGRAFÍA

### 3.3.2.3. Caracterización de los extremos del fragmento deletado.

En el apartado anterior hemos descrito la identificación de los extremos del fragmento cromosómico de 17,5 kb que está deletado en los mutantes de clase IV. Hemos realizado un análisis detallado de las secuencias de los bordes que flanquean a esta región con el fin de tratar de obtener datos que nos permitan comprender el mecanismo genético implicado en la deleción. Los resultados de estos análisis se ilustran en la Fig. 3.3.2.

**Borde izquierdo.** El punto de divergencia en un alineamiento realizado con las secuencias de WT y aquellas obtenidas en el caso de las cepas mutantes define el extremo izquierdo de la región deletada. El punto de deleción se localiza en la zona intergénica delimitada por los genes *i-inIJ* e *i-inII* (apartado 3.3.2.5.1), a 142 pb corriente abajo del codón de stop del primero y a 160 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción del segundo. Para comprobar la secuencia de los bordes de la deleción, realizamos PCRs utilizando cebadores derivados de las secuencias flaqueantes al punto de inserción en cada uno de los extremos. Para el borde izquierdo utilizamos la pareja de oligonucleótidos PI-26 y PI-12 (Fig. 3.3.2). Obviamente, no obtuvimos ningún producto de PCR utilizando los oligonucleótidos externos a la región deletada PI-26 y ED-4 en WT, porque el tamaño a amplificar (17,5 kb) superaba las posibilidades de la PCR en las condiciones ensayadas. Por el contrario, logramos un producto amplificado de 453 pb en los tres mutantes, 44/2, GD-1 y GD-3 por la deleción del fragmento. La secuenciación de este amplicón confirmó que la deleción se produjo en el mismo punto en los tres mutantes. Asimismo, en ninguno de los mutantes obtuvimos productos amplificados cuando utilizamos la pareja PI-26/12 debido a la ausencia de dianas para PI-12 (extremo

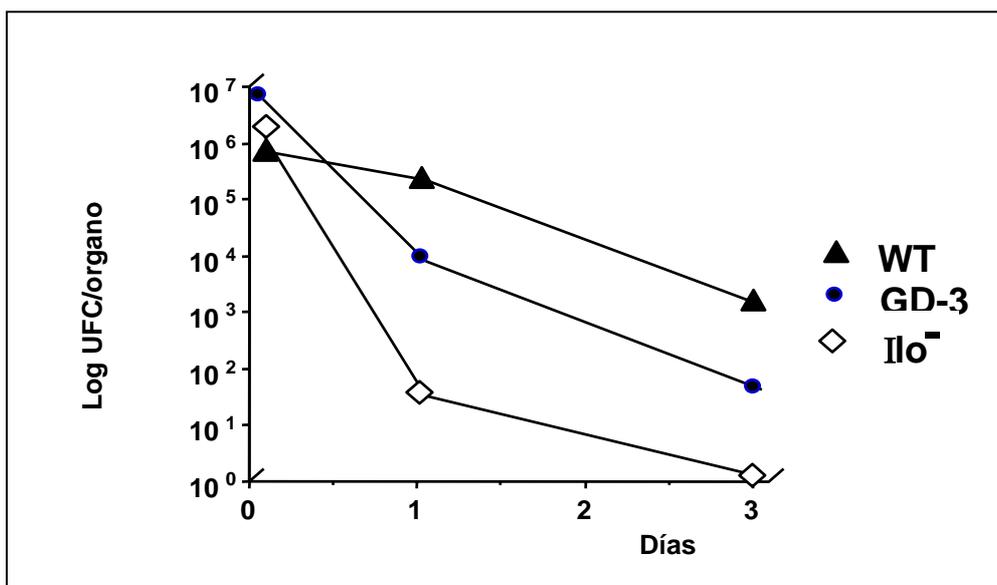
izquierdo del fragmento deletado). En el caso de WT, amplificamos el producto correspondiente al segmento de 753 pb comprendido entre PI-26 y PI-12.

**Borde derecho.** Siguiendo una estrategia similar a la descrita para el borde izquierdo, caracterizamos el extremo derecho y su zona flanqueante. Para amplificar la región de los bordes de la zona derecha utilizamos los cebadores ED-4 y ED-5 (Fig. 3.3.2 y Tabla 4.4). Como era de esperar, sólo obtuvimos amplificación positiva (fragmento de 3,5 kb) con la pareja ED-5/ED-4 en el caso de WT. Además, la secuenciación completa del fragmento *HincII* obtenido por PCR inversa (véase apartado 3.3.2.2) que flanquea por la derecha a la región deletada nos ha permitido identificar la secuencia de dos nuevas ORFs, *orf9* y *orf10*. *orf9* codifica una proteína de membrana que exhibe una gran similitud con bombas de eflujo implicadas en resistencia a antibióticos. Entre las proteínas con mayor grado de similitud figuran varias bombas de resistencia a quinolonas. El producto codificado por *orf10* es una proteína citoplásmica que presenta homologías de secuencia con el regulador central de la virulencia de *Listeria*, PrfA. Los genes homólogos a ambas ORFs en EGDe, son *2293.1 (orf9)* y *2292.1 (orf10)* (Fig. 3.3.2). La comparación de esta región en WT y los tres mutantes reveló que, a diferencia de lo que ocurre en el borde izquierdo, el fenómeno de delección en el extremo derecho no tiene lugar en una zona intergénica sino que se ha producido en una región codificante, originando la delección de los 18 últimos aa de Orf9.

Nuestros datos demuestran que los tres mutantes, 44/2, GD-1 y GD-3, son el resultado de un mismo evento específico de reorganización genética que se produce entre la zona intergénica *i-inII / i-inIJ* y *orf9*. El análisis detallado de la secuencia de dichas zonas, sin embargo, no nos ha permitido identificar estructuras que a priori pudiesen estar implicadas en un fenómeno de recombinación, tales como repeticiones directas o invertidas o secuencias de inserción.

#### **3.3.2.4. Ensayos de virulencia en el modelo murino y en el hospedador natural de *L. ivanovii*.**

Con el fin de evaluar el efecto en la virulencia del fragmento deletado, se estimó la  $DL_{50}$  de los mutantes GD-1 y GD-3 tras inocular ratones BALB/c por vía intravenosa. La  $DL_{50}$  de los mutantes,  $5,37 \times 10^7$ , fue superior en un ciclo logarítmico a la mostrada por la cepa salvaje,  $7,4 \times 10^6$ . Estos datos se corresponden con unos valores de aclaramiento en el hígado más rápidos en los mutantes de delección (Fig. 3.3.3).



**Figura 3.3.3.** Ensayos de virulencia en el modelo murino. Curva de aclaramiento en el hígado de ratones BALB/c de *L. ivanovii* WT, un mutante por transposición en la ivanolisina ILO 20/24 (283) y GD-3. Se observa un retraso en el mutante GD-3 con respecto a la cepa parental WT.

Aunque el ratón ha sido ampliamente utilizado como modelo animal para el estudio de la infección por *Listeria*, incluyendo sus aspectos inmunológicos, en el caso de *L. ivanovii* quizás resulte un sistema no del todo apropiado dada la aparente especificidad de hospedador de esta bacteria hacia los rumiantes. Decidimos por tanto analizar el comportamiento de uno de los mutantes, GD-3, en el hospedador natural de *L. ivanovii*. Para ello desarrollamos unos experimentos de infección experimental en corderos utilizando la vía endovenosa de inoculación. En uno de los ensayos se utilizaron corderos de la raza “Churra” (Tabla 3.3.2) y en el otro de la raza “Talaverana” (Tabla 3.3.3).

En el primer experimento se utilizaron tres dosis de inoculación distintas. Con la dosis mayor ( $1.7 \times 10^{12}$ ) se produjo la muerte inmediata de los animales inoculados tanto con la cepa WT como con la mutante. Con la dosis intermedia ( $3.5 \times 10^{11}$ ) el WT produjo la muerte de todos los animales en 48 h, mientras que GD-3 sólo lo hizo en uno de los tres animales inoculados. Con la dosis menor ( $1.5 \times 10^{11}$ ), ninguna de las dos cepas produjo mortalidad. Con el fin de determinar de una forma más sensible las posibles diferencias en cuanto a capacidad patogénica asociadas con la mutación, los animales supervivientes fueron sacrificados y se determinó la presencia o ausencia de bacterias en hígado. En los animales infectados con la cepa WT se logró recuperar en todos los casos bacterias viables. En cambio, en ninguno de los animales infectados con GD-3 fue posible recuperar la bacteria. Estos resultados indican claramente que la delección está asociada con una pérdida de patogenicidad para el hospedador natural. En los corderos de la raza “Churra”, ninguno de los animales inoculados tanto con la cepa WT como con la mutante desarrolló lesiones macroscópicas evidentes en los órganos.

**Tabla 3.3.2.** Ensayos de virulencia en el hospedador natural de *L. ivanovii*.

Dosis	Cepa	Muertes/ inoculados	Recuperación en hígado <sup>a</sup>
1,7x10 <sup>12</sup>	WT	3/3 (1h)	No
	GD-3	3/3 (1h)	No
3,5x10 <sup>11</sup>	WT	3/3 (48h)	Sí
	GD-3	1/3 (48h)	No
1,5x10 <sup>11</sup>	WT	0/3 (7d)	Sí
	GD-3	0/3 (7d)	No

Dosis de letalidad obtenidas tras administrar por vía intravenosa lotes de tres corderos de la raza "Churra". <sup>a</sup> La necropsia de los animales eutanasiados a los 7 días postinoculación no nos permitió observar lesiones significativas en ningún caso. Sin embargo, recuperamos *L. ivanovii* WT a partir de los hígados de los animales inoculados con esta cepa pero no en los inoculados con GD-3.

En el segundo experimento (Fig. 3.3.4) se administró una única dosis de 4x10<sup>12</sup> bacterias a todos los animales, tanto en el caso de la cepa WT como de GD-3. Con esta dosis tan elevada, sólo sucumbió uno de los animales inoculados con WT y ninguno de los que fueron infectados con GD-3. Estos datos sugieren que la raza ovina "Talaverana" podría tener una constitución genética que la haría más resistente a la infección por *Listeria*. El hecho de que en estas ovejas se observase, en respuesta a la infección por la cepa silvestre, la aparición de una evidente reacción granulomatosa (véase más abajo) sugiere que, al igual que ocurre en el caso de ciertas cepas murinas, dicha resistencia podría estar relacionada con la capacidad de esta raza de movilizar de forma más eficaz las defensas celulares (principalmente macrófagos) hacia los focos de infección. Todos los animales supervivientes fueron sacrificados, como en el experimento anterior, a los 7 días de inoculación. De nuevo, el aclaramiento en hígado fue total con GD-3, mientras que la cepa WT fue recuperada de dicho órgano en todos los casos. El análisis detallado de los aspectos macroscópicos durante la necropsia nos permitió inmediatamente apreciar que, a diferencia de lo observado con la cepa silvestre, ninguno de los animales infectados con GD-3 manifestó señales de reacción granulomatosa; tan sólo se apreció una ligera hepatomegalia. También nos permitió constatar una característica extremadamente interesante en el patrón lesional provocado por las dos cepas, consistente en la mayor presencia en los animales infectados con GD-3 de extensas zonas blanquecinas de infiltración y necrosis en el miocardio. Este patrón diferencial es compatible con un cambio en el tropismo orgánico asociado con la mutación. El análisis microscópico de las lesiones confirmó que la cepa WT desencadena una fuerte reacción inflamatoria de tipo piogranulomatosa mientras que la cepa mutante tiende a provocar un patrón inflamatorio caracterizado por infiltración difusa de los tejidos. El estudio de las secciones histológicas de hígado y corazón confirmó igualmente las diferencias observadas macroscópicamente (Fig. 3.3.4).

**Tabla 3.3.3.** Papel en la patogenicidad de la región deletada.

	WT	GD-3
Letalidad	1/3	0/3
Recuperación en hígado (7 días)	3/3	0/3
Lesiones		
Hepatitis	+++ (granulomas)	+ (difusa)
Miocarditis	+ (granulomas)	+++ (difusa, granulomas)
Neumonía	++	+
Hiperplasia linfoide	+	+

Las necropsias de todos de animales eutanasados a los 7 días postinoculación nos permitió recuperar la cepa WT en todos los casos pero no el mutante GD-3. Se resaltan los aspectos más relevantes de las lesiones observadas tras el análisis macroscópico y microscópico.

Los datos presentados demuestran claramente que la región cromosómica de 17,5 kb que se deleta de forma espontánea en los mutantes definidos como clase IV juega un importante papel en la virulencia y patogénesis de *L. ivanovii*.

### 3.3.2.5. Caracterización de una isla genómica de virulencia específica de *L. ivanovii*.

Tal y como hemos mostrado en los apartados 3.3.2.1 y 3.3.2.2, durante la identificación de la región deletada de 17,5 kb, hemos podido identificar en ella dos porciones claramente diferenciadas. El segmento situado en el extremo derecho está constituido por determinantes genéticos comunes, al menos, a dos especies distintas de *Listeria* (recientes datos del proyecto genoma *Listeria* indican que también están presentes en la especie apatógena *L. innocua*), presentando algunos de ellos homología con genes metabólicos. En cambio, la porción localizada en el extremo izquierdo está formada por determinantes genéticos específicos de *L. ivanovii* y pertenecientes, excepto *smcL*, a la familia InI de proteínas asociadas con la virulencia. El límite izquierdo del segmento deletado se encuentra entre dos genes de internalinas. Esto quiere decir que el extremo de dicho segmento no define, como quizás podría esperarse en el caso de que fuese un elemento movilizable de virulencia, el final de una región cromosómica específica de *L. ivanovii*.

Con el fin de identificar y caracterizar el conjunto de la región específica de *L. ivanovii* y su región flanqueante izquierda, extendimos la secuencia conocida mediante sucesivas PCRs inversas (Fig. 3.3.5). Para confirmar las secuencias obtenidas, se amplificaron por PCR (y se secuenciaron) fragmentos solapados de las nuevas regiones, encontrándose cinco nuevos genes de internalinas (véase siguiente apartado). Se identificó el final de este locus específico de internalinas de *L. ivanovii* al encontrar una ORF que exhibía un alto grado de identidad con otra presente en *L. monocytogenes* EGDe (2303.1). Las proteínas codificadas por ambas ORFs mostraron un alto grado de homología (45% identidad) con YsnB de *B. subtilis* (número de acceso en Swissprot P94559), por lo que las denominamos *ysnB* tanto en *L. ivanovii*, como en *L. monocytogenes*. En esta última especie, *ysnB* se encuentra prácticamente contiguo (únicamente separado por una ORF) a *ydel*, ortólogo del gen del mismo nombre de *B. subtilis* y de *orf4* de *L. ivanovii*. Recordemos que *orf4* está situado en el extremo derecho de la región deletada y es el primer gen situado a la derecha del locus *i-inIFE* que deja de ser específico de *L. ivanovii* (véase apartado 3.3.2.2 y Fig. 3.3.2).

En conclusión, hemos identificado, en la zona donde se produce la deleción, una región específica de *L. ivanovii* que está enmarcada por los genes *ysnB* e *ydel*, los cuales forman presumiblemente parte del núcleo genómico común de las bacterias Gram-positivas.

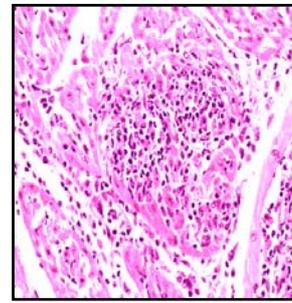
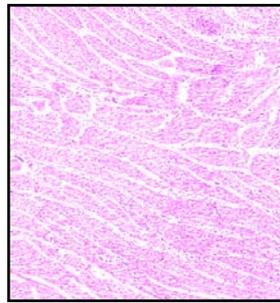
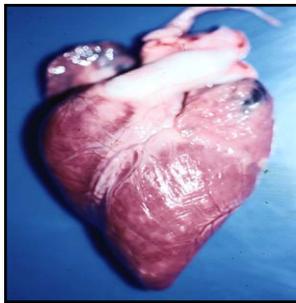
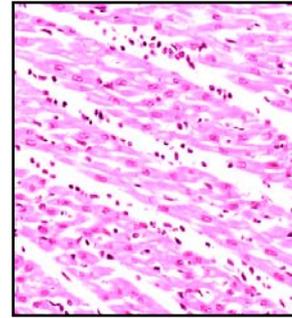
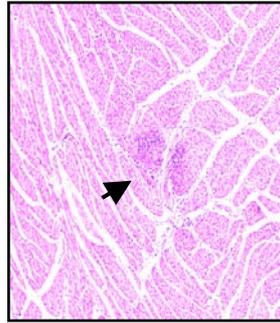
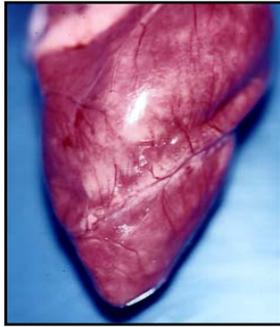


FIGURA 3.3.4. Panel 1

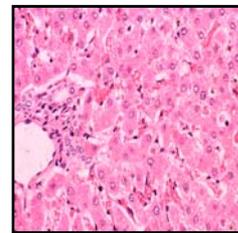
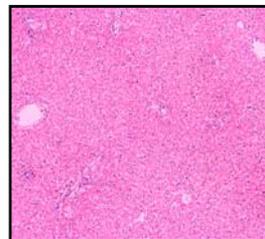
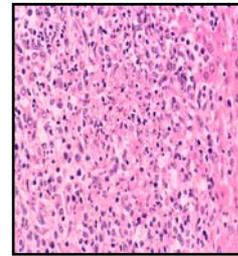
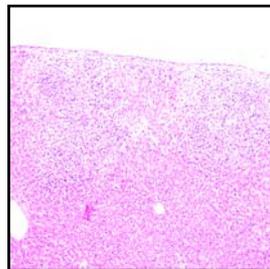
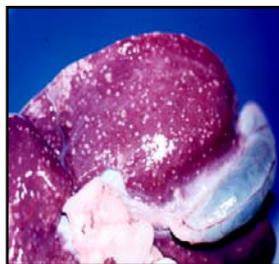


FIGURA 3.3.4. Panel 2

### 3.3.2.5.1 Estructura genética del segmento cromosómico específico de *L. ivanovii*.

La región específica de *L. ivanovii* delimitada por *ysnB* e *ydel* tiene una extensión de 22.047 bp que hemos registrado en el EMBL con los números de acceso: AJ251981, AJ251980, AJ004808, Y09477 e Y14181. El contenido en G+C de su secuencia es de un 32,27%, que se diferencia significativamente del promedio de la especie, estimado en un 38% (524). Esto sugiere que dicha región tiene un origen exógeno y que ha podido ser adquirida mediante un proceso de transferencia genética horizontal. El análisis de la secuencia de DNA presente en este segmento nos ha revelado la existencia de 12 regiones codificantes (ORFs A a L) cuya organización genética se muestra en la Fig. 3.3.5. Todas ellas presentan secuencias RBS centradas a una distancia entre 9 y 11 pb de sus codones de inicio de la traducción. Las principales características de las distintas ORFs se encuentran reflejadas en la Tabla 3.3.4.

La región comprende diez miembros de la familia multigénica de las internalinas, designados *i-inlE*, *i-inlF*, *i-inlG*, *i-inlH*, *i-inlI*, *i-inlJ*, *i-inlB*, *i-inlK*, *i-inlL* e *i-inlB2*; el gen *smcL* de la SMasa, previamente identificado y caracterizado (195); y una ORF, *orf3*, cuyo producto no presenta homologías con ninguna proteína depositada en las bases de datos. Con la excepción de *smcL*, todos los determinantes genéticos de esta región se transcriben en el mismo sentido, lo que sugiere que el gen de la SMasa se ha insertado en fases posteriores de la evolución interrumpiendo un locus de internalinas preexistente. De hecho, *smcL* tiene un porcentaje de G+C significativamente distinto al de la región de internalinas circundante (36% vs. 32%) y se encuentra enmarcado por secuencias de 14 nt que forman una repetición invertida perfecta y que podrían estar asociadas con un fenómeno de movilización genética. Hemos identificado potenciales terminadores de la transcripción en los extremos 3' de *i-inlK*, *i-inlB*, *smcL*-*i-inlG*, *i-inlE* y *orf3* (Fig. 3.3.5). Esto no quiere decir, sin embargo, que la transcripción tenga que ser policistrónica para aquellos loci no separados por terminadores en horquilla, ya que experimentalmente se ha demostrado transcripción monocistrónica para *i-inlF* e *i-inlE* (refs. 144,195 y Fig. 3.1.6) a pesar de que entre estos dos genes no existe una secuencia palindrómica evidente.

**Tabla 3.3.4.** Principales características de las internalinas de LIPI-2.

LIPI-2 <i>orf</i> / nombre del gen	Codón de iniciación	Codón de stop	Posible caja RBS (posición) <sup>a</sup>	Posible caja PrfA <sup>b</sup> (posición) <sup>a</sup>	nº aa totales/Tamaño de la proteína <sup>c</sup> (kDa)	Punto isoeléctrico <sup>d</sup>	Número de acceso en EMBL
<i>orfAi-i-inlB2</i>	TTG	TAA	GGGGAG (-10/-15)	TTAACtTTTGTTaT (-138)	897/96,70	9,81	AJ271621
<i>orfBi-i-inlL</i>	TTG	TGA	AGGAGG (-13/-18)	TTAACtTTTGTTaT (-146)	261/25,78	5,75	AJ251981
<i>orfCi-i-inlK</i>	TTG	TAA	GAGGAG (-10/-15)	aTAACtTTTGTTaT (-138)	312/31,62	8,91	AJ251980
<i>orfDi-i-inlB</i>	TTG	TAA	GAGGAG (-10/-15)	No tiene	1078/117,38	9,88	AJ004808
<i>orfEi-i-inlJ</i>	ATG	TAA	GAGAAA (-7/-12)	TTAACtTTTGTTaT (-150)	416/43,66	6,48	AJ004808

<b><i>orfFl-iInI</i></b>	GTG	TAA	AAGGAG (-10/-15)	TTAACAtTTGTTAt (-114)	230/22,46	8,93	AJ004808
<b><i>orfGl-iInH</i></b>	TTG	TAA	GAGGAG (-10/-15)	TTAACtTTGTTAt (-136)	272/26,81	6,92	AJ004808
<b><i>orfHl-iInG</i></b>	TTG	TAG	AAGGAG (-10/-15)	TTAACtTTGTTgt (-134)	615/65,78	8,95	AJ004808
<b><i>orfI-smcL</i></b>	ATG	TAA	GGAGGA (-4/-9))	No tiene	299/34,3	6,75	Y09477
<b><i>orfJl-iInF</i></b>	TTG	TAA	GGGGAG (-10/-15)	TTAACtTTTGTtAt (-140)	320/32,12	8,92	Y14181/ Y09988
<b><i>orfKl-iInE</i></b>	GTG	TAG	AAGGAG (-10/-15)	TTAACATTGTTA A (-143)	231/22,09	9,16	Y09988
<b><i>orfLorf3</i></b>	ATG	TAA	AGAGGG (-6/-11)	no tiene	129/13,68	9,17	Y09988

<sup>a</sup> La posición se corresponde con la distancia en nucleótidos desde el posible codón de inicio de la traducción. En las cajas PrfA se contabiliza hasta el extremo 3' de su secuencia PrfA.

<sup>b</sup> Las letras minúsculas indican las desviaciones de la secuencia de la caja PrfA con respecto a la caja "perfecta".

<sup>c</sup> El tamaño de las proteínas codificadas se contabiliza después de cortar por el péptido señal.

<sup>d</sup> Se han calculado el tamaño, en kDa, y el pI de las proteínas utilizando la aplicación ProtParam, disponible en <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>.

Como hemos comentado en el apartado 1.2.2.1, la familia de las internalinas comprende dos grupos, uno de pequeñas internalinas secretadas cuyo prototipo es InIC de *L. monocytogenes*, y las internalinas grandes asociadas a la superficie bacteriana, cuyo representante es InIA de *L. monocytogenes*. El análisis de las secuencias de los diez nuevos miembros de la familia de internalinas descritos en esta región nos ha permitido encuadrar a ocho (*i-inIE*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L*) en el primer grupo y las dos

Fig.3.3.5. APAISADA AL FINAL DE LA BIBLIOGRAFÍA

restantes (*i-inlB* e *i-inlB2*) en el segundo. Estas dos últimas son similares a *InlB* de *L. monocytogenes* y constituyen los primeros representantes de la clase de internalinas grandes ancladas en la superficie bacteriana descritos en *L. ivanovii*.

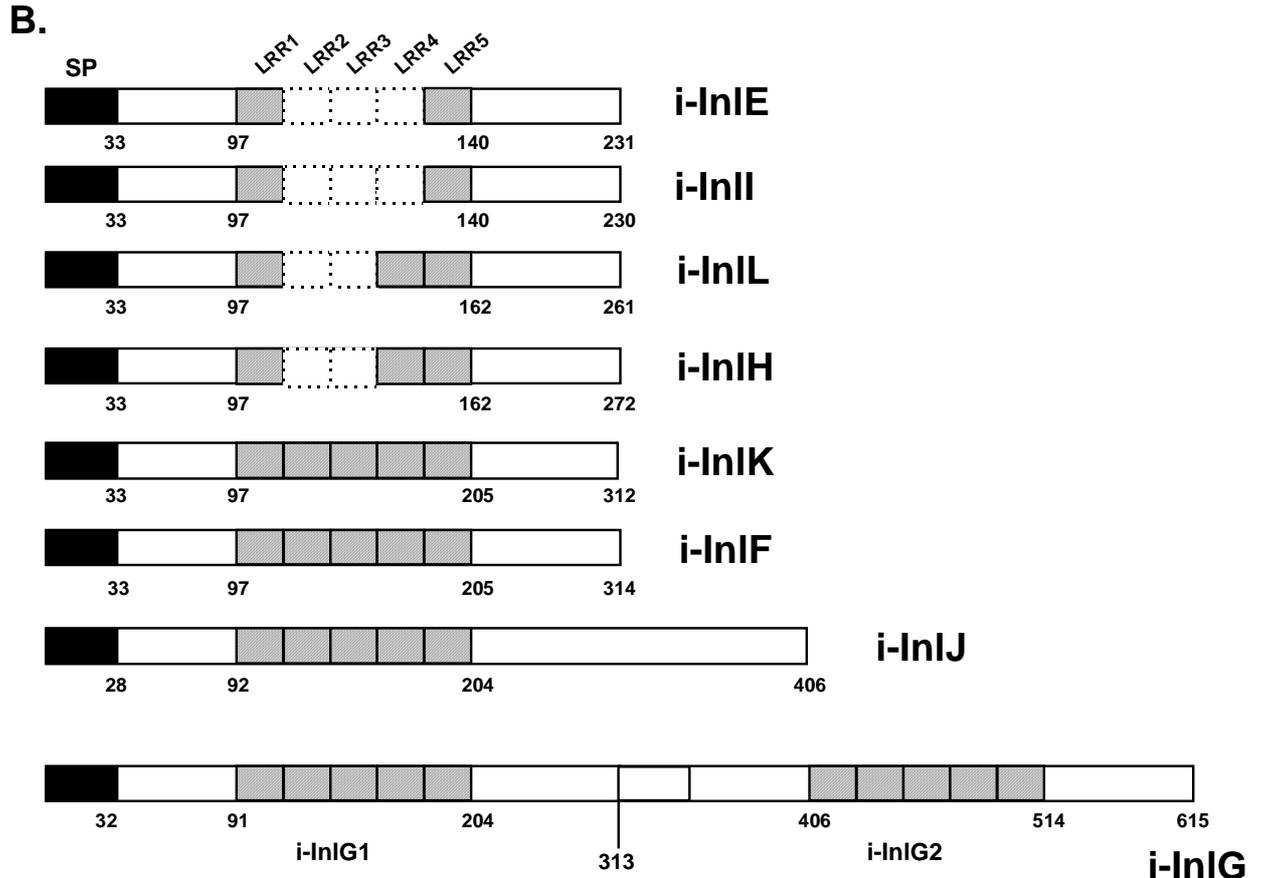
**Internalinas pequeñas y secretadas (S-Inl).** Para su designación hemos seguido un sistema de nomenclatura por orden alfabético ascendente en sentido 3'→5' desde el primer locus de este tipo descrito en la región, *i-inlE* (144). En la Fig. 3.3.6 se muestran las secuencias aminoacídicas de sus productos y sus correspondientes características estructurales principales.

La estructura prototipo de las proteínas S-Inl se caracteriza por presentar un péptido señal convencional en su extremo N-terminal y una región de repeticiones ricas en leucina (LRRs) que está flanqueada por dos regiones altamente conservadas entre los distintos miembros de la subfamilia (Fig. 3.3.6). Existe, sin embargo, una heterogeneidad en el número de LRRs entre las diferentes s-Inl de LIPI-2 (Fig. 3.3.6), lo que nos ha permitido distinguir cuatro grupos: (i) *i-InlE* e *i-InlI* que poseen tan sólo dos LRRs y exhiben un mismo punto isoeléctrico (pI) básico (véase Tabla 3.3.4), (ii) *i-InlI*, *i-InlH* que tienen tres LRRs y un pI ácido; (iii) *i-InlF*, *i-InlK*, *i-InlJ* poseen cinco LRRs y un pI básico salvo *i-InlJ* que es ligeramente ácido (6,5); e (iv) *i-InlG*, con pI básico. Esta última, presenta diez LRRs, lo cual deriva de una estructura particular que se desvía del prototipo y que hace que esta internalina tenga un tamaño mucho mayor que el resto (66 kDa en lugar de los 25-32 kDa habituales; Tabla 3.3.4). El análisis de la secuencia de *i-InlG* indica que es el resultado de un fenómeno de recombinación cuyo resultado ha sido la fusión en tándem y en fase entre los extremos 3' y 5' de dos genes de S-Inl originalmente independientes. De hecho, *i-InlG* se puede dividir en dos S-Inls prototípicas, una primera N-terminal con 313 aa y cinco LRRs, a la que hemos denominado *i-InlG1*, y una segunda C-terminal con 302 aa e igualmente cinco LRRs, a la que hemos designado *i-InlG2*. En esta última, la porción correspondiente al péptido señal ha desaparecido y su extremo N-terminal se encuentra acoplado al extremo C-terminal de *i-InlG1* (Fig. 3.3.6). El alineamiento de las secuencias de las S-Inls nos indica que todas presentan entre ellas un alto grado de homología (43-73% de identidad) (Tabla 3.3.5), lo que sugiere que se han originado por fenómenos de duplicación génica. El análisis comparativo de la secuencia de *i-InlG1* e *i-InlG2* con el resto de S-Inls muestra el mayor grado de identidad con las internalinas *i-InlC* e *i-InDL*, respectivamente.

Tabla 3.3.5 A. APAISADA AL FINAL DE LA BIBLIOGRAFÍA

A.

		SP			
i - InII	1	~	MRKNNWLVONVVVA	TLVVLVVG	LCINTGSGT
i - InIE	1	~	MRKSNWLVKSVVVA	MLVVLVVG	LCINTGSGT
i - InIH	1	~	MKRDWLVKSVVVA	ILVLMVVG	LCINTGSGT
i - InIL	1	~	MKRNCLK	ICTVLLI	LVIAI
i - InIG1	1	~	MRKNNWLVK	VVVTMLV	VVGLCV
i - InIK	1	~	MRKSNWLVK	NLLIA	VSIVIT
i - InIF	1	~	MRKNDWLVK	NVLIT	ILVTVF
i - InIG2	1	~	RRKESL	RKKNST	...DVGSE
i - InIJ	1	~	MVK	...KSIRA	LALLT
LRR1					
i - InII	60	GK	KS	VTD	QV
i - InIE	60	GK	QS	VTD	DV
i - InIH	60	GK	QS	VTE	DV
i - InIL	60	GK	QS	VTE	DV
i - InIG1	59	GK	KS	VTD	DV
i - InIK	60	KA	AS	IK	DL
i - InIF	60	KA	SN	VTD	DV
i - InIG2	55	CK	KS	VSD	LV
i - InIJ	55	GK	KS	VTD	DV
LRR2					
i - InII	119	..	..	..	..
i - InIE	119	..	..	..	..
i - InIH	119	..	..	..	..
i - InIL	119	..	..	..	..
i - InIG1	118	KL	SL	LC	IN
i - InIK	119	NL	NL	LC	AN
i - InIF	119	NL	AI	LC	LD
i - InIG2	115	NL	ST	LY	LN
i - InIJ	114	KL	LV	LN	LD
LRR3					
i - InII	119	..	..	..	..
i - InIE	119	..	..	..	..
i - InIH	119	..	..	..	..
i - InIL	119	..	..	..	..
i - InIG1	118	KL	SL	LC	IN
i - InIK	119	NL	NL	LC	AN
i - InIF	119	NL	AI	LC	LD
i - InIG2	115	NL	ST	LY	LN
i - InIJ	114	KL	LV	LN	LD
LRR5					
i - InII	119	..	..	..	..
i - InIE	119	..	..	..	..
i - InIH	132	DI	NS	LAN	LT
i - InIL	132	DI	IV	LV	NI
i - InIG1	174	NI	EG	LS	HL
i - InIK	175	NI	DA	LA	HL
i - InIF	175	NI	DA	LA	HL
i - InIG2	171	NI	NG	LA	HL
i - InIJ	174	SI	IQ	LA	SL
LRR6					
i - InII	170	QK	ID	GS	LI
i - InIE	170	KK	PD	GS	LV
i - InIH	192	KD	MS	GK	SV
i - InIL	192	KD	MI	GK	PI
i - InIG1	234	KA	PN	KK	LI
i - InIK	235	KG	TE	GAL	IT
i - InIF	235	KG	PD	KV	LI
i - InIG2	231	KG	PN	SA	LV
i - InIJ	234	KT	LE	GK	LI
LRR7					
i - InII	228	PL	Y	~	~
i - InIE	228	PL	TR	~	~
i - InIH	250	PV	EL	EAP	AAE
i - InIL	252	PI	K	PQT	PAS
i - InIG1	292	PL	SK	IS	DS
i - InIK	293	PL	YS	KT	SS
i - InIF	286	PL	MV	LT	SS
i - InIG2	289	PL	YL	KTP	VNE
i - InIJ	292	PL	ER	KK	LF
LRR8					
i - InII	231	~	~	~	~
i - InIE	232	~	~	~	~
i - InIH	273	~	~	~	~
i - InIL	262	~	~	~	~
i - InIG1	314	~	~	~	~
i - InIK	313	~	~	~	~
i - InIF	315	~	~	~	~
i - InIG2	303	~	~	~	~
i - InIJ	352	SI	EG	LQ	YL
LRR9					
i - InII	231	~	~	~	~
i - InIE	232	~	~	~	~
i - InIH	273	~	~	~	~
i - InIL	262	~	~	~	~
i - InIG1	314	~	~	~	~
i - InIK	313	~	~	~	~
i - InIF	315	~	~	~	~
i - InIG2	303	~	~	~	~
i - InIJ	412	SI	RD	N	



**Figura 3.3.6.** Alineamiento múltiple y principales características estructurales de las internalinas pequeñas y secretadas de LIPI-2.

**(A)** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las internalinas s-InI presentes en LIPI-2. i-InIG ha sido artificialmente dividida en dos: i-InIG1 que comprende los 313 primeros aa de su extremo N-terminal e i-InIG2 integrada por los siguientes 302 aa. Los alineamientos se han realizado mediante el programa PILEUP (GCG) y BOXSHADE versión 3.21. Los aa idénticos se representan con fondo negro mientras que aquellos que son similares están sombreados. Los huecos introducidos para optimizar los alineamientos se muestran con puntos. Las vírgulas indican el fin de la secuencia. Las posiciones de los residuos y los nombres de las distintas internalinas se indican en el margen izquierdo. En el extremo N-terminal se indica con una línea horizontal el péptido señal (SP) y mediante un triángulo invertido su punto exacto de corte identificado en todas las internalinas mediante el programa SignalP V1.1 (402). Cabe resaltar como i-InIG2 no presenta péptido señal pues forma la mitad C-terminal de i-InIG. Las unidades de repeticiones de leucinas numeradas del 1 al 5 (LRR1-5) se destacan mediante segmentos. Nótese la divergencia que presentan las distintas internalinas en el número de LRRs. Así, mientras i-InII,E sólo poseen LRR1 y LRR5, i-InIH,L presentan LRR1, LRR4 y LRR5 mientras que el resto mantiene las 5 LRRs.

**(B)** Representación esquemática de la estructura de las s-InI de LIPI-2 basándonos en los resultados obtenidos en el alineamiento que se muestra en el panel A. Las proteínas se representan con rectángulos. El péptido señal (SP) (en negro) y las unidades de LRRs (con rallas oblicuas) se indican con rectángulos. Las cuadros con líneas discontinuas indican los LRRs ausentes para optimizar los alineamientos. Los números debajo de cada proteína indican la posición de los aa in la secuencia primaria.

Resulta interesante el hecho de que i-InIC e i-InDL están codificadas por dos genes contiguos, el locus i-inICD, un islote de internalinas situado en otro punto del cromosoma. Esto sugiere que i-inIG1/2 procede de la duplicación y posterior reubicación de i-inICD, o viceversa.

**Internalinas grandes ancladas a la superficie bacteriana (L-InIs).** Las secuencias primarias de las proteínas codificadas por orfA y orfD poseen las características estructurales básicas de las L-InI (Fig. 3.3.7). Las internalinas de este grupo, representadas por InIA de *L. monocytogenes*, se caracterizan por presentar, además de un péptido señal y la región LRR característica (región de repeticiones A), una segunda región de repeticiones (B) separadas por una secuencia inter-repeticiones muy conservada y un dominio C-terminal de anclaje a la pared. Este dominio puede ser de dos tipos: (i) motivo LPXTG (en el que "X" representa cualquier aa), a través del cual se establece un enlace covalente con el péptidoglicano bacteriano (155,398) y que poseen InIA y el resto de las L-InIs, excepto InIB; y (ii), un motivo Csa (*cell surface anchor*), organizado en tres repeticiones en tándem de 80 aa que comienzan con glicina (G) y triptófano (W), denominadas módulos GW, y que establece una interacción iónica con polímeros secundarios de la pared bacteriana tales como los ácidos teicoicos (TA) o lipoteicoicos (LTA) (50,266,493). Este tipo de anclaje es característico de InIB (266). Los productos de *orfA* y *orfD* presentan un dominio de anclaje tipo Csa, por lo que hemos denominado a estas nuevas internalinas de *L. ivanovii* i-InIB2 e i-InIB, respectivamente (Fig. 3.3.5). Además, a diferencia del resto de L-InIs, tanto InIB como i-InIB e i-InIB2 exhiben un pl básico. Como hemos señalado anteriormente, estas proteínas constituyen los dos primeros representantes de internalinas de superficie identificados en *L. ivanovii*.

i-InIB e i-InIB2 se diferencian en el número de LRRs que presentan en la región A (18 en i-InIB2 y 13 en i-InIB) y en el número de módulos de repeticiones de GW del dominio Csa. i-InIB presenta en su extremo C-terminal un dominio que exhibe una sorprendente homología estructural (53,8% de identidad en 645 aa solapados) con el dominio de anclaje a la pared descrito en la amidasa Ami de *L. monocytogenes* (Fig. 3.3.8). Así, podemos identificar en el extremo C-terminal de i-InIB cuatro repeticiones en tándem de 157-160 aa, cada una de las cuales se puede dividir en dos módulos (1 y 2) que comienzan con el dipéptido GW. El módulo 1 consiste en 80-83 aa mientras que cada módulo 2 contiene 77 aa. Tanto el módulo 1 de la primera repetición como el

FIGURA 3.3.7 A y B al final de la bibliografía

módulo 2 de la última repetición están ligeramente incompletos. Los cuatro módulos 1 presentan una identidad a nivel de aa del 74,3% como media, y los módulos 2 exhiben un 84% de identidad. Asimismo, los módulos 1 y 2 son muy similares (30% de identidad en 77 aa solapados). Esto sugeriría que un primer segmento de repetición de gran tamaño se habría originado por la duplicación de un módulo, y este gran fragmento posteriormente habría sufrido tres nuevas duplicaciones.

i-InIB2 se diferencia de i-InIB por presentar una estructura C-terminal más similar a la de InIB de *L. monocytogenes*, con tres repeticiones en tándem, dos de las cuales son incompletas, de 145 y 12 aa frente a los 155 de la que se encuentra en primer lugar). La organización en dos módulos de cada repetición reproduce la que presentan i-InIB, Ami e InIB. El módulo 1 de la primera repetición está incompleto y podemos observar los primeros 12 aa de un nuevo módulo 1 de una tercera repetición (Fig. 3.3.8).

Ami se encuentra exclusivamente en la superficie bacteriana, y presenta 8 módulos GW (266). Csa de i-InIB reproduce exactamente esta estructura de 8 módulos. Además, ambos dominios comparten una gran homología (53,8% de identidad en 645 aa solapados) lo que sugiere que la afinidad por la pared de esta internalina podría ser análoga a la de Ami. Teniendo en cuenta que se ha demostrado experimentalmente que un mayor número de módulos GW confiere una mejor eficacia en la adhesión con la superficie bacteriana (50,266), es muy

**Tabla 3.3.5.B.** Porcentaje de identidad<sup>a</sup> entre las internalinas grandes asociadas a la superficie de LIPI-2, InIB e InIA de *L. monocytogenes*.

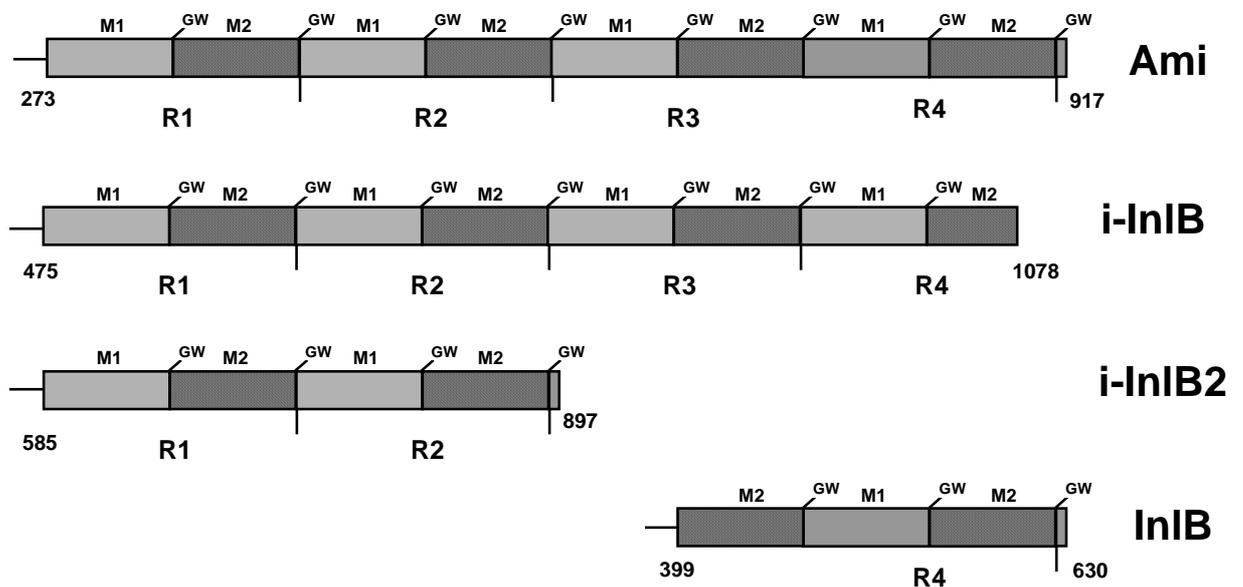
<b>Internalina (tamaño en aa)</b>	<b>i-InIB2 (aa solapados)</b>	<b>i-InIB</b>	<b>InIB</b>	<b>InIA</b>
<b>i-InIB2 (897)</b>		60,6 (897)	37,0 (630)	39,4 (800)
<b>i-InIB (1078)</b>			35,8 (630)	35,9 (800)
<b>InIB (630)</b>				36,4 (630)
<b>InIA (800)</b>				

<sup>a</sup> Los porcentajes de identidad se han calculado siguiendo una metodología idéntica a la descrita en la leyenda de la Tabla 3.3.5.A

Nótese como el porcentaje de identidad entre las dos internalinas de superficie de LIPI-2 contrasta marcadamente con el que muestran el resto de las i-Inl entre sí, lo que sugiere un posible origen por duplicación, al igual que las s-Inls de LIPI-2.



## B.



**Figura 3.3.8.** Análisis estructural del dominios Csa de las internalinas de superficie de LIPI-2, InIB y la proteína Ami.

**(A)** Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de los dominios Csa (*Cell surface anchor*) de i-InIB, i-InIB2, InIB y Ami de *L. monocytogenes* (número de acceso U82488). Hemos seguido el mismo procedimiento descrito en la leyenda de la figura 3.3.6 para alinear las tres secuencias polipeptídicas. En el margen izquierdo se indica el nombre de las proteínas de las que proceden los dominios Csa. Asimismo, se indican las posiciones que se corresponden con el inicio del dominio Csa en las distintas proteínas. Así, en i-InIB se corresponde con la posición 475, 585 en i-InIB2, 399 en InIB, y 273 en Ami. Las repeticiones (R) de 161 aa que presenta el dominio Csa se indican mediante segmentos denominados R1-R4. Además, se señala cada uno de los dos módulos (1 y 2) en que se dividen estas repeticiones. Se puede comprobar como Ami e i-InIB muestran una estructura similar de 4 repeticiones con 2 módulos cada una de ellas. Por el contrario, i-InIB2 mantiene tan sólo R1 y R2 e InIB el módulo 2 de R3, R4 y el inicio de una nueva módulo 1.

**(B)** Representación esquemática de la estructura de los dominios Csa de Ami, InIB, i-InIB2 e i-InIB. La nomenclatura empleada es la misma descrita en el panel A. Además, se indica el dipéptido de Glicina (G), triptófano (W) con que se inician los módulos de repeticiones. M1 y M2 representan los módulos uno y dos de cada unidad de repeticiones (R).

probable que i-InIB, al igual que Ami (50) permanezca mayoritariamente anclada a las células de *L. ivanovii*, mientras i-InIB2 se presente, al igual que InIB de *L. monocytogenes*, tanto en forma asociada con la superficie como en forma soluble en el sobrenadante de cultivo. Ambas formas median la activación de PI-3K (255). Sin embargo, es interesante constatar que únicamente la forma soluble de InIB es capaz de inducir la reorganización del citoesqueleto de actina en las células que va a invadir (52,255). Por lo tanto, el débil anclaje de InIB, y posiblemente i-inIB2, podría modular los fenómenos de transducción de señales específicos mediados por la forma soluble de InIB (266).

**orf3.** Como hemos señalado anteriormente, este gen, para cuyo producto no hemos encontrado proteínas significativamente homólogas en las bases de datos, es el último por el extremo derecho que es específico de *L. ivanovii*. A partir de él, todas las ORFs (empezando por *orf4/ydel*) están presentes en *L. monocytogenes* y *L. innocua*.

**Señales de regulación por PrfA presentes en la región.** El análisis de las secuencias intergénicas de la región de *L. ivanovii* caracterizada en este estudio nos ha permitido identificar secuencias palindrómicas compatibles con cajas PrfA delante de todos los loci *S-inl* (véase Tabla 3.3.4). Experimentalmente hemos demostrado para dos ellas, *i-inIE* e *i-inIF*, que su expresión está efectivamente controlada por PrfA (144). De las dos L-InIs identificadas, únicamente *i-inIB2* está precedido por una caja PrfA (véase Tabla 3.3.4). *orf3* no posee caja PrfA.

### 3.3.2.5.2 Análisis de los extremos de la región específica de *L. ivanovii*.

Para identificar con precisión los puntos de inserción de la región específica de *L. ivanovii*, hemos alineado sistemáticamente las secuencias de DNA obtenidas tras sucesivas PCRs inversas realizadas en las regiones flanqueantes con los datos disponibles del genoma de *L. monocytogenes* EGDe. En ambas especies, las secuencias cromosómicas exhiben un 85,37% de identidad en 636 nts solapados del segmento cromosómico flanqueante por la izquierda y un 75,18% de identidad en 2215 nts solapados de la región flanqueante derecha

PI-82 →

*ysnB\_L.iv.* AAAGTTCGTTTCATGGACCGAGATGACAACGAACTAACTGAACTGACACA 345  
 ||||| |||||||||||||||||||| || || ||

*ysnB\_L.mo.* CAAGTTCGATTCATGGACCGAGATGACAACGAACTAACAGACCTAACCCA 496  
 . . . . . end . . . . .

*ysnB\_L.iv.* AGTTTTCCCGTTAATCAAACATAACTAGGCCAAAAGTCGCCTGAAAAAGA 395  
 | |||| ||| || ||||||| ||||| || |||||||

*ysnB\_L.mo.* AACCTTCCCATTAACGAAGCGTAACTAGGTCAAAGACACCCGAAAAAGA 546  
 . . . . .

*L.iv.* AAAAACTAATAACTTAAAGAAAACCATTGACAAACAAGCAATTTAAACA 445  
 ||||| |||||||||||||||||||| |||||||

*L.mo.* AAAAAATGCAATAACTTAAAGAAAACCATTGACAAACAAGCGATTTAAACA 596  
 . . . . .

*tRNA<sup>arg</sup>-L.iv.* TAAAATGGTATTTGGCTGTTGAAAAACAGTGCCATTTGTCCTGATAGCT 495  
 |||||||||||||||| |||||||||

*tRNA<sup>arg</sup>-L.mo.* TAAAATGGTATTTGGCTGTTGAAAAGACAGTGCCATTTGTCCTGATAGCT 645  
 . . . . .

*tRNA<sup>arg</sup>-L.iv.* CAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTCTAAGCCGTCGGTCGGGGGTTCGAATC 545  
 ||||||||||||||||||||||||||||

*tRNA<sup>arg</sup>-L.mo.* CAGCTGGATAGAGCAACGGCCTTCTAAGCCGTCGGTCGGGGGTTCGAATC 695  
 . . . . .

*L.iv.* CCTCTCAGGACGTA AAAA..AAAACGCTGCAACGTTGGTAATACAACG.TT 595  
 ||||||||| || | ||||| ||||||| ||

*L.mo.* CCTCTCAGGACGTAATATGAAGCGCCGTAACGTTGTTAATACAATGTTT 745  
 . . . . .

▼

*L.iv.* GCAGCGTTTTTTGTTTTTTGAATTTCTAATAAAGTACAGATAACAAGAA 645  
 | ||| |||| ||||| || || |||||||| | || ||

*L.mo.* ACGGCGCTTTTTGGTTTTTCGAAGTTCAAATAAAGTACAAAAATTTAAA 795  
 . . . . .

*LIPI-2* AAATTAGAAACAGTGGGTATATGCTCACACGCTCAAAGCACAAGGAAAT 695  
 || | || | | || ||

*L.mo.* TTCCATTAATCTTTTTCTTAATTATATGTAATTAGGCTTCTAAAGTCAT 845  
 . . . . .

*LIPI-2* CTCTGACTGGAATAG..TAAACAGAAAGAGCATAAATAAAATTACTTAT 745  
 | || | || || | |||| |||

*L.mo.* TACTATAGTGTTTTGCCCAATCTTAATTTGAAGAATATAATTCTTTAC 895  
 . . . . .

*LIPI-2* TCATAGGACTGTTATTGCATTGAGAACTTAGCGATCGTCTATTTAATT 795  
 | |||| || || || |||| ||

*L.mo.* TTTTGGTATTAGTCTTATTTAG.....TAGCATTGCTCCATAAAAAAC 945  
 . . . . .

*LIPI-2* GTTTTTGCCTCAGTAATGAATAGGATTATTAACTTTTGTTATATGAACA 845  
 | |||| | || ||||| || ||

*L.mo.* AATAGAAAAATTAATACCAGTTCTTATATAAAAATCTTCTCATGACGAGA 995  
 . . . . .

*LIPI-2* GCTTCTAATTGAGCTAGAATACATAATTGGAGCGTGTAAAAAGATATG 895  
 ||||| || || |||| | |

*L.mo.* AGATTTTTATTTGCGATTGAGCATCCAAAAACAGGGGTATCATATAAGT 1045  
 . . . . .

*LIPI-2* . G.....AAATGATTAGGTGACAACTGTTATTCATATGAAATTTCTTT 945  
 | ||||| | ||||| ||| |

*2302.1\_L.mo.* GTTCTAAAAAATGCTAATTGAAGGGGAGTTTTACATGAAAAAATGCTG 1095  
 RBS >2302.1

**Figura 3.3.9.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo izquierdo de LIPI-2. La secuencia de la región *ysnB-tRNA<sup>arg</sup>* de *L. ivanovii* y el extremo izquierdo de LIPI-2 (zona promotora de *i-inIB2*) ha sido alineada mediante el programa GAP (GCG) con la secuencia de DNA de su región correspondiente del cromosoma de *L. monocytogenes* EGDe. En el margen derecho se muestra la numeración de los nucleótidos. En *L. ivanovii* el inicio se corresponde con el extremo 5' de la secuencia de *ysnB* que hemos determinado en este trabajo (número de acceso AJ271621). En *L. monocytogenes*, se empieza a numerar desde el posible inicio de la traducción de *ysnB* en EGDe. En el margen izquierdo se indica la especie y los nombres de los genes. *L.iv.*, *L. ivanovii*; *L.mo.* *L. monocytogenes*. La región intergénica está señalada por *L.iv.* o *L.mo.* El posible codón de inicio de la traducción y la secuencia RBS de *2302.1* se encuentran subrayadas. La dirección de la transcripción se indica mediante una punta de flecha (>). El codón de fin de la transcripción de *ysnB* se resalta en negrita. La secuencia codificante del *tRNA<sup>arg</sup>* se señala en cursiva y subrayada. La secuencia de LIPI-2 está doblemente subrayada. El punto exacto de divergencia entre las secuencia de ambas especies, que determina el extremo izquierdo de LIPI-2 se indica con un triángulo invertido. La posición del oligo PI-82 se señala con una flecha encima de la secuencia.

(Figs. 3.3.9 y 3.3.10). Hemos considerado como extremos de la región específica de *L. ivanovii* a aquellos puntos a partir de los cuales se interrumpe bruscamente el alto grado de identidad a nivel nucleotídico que presentan las secuencias de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, pasando a tan sólo un 43,6% en el extremo izquierdo y un 36,4% en el derecho. El punto de discontinuidad entre los genomas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se localiza, por la izquierda, a 263 pb corriente abajo del codón de stop de *ysnB* (Fig. 3.3.9), y por la derecha, en el nucleótido contiguo corriente arriba del codón de stop de *ydel* (Fig. 3.3.10).

Según los datos hasta aquí presentados, el segmento específico de *L. ivanovii*, en tanto que isla cromosómica asociada con la virulencia y específica de una especie patógena, respondería al concepto de PAI. En el punto de inserción del 75% de las PAIs descritas hasta la fecha en patógenos bacterianos se encuentran loci tRNA (208,220,248). Estos tRNAs sirven como secuencias diana para la integración en el cromosoma de elementos genéticos móviles, lo que sugiere que las PAIs se han originado a partir de bloques de información genética adquiridos por transferencia horizontal (84,220).

Decidimos, por tanto, analizar la posible existencia de loci de tRNAs en toda la región caracterizada. Para ello utilizamos el programa informático tRNAscan-SE v.1.11 (343). En el segmento comprendido entre *ysnB* y el inicio del fragmento específico de *L. ivanovii*, identificamos un gen tRNA de arginina (*tRNA<sup>arg</sup>*). La organización genética de la zona es similar en *L. monocytogenes* EGDe y *B. subtilis* y en ambas especies existe también un *tRNA<sup>arg</sup>* en la misma localización. Mientras que *L. ivanovii* comparte una organización similar a la de *L. monocytogenes* en la zona cromosómica que flanquea por la derecha a la región específica, el fragmento que se encuentra a la derecha del locus *ysnB* en *B. subtilis* difiere completamente en cuanto a composición génica. Estos datos proporcionan indicaciones acerca del posible mecanismo de adquisición de la isla cromosómica de *L. ivanovii* y del papel de la región

intergénica donde se encuentra el *tRNA<sup>arg</sup>* en la plasticidad genómica de las bacterias Gram-positivas (véase también apartado 3.3.2.7). El análisis comparado de la región situada entre *ysnB* e *ydel* en *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* EGDe reveló la existencia en el genoma de esta última de una ORF adicional, denominada 2302.1, que no presenta homologías en las bases de datos de proteínas. La presencia de esta ORF fue confirmada experimentalmente mediante PCRs realizadas con oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia de *ysnB* (YS-1 y PI-82, Fig. 3.3.12 y Tabla 4.4) y de *ydel* (PI-81 Fig. 3.3.12 y Tabla 4.4) de EGDe. Utilizando las parejas de oligonucleótidos YS-1/PI-81 y PI-82/PI-81, obtuvimos dos amplicones de 2,66 y 2,33 kb respectivamente, correspondientes a 2302.1 y sus regiones intergénicas. Estos resultados coincidían exactamente con la distancia estimada a partir de la información genómica de EGDe. Se ha descrito que la integración de PAIs en genes *tRNA* puede ir acompañada de deleciones de fragmentos de DNA de diferente tamaño (37,42,367,388). Parece por lo tanto probable que el mecanismo de integración de la isla cromosómica de *L. ivanovii* haya dado lugar a un fenómeno de deleción, ocasionando la pérdida de un segmento de DNA de 1.763 pb en el que estaba incluida la ORF 2302.1.

Otra característica prominente de las PAIs es su –habitualmente- distinto contenido en G+C en relación con el núcleo genómico básico de la especie correspondiente (216). Esta diferente composición del DNA refleja el origen exógeno de los determinantes genéticos que componen estas PAI y su adquisición en momentos relativamente recientes de la evolución por un mecanismo de transferencia genética horizontal (208,216,327,1). De nuevo coincidente con el concepto de PAI, la isla genómica específica de *L. ivanovii* se caracteriza, tal y como hemos descrito en el apartado anterior, por presentar un contenido en G+C significativamente inferior al promedio de *L. ivanovii*. Para analizar si los puntos de inserción de la isla genómica se corresponden con un cambio significativo en el % de G+C, analizamos la composición del DNA en los segmentos cromosómicos contiguos a los extremos. Comprobamos que el contenido en G+C varía bruscamente en los límites previamente identificados basándonos en el criterio de divergencia con la secuencia de *L. monocytogenes* (Figs. 3.3.9 y 3.3.10). Así, el porcentaje de G+C cambia bruscamente de un 40% en la región izquierda (locus *ysnB-tRNA<sup>arg</sup>*) común a *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* a un 33,9% en la zona específica de *L. ivanovii* (locus *i-inlB2*). Igualmente, por la zona derecha el porcentaje cambia desde el 36% en la zona común (locus *ydel*) al 30% en la zona específica (*orf3*).

En los extremos de muchas PAIs se han descrito secuencias que forman repeticiones directas, las cuales están presumiblemente asociadas con la movilidad/inestabilidad de la correspondiente región. Estas secuencias, sin embargo, no se encuentran presentes en las PAIs evolutivamente más antiguas y por tanto estabilizadas en el genoma bacteriano, como SPI-1 (382), SPI-2 (236), SPI-3 (415) y SPI-4 (596) de *Salmonella*, LEE de *E. coli*, PaLoc de *Clostridium difficile* (54) o la propia LIPI-1 de *Listeria* (200). En los extremos de la isla genómica específica de *L. ivanovii* aquí caracterizada no hemos



destacan en negrita. La dirección de la transcripción se indica mediante puntas de flecha (>/<). La secuencia de LIPI-2 está doblemente subrayada. El punto exacto de divergencia entre las secuencia de ambas especies, que determina el extremo derecho de LIPI-2 se indica con un triángulo invertido. La posición de los oligos PI-83/PI-81 se señala con una flecha encima y debajo de su secuencia, respectivamente. Por último, la estructura palindrómica localizada en el extremo derecho de LIPI-2 se indica con dos flechas invertidas.

encontrado secuencias que den lugar a ninguna repetición directa. Tampoco hemos identificado otros elementos genéticos asociados con movilidad, tales como IS o genes de integrasas o transposasas.

### **3.3.2.5.3 LIPI-2, una nueva isla de patogenicidad de *Listeria*.**

En conclusión, hemos identificado entre los loci *ysnB* e *ydel* una región cromosómica de 22 kb específica de *L. ivanovii* y que está implicada en la virulencia. Dicha región tiene un contenido en G+C significativamente distinto al promedio del genoma de la especie, en su punto de inserción se localiza un tRNA y presenta inestabilidad genética, dando lugar a una gran deleción que arrastra a toda una porción de la región específica. Estas características satisfacen la mayoría de las premisas enunciadas para lo que actualmente se conoce como PAIs (208,216,220,303), concepto utilizado para definir aquellos elementos multigénicos asociados con la virulencia que están presentes en el genoma de las especies o variedades patógenas, han sido adquiridos por transferencia horizontal, y juegan un papel esencial en la evolución de la virulencia en las poblaciones bacterianas. Hemos denominado por lo tanto LIPI-2 (*Listeria Pathogenicity Island 2*) a esta región cromosómica, siguiendo una nueva nomenclatura similar a la utilizada en otras bacterias y que proponemos para la designación de todo locus de patogenicidad de considerable tamaño y genéticamente heterogéneo (i.e. codificando al menos dos tipos distintos de especies moleculares de factores de virulencia) presente en *Listeria*. Con esta nomenclatura hemos denominado LIPI-1 al cluster *hly* de virulencia y que juega un papel primordial en el parasitismo intracelular de *Listeria* (véase apartado 1.3.1).

### **3.3.2.6. Estudio de LIPI-2 en distintas cepas de *L. ivanovii*.**

Una de las principales características de las PAIs es su ausencia en especies relacionadas no patógenas o en aquellas que poseen mecanismos de patogenicidad diferentes. Asimismo, las PAIs pueden ser adquiridas y deleccionarse desde los genomas bacterianos debido a la inestabilidad (y algunas, capacidad de movilización) que presentan. Además, se han descrito numerosos ejemplos de variabilidad en la organización de la estructura genética de una misma PAI en diferentes cepas o serotipos (75,78,458,581).

Dado que por sus repeticiones internas los genes *inI* pueden estar sometidos a un elevado grado de recombinación intra- e intergénica, decidimos investigar la posibilidad de variabilidad genética en LIPI-2. La especie *L. ivanovii* está compuesta por dos subespecies, *ivanovii*, que es mayoritaria, y *londoniensis*. Esta última presenta una significativa divergencia genética respecto de la primera (44), manifestada, por ejemplo, en un distinto patrón de restricción en los análisis *Southern blot* utilizando *smcL* como sonda (195).

Analizamos en primer lugar la estructura de LIPI-2 en tres cepas de *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* de origen geográfico distinto (ATCC19119<sup>T</sup>, D-23 y P-55). Para ello empleamos un panel de parejas de oligonucleótidos con el que amplificamos cada determinante genético de la isla cromosómica (Fig. 3.3.12 y Tabla 4.4). Los tamaños de las amplificaciones específicas obtenidas coincidieron exactamente en las tres cepas, con lo que concluimos que la estructura de LIPI-2 está perfectamente conservada en distintos clones de la subespecie *ivanovii*.

A continuación sometimos al mismo análisis una cepa de *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*. En este caso no logramos obtener resultados positivos con algunas de las parejas de oligonucleótidos: PI-72/57 y PI-77/73, específicas de *i-inlB2*, y Efseq3/Efdown2, específica de *orf3* (Fig. 3.3.12 y Tabla 4.4). Recordemos que estos dos genes se sitúan en cada uno de los extremos de LIPI-2 (izquierdo y derecho, respectivamente). El patrón de amplificación fue idéntico para el resto de los genes de LIPI-2 (Fig. 3.3.12). Para comprobar si la ausencia de amplificación con los oligonucleótidos específicos de *i-inlB2* y *orf3* era debida a simple variabilidad de las secuencias diana o que dichos genes no se encuentran presentes, se amplificaron las correspondientes regiones utilizando oligonucleótidos diseñados en genes flanqueantes (*ysnB/i-inlL* para *i-inlB2*, *i-inlE/ydel* para *orf3*) (Fig. 3.3.10 y Tabla 4.4). El análisis de los productos de PCR obtenidos reveló la ausencia de los genes *i-inlB2* y *orf3*, lo que indica que existe variabilidad en la región de los extremos de LIPI-2 entre las dos subespecies de *L. ivanovii*.

Los anteriores resultados confirman asimismo que LIPI-2 se encuentra insertada en el mismo punto cromosómico en las distintas cepas de *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* así como en *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*. Como era de esperar, por tanto, no se obtuvo ningún producto de amplificación con una pareja de oligonucleótidos diseñados en las regiones flanqueantes al punto de inserción y orientados hacia la isla genómica (PI-82/81), indicando la presencia de un gran fragmento de DNA entre los loci *ysnB* e *ydel* (Fig. 3.3.10 y Tabla 4.4).

### **3.3.2.7. Estructura de la región de inserción de LIPI-2 en *Listeria* spp.**

Decidimos estudiar la estructura de la región flanqueante al punto de inserción de LIPI-2 en el resto de las especies del género *Listeria* para determinar la posible existencia de variabilidad genética en ese punto. Para ello realizamos un mapeo por PCR utilizando oligonucleótidos derivados de los loci *ysnB* e *ydel*. Tal y como hemos demostrado en el apartado anterior, en *L. monocytogenes* EGDe, entre *ysnB* e *ydel* se encuentra una nueva ORF, denominada 2302.1. Para diseñar los oligonucleótidos en las regiones con máxima homología, utilizamos los alineamientos de los genes flanqueantes a la zona de inserción de LIPI-2 en *L. monocytogenes* EGDe y *L. ivanovii* (Figs. 3.3.9 y 3.3.10). De esta forma diseñamos YS-3 y PI-82 en la región de *ysnB* así como PI-81 y PI-83 en *ydel* (Fig. 3.3.10 y Tabla 4.4). Estos oligonucleótidos fueron utilizados para llevar a cabo PCRs con DNAs obtenidos a partir de cepas pertenecientes a distintos serotipos y representantes de los dos grupos genéticos o divisiones descritos en *L. monocytogenes* (60,431) (P14 serotipo 4b, SLCC 2755 serotipo 1/2b y SLCC 2540 serotipo 3b, integrantes de la división I; EGDe serotipo 1/2a y L028 serotipo 1/2c,

SLCC 2373 serotipo 3a pertenecientes a la división II). Las especies apatógenas *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi* (incluida su subsp. *murrayi*) también fueron analizadas.

Sorprendentemente, utilizando las parejas de oligonucleótidos PI-81/82 e YS-3/PI-81 sólo conseguimos resultados positivos con EGDe, obteniendo los productos de PCR ya conocidos de 2,3 y 2,66 kb, respectivamente. Estos amplicones se corresponden con 2302.1 y sus regiones flanqueantes. Para P14, L028, SLCC2755, así como las especies apatógenas de *Listeria*, no logramos obtener ningún producto amplificado. Este resultado podría explicarse por un fracaso en la hibridación de los oligonucleótidos debido a la variación genética con respecto a EGDe/*L. ivanovii*, o bien a la presencia de un nuevo fragmento de DNA de considerable tamaño en esta misma región.

Si bien la primera posibilidad parecía poco probable dado que las secuencias nucleotídicas de EGDe y L028 son básicamente idénticas (60), decidimos comprobar si los oligonucleótidos diseñados (YS-3, YS-4, PI-81, PI-83, PI-82) eran capaces de amplificar específicamente los genes flanqueantes a LIPI-2 en las distintas especies. Así, como se muestra en la Fig. 3.3.12, obtuvimos amplificaciones positivas en todas las especies para los genes *ysnB* (YS-3/4), *ydel* (PI-81/83). Por tanto, el fracaso en la amplificación del locus *ysnB/ydel* no se debe a una incorrecta hibridación de los oligonucleótidos diseñados.

Como ya hemos señalado anteriormente, 2302.1 se localiza entre *ysnB* y *ydel* en *L. monocytogenes* EGDe. Para estudiar si se encuentra presente en el resto de las especies de *Listeria*, así como para determinar si ocupa la misma posición que en EGDe, decidimos diseñar la pareja de oligonucleótidos m-1 y m-2 (Fig. 3.3.12 y Tabla 4.4) a partir de la secuencia de 2302.1. Con ambos oligonucleótidos hemos obtenido el producto amplificado de 470 pb específico de 2302.1 en todos los serovares de *L. monocytogenes* y en *L. innocua*. Con el fin de analizar la posición de 2302.1 con respecto a *ysnB* y *ydel*, realizamos PCRs utilizando los oligonucleótidos YS-4/m-2 y PI-81/m-1 para amplificar las regiones *ysnB/2302.1* y *2302.1/ydel*, respectivamente. En EGDe, obtuvimos dos amplificaciones que se corresponden con los tamaños esperados de 1,8 y 1,3 kb según los datos de la secuencia conocida. Sin embargo, en el resto de las cepas de *L. monocytogenes* así como en la especie apatógena *L. innocua*, mientras un mismo fragmento de 1,3 kb era amplificado entre *ydel* y 2302.1 (PI-81/m-1), fracasaron todos los intentos por amplificar la región comprendida entre 2302.1 e *ysnB-tRNA<sup>arg</sup>* (Fig. 3.3.12).

Estos resultados favorecen la segunda de las explicaciones mencionadas más arriba, en la que se sugería la presencia de un fragmento adicional de DNA en la región cromosómica situada entre el extremo 3' de *ysnB* donde se localiza *tRNA<sup>arg</sup>* y 2302.1. Esto supondría que un mismo lugar de inserción definido por la presencia de un tRNA, puede ser utilizado como sitio para la integración de diferentes fragmentos de DNA. Esta región, por tanto, podría ser considerada como un "punto caliente" de variabilidad genética importante para la evolución adaptativa en *Listeria*. Una situación similar ha sido recientemente descrita en otras bacterias, como *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, y *Vibrio cholerae* (216,269,458), en donde diferentes segmentos de DNA se encuentran insertados en una misma región en distintas cepas.

Figura 3.3.11 : apaisada después de la bibliografía

---

**Figura 3.3.11.** Estructura de LIPI-2 y la región de inserción en *Listeria* spp.

(A) En la parte superior se representa el mapa físico de la estructura genética de LIPI-2 en *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*. Para más detalles véase la leyenda de la Fig. 3.3.5. Las flechas de pequeño tamaño se corresponden con los oligonucleótidos utilizados para amplificar específicamente cada uno de los genes presentes en LIPI-2. Las flechas con trazo más grueso resaltan los oligonucleótidos empleados en el análisis de los extremos de LIPI-2, localizándose su secuencia en las regiones flanqueantes. En la parte inferior se muestra la foto de la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR obtenidos en *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (números 1) y *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (números 2) utilizando las parejas de oligonucleótidos indicados en el esquema superior. Los genes analizados se señalan en la parte inferior de la foto correspondiéndose con las bandas obtenidas en el gel. Únicamente se observan diferencias entre ambas subespecies en los dos genes situados en los extremos de LIPI-2: *i-inlB2* y *orf3*. Tan sólo en *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* se obtienen amplificaciones. Se indica con flechas el tamaño diferente de los amplicones obtenidos al amplificar con PI-82/62 el borde izquierdo (E.I.) y con 24A/PI-81 el borde derecho (E.D.) de LIPI-2 en ambas subespecies. Este dato corrobora la delección de *orf3* e *i-inlB2* en LIPI-2 de *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, y confirma la inserción de LIPI-2 en el mismo locus *ysnB-tRNA<sup>arg</sup>* en ambas subespecies. En las amplificaciones de *orf3* y *smcL* se señala con una flecha la banda difusa de muy pequeño tamaño que se corresponde con un exceso de oligonucleótidos empleado en su amplificación.

(B). Organización física del locus *ysnB-ydel* de *L. monocytogenes* EGDe. El color negro de las flechas muestra que se presentan también en *L. ivanovii*. El color gris indica que *2302.1* no se encuentra en *L. ivanovii*. Las flechas de pequeño tamaño representan las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones que se indican en la foto de la derecha. Con el triángulo se señala la presencia de un fragmento de tamaño desconocido que se encuentra separando *ysnB* y *2302.1* en las especies de *Listeria* spp. analizadas. Las fotos de la derecha indican el análisis de la estructura de este locus en distintos serovares de *L. monocytogenes* y en el resto de especies del género *Listeria*. Así, la línea A es *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*; B, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*; C, *L. monocytogenes* EGDe (serotipo 1/2a); D, *L. monocytogenes* P14 (serotipo 4b); E, *L. monocytogenes* L028 (serotipo 1/2c); F, *L. monocytogenes* SLCC 2755 (serotipo 1/2b); G, *L. monocytogenes* SLCC 2373 (serotipo 3a); H, *L. monocytogenes* SLCC 2540 (serotipo 3b); I, *L. innocua* ATCC 33090; J, *L. seeligeri* CIP 100100; K, *L. welshimeri* SLCC 5334; L, *L. grayi*; M, *L. grayi* subsp. *murrayi*. En la parte superior de cada foto se detallan la pareja de oligonucleótidos empleada en cada amplificación. Se comprueba que en todas las especies, excepto en *L. grayi* y *L. grayi* subsp. *murrayi*, se obtienen amplificados para *ysnB* e *ydel*. Sin embargo, únicamente hemos logrado amplificar *2302.1* en *L. monocytogenes* y *L. innocua*. Además, mientras los amplicones obtenidos entre *2302.1* e *ydel* coinciden en todos los casos (el tamaño se indica con una flecha), únicamente en la cepa EGDe hemos logrado obtener un producto amplificado (1,8 kb) entre *ysnB* y *2302.1*.

### 3.3.3. Discusión.

Hemos descrito en este capítulo un nuevo locus de virulencia en *Listeria*, LIPI-2, compuesto por doce genes. Se trata de una PAI de 22 kb exclusiva de *L. ivanovii*, una especie que, a diferencia de *L. monocytogenes*, muestra patogenicidad selectiva para los rumiantes. LIPI-2 está insertada entre los loci *ysnB* e *ydel*, los cuales en *L. monocytogenes* se encuentran adyacentes, separados únicamente por una ORF (*2302.1*) que, a su vez, está ausente en *L. ivanovii*.

Las PAIs son bloques de información genética requeridos para las funciones de virulencia y que han sido adquiridos por transferencia horizontal, confiriendo a las bacterias receptoras una propiedad patogénica determinada. (209,220,217). Así, por ejemplo, la presencia de un tipo concreto de PAI en una determinada región cromosómica de *E. coli* confiere a las cepas portadoras propiedades uropatogénicas o enteropatogénicas (414). Las PAIs juegan por tanto un papel crucial en la evolución de la virulencia bacteriana, entendiéndose ésta actualmente como una sucesión de saltos cuánticos que son el resultado de la incorporación al patrimonio genético de la bacteria de nuevos loci de virulencia que

resultan seleccionados al aportar una ventaja evolutiva a corto plazo en el propio hospedador (208). En este sentido, las PAIs representan un concepto totalmente análogo, tanto en términos genéticos como evolutivos, a lo que representan los cassettes de multirresistencia a antibióticos. Tras su incorporación, las PAIs van adaptándose y refinándose poco a poco hasta quedar totalmente integradas en el patrimonio genético de la especie que la adquirió. De esta forma, nos encontramos en el mundo de las bacterias patógenas con PAIs en diferentes grados evolutivos, desde aquellas todavía capaces de movilización a través de elementos genéticos tales como fagos, plásmidos integrativos, IS o transposones, hasta aquellas otras totalmente estabilizadas y en las que incluso no se encuentra traza alguna del mecanismo de movilización original ni evidencia de una composición genética exógena (216,220,327,420).

El concepto de PAI ha aportado la base conceptual para comprender cómo nace y se hace un microorganismo patógeno. La virulencia es un proceso multifactorial y es difícil que la adquisición de una sola PAI, por muy grande y compleja que ésta sea, pueda convertir a un microorganismo comensal en patógeno. La evolución de la virulencia hay que contemplarla como un proceso gradual en el que la adquisición ordenada y dirigida por la evolución de un conjunto de bloques de material genético exógeno ha ido confiriendo pequeñas ventajas evolutivas al dar acceso a nuevos nichos o nuevas capacidades para competir en el organismo hospedador. Una vez desarrollado un determinado fondo genómico requerido para la vida parásita, es posible que la adquisición de un bloque de DNA crítico confiera una ventaja selectiva a corto plazo muy llamativa, dando lugar a la creación de una nueva patovariedad. Actualmente se concibe el genoma de un microorganismo patógeno como un conjunto de PAIs insertadas sobre un núcleo de información genética común a un grupo filogenético determinado y que son responsables de las distintas fases del proceso infeccioso que dicho patógeno es capaz de generar (216).

En este contexto, LIPI-2 cumple la mayoría de las premisas que definen a las PAIs, v.g.: (i) está implicada en la virulencia de la bacteria portadora y se encuentra presente de forma exclusiva en una especie que representa a una patovariedad dentro del género *Listeria*; (ii) tiene gran tamaño y está formada por múltiples genes; (iii) su porcentaje de G+C es significativamente distinto del que caracteriza al núcleo genómico donde se encuentra insertada; (iv) su punto de inserción está asociado con un locus tRNA; y (v) presenta inestabilidad genética, dando lugar de forma espontánea a una delección específica que disminuye el grado de virulencia.

Precisamente ha sido la última de las características enumeradas la que nos ha permitido identificar a LIPI-2. El análisis genético de los mutantes 44/2, GD-1 y GD-3 nos permitió caracterizar una región cromosómica de 17,5 kb que se deleciona espontáneamente. El estudio de su secuencia reveló que esta región estaba integrada por dos unidades estructural y funcionalmente distintas. Por un lado, las 7,5 kb próximas a su extremo derecho eran comunes a *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* EGDe y, también, *L. innocua*, y algunas de sus proteínas codificadas tenían función metabólica. Además, el contenido en G+C de esta región, 36%, era similar al estimado para el genoma de *L. ivanovii*. Por el contrario, las 10 kb situadas en el extremo izquierdo presentaban un contenido medio en G+C significativamente inferior, 31%, y estaban integradas por genes específicos de *L. ivanovii* potencialmente asociados con la virulencia (*smcL* y varios genes de internalinas). La extensión de esta porción izquierda

mediante PCRs inversas nos permitió, finalmente, completar las 22 kb que componen la isla genómica específica de *L. ivanovii*.

Los fenómenos de delección constituyen una característica frecuente de las PAIs. Así, se han descrito delecciones espontáneas de distintos tamaños en PAIs de los patógenos *Y. pestis* (148), *Y. enterocolitica* (90), *Y. pseudotuberculosis* (67), cepas uropatogénicas de *E. coli* (42), *Bacteroides fragilis* (160), *H. pylori* (78), *Haemophilus influenzae* y *S. pyogenes* (420). Cuando se trata de PAIs de reciente adquisición, dichos fenómenos pueden tener su origen en la persistencia de los mecanismos específicos de movilización. En otros casos, estas delecciones pueden reflejar meramente la inestabilidad genética intrínseca de una región todavía en proceso de adaptación al entorno genético en el que una vez se integró (209). Este parece ser el caso de LIPI-2, ya que el análisis de los extremos del segmento deleccionado, idénticos en los tres mutantes obtenidos de forma independiente, no nos ha permitido identificar ninguna estructura genética que pueda implicar un mecanismo específico de delección. Las excisiones de material genético pueden abarcar a toda la PAI o bien a partes de ésta, e incluso afectar, como en LIPI-2, a regiones cromosómicas adyacentes tan extensas como 7,5 kb. Delecciones de extremos de PAIs junto con segmentos de diferentes tamaños de su DNA flanqueante han sido previamente descritas en diversos patógenos, como *Bacteroides fragilis* (160), *Y. enterocolitica* (18) y *E. coli* (42).

Desde un punto de vista evolutivo, no sólo la adquisición de genes sino también los procesos de delección contribuyen de forma decisiva a la diversificación genética y la especiación (322). Las delecciones pueden representar un tipo especial de adaptación a determinados nichos o situaciones en los procesos infecciosos. Así, se ha descrito que cepas de *E. coli* uropatogénicas (UPEC) aisladas de pacientes con infecciones crónicas del tracto urinario presentan menos genes de virulencia que aquellas aisladas de procesos agudos (219). Este ejemplo indica que las delecciones de (o en) determinadas PAIs pueden convertir cepas altamente virulentas durante la fase inicial de una infección en moderadamente virulentas durante los estados crónicos de la misma. Por otro lado, un concepto opuesto al de PAI ha sido recientemente propuesto para distintas especies de *Shigella* y *E. coli* enteroinvasivo (219,365). Según dicho concepto, la conversión de un microorganismo comensal en patógeno no sólo conllevaría la adquisición de genes de virulencia sino la pérdida por delección de bloques de genes denominados "agujeros negros". Por lo tanto, los procesos de delección pueden constituir un modo adicional de modulación de la virulencia, contribuyendo a la adaptación *in vivo* de los patógenos bacterianos a ciertas etapas del proceso infeccioso (17). Sin embargo, en condiciones *in vitro* como las que se han utilizado para obtener los mutantes de delección de LIPI-2, estas delecciones pueden reflejar simplemente la falta de presión selectiva de conservación de una región inestable (420). No olvidemos que es un hecho bien conocido la pérdida por delección de regiones asociadas con genes de virulencia favorecida por pases prolongados de los patógenos en condiciones de laboratorio.

Los bordes del fragmento deleccionado están definidos, a la izquierda, por la región intergénica localizada entre dos miembros de la familia de las internalinas, *i-inIII/i-inIJ*, y a la derecha, por *orf9*, que codifica una proteína de membrana con homologías a bombas de eflujo implicadas en resistencia a antibióticos (40). La presencia de genes de resistencia a antibióticos no es inusual en las proximidades de regiones adquiridas por transferencia genética horizontal. En el caso de *Listeria*, en el extremo derecho del islote de patogenicidad

específico de *L. ivanovii* integrado por las internalinas *i-inlC* e *i-inlD*, existe un gen de multiresistencia a antibióticos y un regulador con homologías a la familia TetR de reguladores transcripcionales (143). En *L. monocytogenes*, hemos identificado un posible gen de resistencia a antibióticos en el borde izquierdo de otro islote de virulencia, el locus *hpu* responsable de la proliferación intracelular por utilización de hexosas fosfato (85,473). El análisis de la región *hpu* en la base de datos del genoma de *L. monocytogenes* EGDe nos ha permitido identificar además la presencia de genes implicados en movilización genética, como transposasas.

El hecho de que el punto de inserción de LIPI-2 se encuentre asociado con un gen tRNA es muy relevante ya que sugiere que su adquisición se ha producido a través de un proceso de transferencia horizontal, posiblemente vehiculada por un elemento móvil tipo bacteriófago o plásmido integrativo. De hecho, es muy común que las PAIs identificadas en bacterias Gram-negativas se encuentren insertadas en un locus tRNA. Esta circunstancia, sin embargo, no se había descrito hasta ahora en Gram-positivos, constituyendo LIPI-2 (junto con el locus *i-inlCD*) el primer ejemplo de PAI integrada en un locus tRNA en esta subdivisión bacteriana.

El mapeo por PCR del locus *ysnB/2302.1/ydeI* en distintos serovares representantes de las dos divisiones genéticas de *L. monocytogenes*, así como en *L. innocua*, demuestra que existe variabilidad estructural entre los extremos 3' de *ysnB* y 5' de *2302.1*. Ello nos permite sugerir que la región del locus *tRNA<sup>arg</sup>* constituiría un "punto caliente" para fenómenos de recombinación que habrían originado la incorporación de distintos elementos de DNA, o la reestructuración de su organización genética, en las distintas especies de *Listeria*. Fenómenos similares han sido descritos en los puntos de inserción de otras PAIs, como por ejemplo SPI-5 de *Salmonella* (597) o VPI de *V. Cholerae* (269).

A pesar de que el análisis del punto de inserción de LIPI-2 sugiere un mecanismo de movilización específico, no se han encontrado en esta isla genómica restos de genes de transposasas o integrasas o de otros elementos genéticos tales como IS o repeticiones directas, implicados en recombinación. La ausencia de estos elementos sugiere que LIPI-2, tras su adquisición, ha sufrido un proceso de estabilización a lo largo de una evolución probablemente prolongada. A pesar de esta estabilización, los 22.047 pb de LIPI-2 presentan un porcentaje de G+C del 32,27%, significativamente inferior al promedio de *L. ivanovii*, estimado en un 37-38% (524). Las diferencias en el contenido de G+C entre PAIs y el resto del genoma bacteriano se han considerado como indicadores de su origen heterólogo. Además, se ha descrito que esta distinta composición de bases característica del DNA exógeno, se va modificando a lo largo del tiempo hasta adoptar la composición típica del genoma hospedador (321). Por lo tanto, se podría concluir que LIPI-2 ha sido adquirida por *L. ivanovii* tras un fenómeno no del todo lejano, cronológicamente, de transferencia genética horizontal.

Una relativa antigüedad de LIPI-2 viene en todo caso sugerida por el hecho de que la isla genómica está insertada en el mismo locus cromosómico en las dos subespecies de *L. ivanovii*, lo que indica que fue adquirida antes de la diversificación en los dos linajes genéticos diferenciados que constituyen esta especie. Esta antigüedad, sin embargo, no se remonta tan atrás en la evolución del género *Listeria* ya que LIPI-2 no está presente en *L. monocytogenes* ni en *L. innocua*, las dos especies que forman una de las dos subramas derivadas del ancestro común de las listerias patógenas (véase Fig. 1.3). La otra subrama está

formada por *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. El hecho de no detectarse secuencias del gen *smcL* en *L. seeligeri* y *L. welshimeri* (195), así como la significativa diferencia en la composición en G+C de LIPI-2 respecto del núcleo genómico donde se encuentra insertada, parece indicar que la isla fue adquirida por *L. ivanovii* con anterioridad a la diferenciación de la subrama a la que ésta pertenece en las tres especies que actualmente la componen (Fig. 1.3). El basarse en la ausencia de *smcL* para hacer esta aseveración puede conducir, sin embargo, a una falsa interpretación ya que es perfectamente factible el que en el cromosoma de *L. seeligeri* y *L. welshimeri* se encuentre una isla genómica de internalinas muy semejante a LIPI-2, pero sin la inserción del gen de la SMasa. Los datos derivados del análisis de la estructura genética de LIPI-2 sugieren, efectivamente, que *smcL* es un gen de reciente adquisición, procedente del mismo grupo filogenético bacteriano al que *Listeria* pertenece (*SmcL* es muy semejante a la  $\beta$ -toxina estafilocócica y a la SMasa de *B. cereus*) y que se insertó en un locus preexistente de genes *inl* (véase apartado 3.3.2.5.1). No podemos descartar, por tanto, que la estructura básica de genes *inl* que componen LIPI-2 haya sido adquirida por el ancestro común de las tres especies en la correspondiente subrama evolutiva del género *Listeria*. El análisis de la presencia de secuencias de LIPI-2 entre los loci *ydel* e *ysnB* en *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, actualmente en curso, nos permitirá deducir el momento preciso de la evolución del género *Listeria* en que LIPI-2 fue adquirida. En el caso de no hallarse secuencia alguna de LIPI-2 en *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, no podremos descartar que esta isla genómica se hubiese encontrado originalmente insertada en el ancestro común de la subrama y que, como consecuencia de la pérdida o degeneración funcional de LIPI-1 (la PAI primordial de patogenicidad de las listerias; véase a continuación) -y de la consecuente ausencia de presión selectiva de conservación por haberse convertido las bacterias en apatógenas-, se hubiese perdido a través de un proceso de delección semejante al que hemos observado actualmente de forma espontánea en *L. ivanovii*.

Aunque la estructura genética de LIPI-2 es virtualmente idéntica en las subsp. *ivanovii* y *londoniensis*, existen diferencias en sus extremos. En *L. ivanovii* subsp *londoniensis* no hemos podido identificar *i-inlB2* ni *orf3*, los dos determinantes genéticos localizados, respectivamente, en los extremos izquierdo y derecho de LIPI-2 en *L. ivanovii* subsp *ivanovii*. Se han descrito numerosos ejemplos de PAIs, como SHI-2 (388,581), SPI-2 (235), SPI-3 (38), HPI (68) y *cag* (3,78), que presentan en distintas especies, serotipos o, incluso, cepas, una heterogeneidad genética en la secuencia de sus extremos. De todas ellas, HPI es la que se ha estudiado mejor y en ella se ha definido un núcleo central conservado y una región variable en su extremo izquierdo (458). Es muy probable que la variabilidad genética observada en los bordes de LIPI-2 en las dos subespecies de *L. ivanovii* sea el reflejo de una evolución divergente de esta PAI en dos contextos genéticos diferenciados. También podría reflejar la mayor inestabilidad genética de la región de los extremos, circunstancia que podría estar precisamente en el origen de la excisión del segmento de 10 kb del extremo derecho de LIPI-2.

Con independencia del momento de la evolución en que LIPI-2 fue adquirida por *L. ivanovii*, su composición mayoritaria en genes *inl* (diez de sus doce determinantes genéticos) revela que esta isla genómica tiene su origen en *Listeria*. Esto es así ya que todas las evidencias disponibles indican que la familia multigénica de internalinas es exclusiva de este género bacteriano. Esta familia está formada por una serie de proteínas que se caracterizan por poseer repeticiones ricas en leucinas (LRR). La unidad LRR define una nueva estructura

espacial dextrógira conocida con el nombre de  $\beta$ -hélice paralela (233,357,602). Esta estructura está presente en un gran número de proteínas, actualmente conocidas como superfamilia de proteínas LRR, la mayoría de origen eucariota. Los dominios LRR se asume que intervienen en interacciones proteína-proteína y se encuentran en proteínas con diversas funciones, como por ejemplo receptores implicados en transducción de señal, proteoglicanos de la matriz extracelular o los productos de los genes R de resistencia a enfermedades en plantas (288,263,267). En procariontes, las proteínas con dominios LRR son mucho menos abundantes y se encuentran casi siempre presentes en factores de virulencia tales como IpaH de *S. flexneri*, YopM de *Yersinia*, SspH1 y SspH2 de *S. typhimurium*, y la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* (47,228,352). La presencia de una amplia familia multigénica de proteínas LRR altamente homólogas es una característica única del género *Listeria*.

Los loci de internalinas comprenden habitualmente desde dos hasta varios genes *inl*, formando "islotos de internalinas". La única excepción la constituyen los genes *inlC* e *inlF* de *L. monocytogenes*, que se encuentran insertados de forma aislada en el cromosoma. Todos los genes *inl* presentan un alto grado de homología de secuencia y esta característica podría encontrarse en el origen de su diversidad en *Listeria*, al posibilitar fenómenos de recombinación intra- e intergénica. Esto mismo se ha postulado precisamente para los cluster de genes R en plantas (368), con quienes las internalinas parecen guardar un cierto paralelismo. Es perfectamente posible en este sentido que la familia multigénica de internalinas haya surgido a partir de un único determinante *inl* precursor. Teniendo en cuenta la gran distribución de proteínas LRR en eucariotas una atractiva hipótesis es que este gen *inl* precursor haya evolucionado específicamente en el género *Listeria* tras la adquisición por transferencia horizontal de un fragmento de DNA de origen eucariota codificando un motivo LRR en un gen de proteína de superficie procarionte mediante procesos de duplicación y posterior diversificación a través de fenómenos de recombinación homóloga. La presencia de genes *inl* en varias especies de *Listeria*, entre ellas *L. innocua*, parece indicar que, efectivamente, estos determinantes ya se encontraban en el ancestro común de *Listeria*. Esto indicaría que los islotos de genes *inl* son, al menos, tan antiguos como LIPI-1 (véase apartado 1.3.1 y más abajo). Sin embargo, a diferencia de LIPI-1, estos islotos no se encuentran insertados en el mismo punto del cromosoma en las distintas especies de *Listeria*. Cada una de estas especies, además, posee un complemento distinto de genes *inl*. Estos hechos, unidos a que un subgrupo de loci *inl* muestran una estrecha dependencia expresional respecto de LIPI-1 (a través de PrfA) así como, algunos de ellos, una composición en G+C significativamente distinta a la del resto del genoma y una clara inestabilidad (p. ej. LIPI-2), sugiere que dichos loci son evolutivamente más recientes que LIPI-1 y han sido (y probablemente son todavía) objeto de movilización horizontal dentro del género *Listeria*. Como hemos señalado más arriba, algunos de estos loci, como es el caso de *i-inlCD* y la propia LIPI-2, se encuentran insertados en asociación con genes tRNA, una estructura utilizada frecuentemente como diana de inserción de bacteriófagos (84,216,220,420,474). Esto sugiere que la movilización de genes *inl* dentro de *Listeria* spp. Podría haber sido llevada a cabo mediante listeriófagos, que son abundantes, presentan infectividad interespecífica y son capaces de transducción (245,339,484). Considerado todo lo señalado podemos proponer que, LIPI-2 quizás, haya evolucionado en *L. ivanovii* de forma secuencial, tras la adquisición de un núcleo de genes *inl* inicial, por duplicación y recombinación intergénica seguida de la inserción del gen *smcL*, tras su adquisición por transferencia horizontal desde una bacteria Gram-positiva.

De los doce genes que constituyen LIPI-2, nueve presentan cajas PrfA, lo que sugiere que se expresan bajo el control del regulador central de la virulencia de *Listeria*. Estos nueve genes forman parte de la familia multigénica de las internalinas y para dos de ellos, *i-inlE* e *i-inlF*, hemos demostrado experimentalmente la PrfA-dependencia. Sólo uno de los genes de internalinas presentes en LIPI-2, *i-inlB*, carece de caja PrfA y está rodeado por evidentes señales de terminación de la transcripción, lo que sugiere una expresión monocistónica PrfA-independiente. La regulación coordinada de los factores de virulencia es un hecho común en las bacterias patógenas. La incorporación de PAIs permite a los microorganismos tener acceso a nuevos nichos. Sin embargo, para que los nuevos genes sean útiles, su expresión debe estar estrechamente coordinada con el resto del genoma. Por esta razón, los genes de virulencia localizados en las PAIs están frecuentemente interconectados con las complejas redes de regulación de la bacteria receptora. Esto indica que, después de haberse producido el proceso de transferencia genética horizontal de la PAI, las nuevas secuencias adquiridas se encuentran sometidas a una fuerte presión selectiva, dando lugar a cambios en los promotores y otras secuencias reguladoras mediante mutaciones puntuales para facilitar su integración a las redes reguladores preexistentes (219). Es evidente que esto parece haber ocurrido en LIPI-2, ya que la mayoría de sus genes están presumiblemente regulados por PrfA. Por lo tanto, desde un punto de vista evolutivo, la subordinación de LIPI-2 al control expresional de PrfA es compatible con la idea de que la adquisición de LIPI-2 por *L. ivanovii* ha sido posterior a la de LIPI-1.

Las evidencias que se van acumulando indican que en *Listeria*, al igual que en otros patógenos bacterianos, los determinantes de virulencia se organizan en regiones discretas del cromosoma o islas genómicas. Ejemplos de estas islas los constituyen los loci que codifican las proteínas de resistencia al stress de la familia Clp, implicadas en la supervivencia intrafagosómica (393,394), la proteína Ami implicada en la adherencia a las células eucariotas (1), el locus *hpu* arriba mencionado, y los loci o islotes de internalinas. Entre todas estas islas genómicas existe una que es fundamental para la patogénesis de *Listeria*. Se trata del cluster de virulencia de 9 kb donde se encuentra codificado el regulador central de la virulencia, PrfA, y que contiene la mayoría de los determinantes necesarios para el desarrollo del ciclo de vida intracelular que caracteriza a estos microparásitos (véase apartado 1.2.1). Así, este "cassette de vida intracelular" está presente en las dos especies patógenas del género, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*, pertenecientes a dos subramas filogenéticas distintas que se diferenciaron hace mucho tiempo durante la evolución del género *Listeria*. En ambas especies, el cluster de virulencia se encuentra insertado de forma estable en la misma posición cromosómica, lo que sugiere una adquisición temprana por parte de un ancestro común a las dos subramas evolutivas. Una composición de DNA similar a la del núcleo genómico circundante, junto a la ausencia de toda traza de elementos de movilidad tales como transposasas, integrasas, IS o repeticiones directas, sugiere que dicho cluster de virulencia es una antigua PAI que se estabilizó en el genoma de *Listeria* millones de años atrás, probablemente debido a una fuerte presión selectiva de conservación dado su carácter indispensable para la colonización de los tejidos del hospedador animal. En este trabajo de tesis hemos propuesto la denominación LIPI-1 (de *Listeria pathogenicity island 1*) a esta PAI primordial para la patogénesis de *Listeria*, inaugurando así una nomenclatura unificada para la designación de toda PAI de contenido genéticamente heterogéneo que se describa en *Listeria* (566). Siguiendo esta nomenclatura, hemos designado LIPI-2 a la PAI descrita en este trabajo.

A diferencia de LIPI-1, LIPI-2 es específica de *L. ivanovii*, lo que sugiere que podría estar implicada en la patogénesis diferencial de esta especie. De los diez genes de internalinas presentes en la isla, ocho codifican pequeñas internalinas secretadas PrfA-dependientes (S-Inl). De esta forma, *L. ivanovii* aparece dentro del género *Listeria* como una especie especialmente rica en S-Inl, ya que el otro locus de genes inl identificado en esta especie, *i-inlCD*, también codifica este tipo de internalinas. Esto contrasta con *L. monocytogenes*, en donde todos los genes de internalinas descritos, con excepción del locus *inlC*, codifican internalinas grandes asociadas con la pared (L-Inl).

En LIPI-2, de nuevo a diferencia de LIPI-1, el grupo mayoritario de genes constituyentes codifica proteínas potencialmente implicadas en fenómenos de interacción con la superficie celular. Así, las únicas invasinas miembros de la familia de las internalinas hasta ahora identificadas en *Listeria* son InlA e InlB de *L. monocytogenes*. InlA e InlB son capaces por sí solas de inducir la fagocitosis en sus correspondientes células permisivas. Y las evidencias disponibles muestran que este proceso implica el reconocimiento de receptores de superficie y el desencadenamiento de procesos de señalización hacia el interior de la célula (véase apartado 1.2.2). Es muy posible por tanto que LIPI-2 juegue un papel similar al de otras islas de patogenicidad descritas en bacterias y que están implicadas en los procesos de adhesión y entrada al interior de las células, un paso esencial para el proceso infeccioso, especialmente en aquellos patógenos invasivos (108,369).

La masiva presencia de genes inl en LIPI-2 es realmente intrigante. Teniendo en cuenta que esta isla está conservada en todas las cepas de *L. ivanovii* analizadas, incluso en la subespecie *londoniensis*, y que el material genético de los patógenos bacterianos está sometido en su evolución a un proceso reductivo por el cual todo gen no esencial es rápidamente eliminado (9), es evidente que todas estas internalinas juegan algún papel en la biología y, posiblemente, la virulencia de *L. ivanovii*. Se ha postulado que la variabilidad en la cara expuesta de los motivos LRR de las internalinas es importante para la creación de una variedad de interacciones proteína-proteína específicas (357,358). En consonancia con ello, se ha demostrado que los dominios LRR de InlA e InlB son requeridos para la invasión de las respectivas células dianas (52,323). Además, existe clara evidencia experimental de que InlA e InlB están implicadas en el tropismo celular de *L. monocytogenes* (132,206,207,376,421,357,390). Teniendo en cuenta las posibilidades de recombinación ofrecidas por las secuencias repetidas presentes en los genes *inl*, resulta verosímil imaginar que tanto la propia respuesta inmune como la inmensa variedad de receptores presentes en el hospedador infectado, puedan ejercer una selección diversificadora positiva sobre los motivos LRR de las internalinas, dado lugar a una combinación de polimorfismos funcionales implicados en fenómenos de evasión o tropismo celular y tisular. Tal mecanismo de diversificación de las secuencias se ha visto que opera en los motivos LRR de las proteínas R de las plantas durante su coevolución con los genes de avirulencia de los fitopatógenos (263,281).

Una prueba muy clara de que LIPI-2 puede estar implicada en fenómenos de tropismo es el efecto de su delección parcial en los experimentos de infección en el hospedador natural de *L. ivanovii*. La excisión no sólo produjo un incremento de las dosis letales sino también un cambio en el patrón de localización preferencial de las lesiones, pasando del hígado al músculo cardíaco. Además, disponemos de evidencia experimental de la posible implicación de otro factor codificado en la isla, SmcL, en el tropismo celular. Así, hemos demostrado que la

expresión de *smcL* promueve la proliferación intracelular en células renales de origen bovino MDBK pero no en MDCK, una línea epitelial similar pero cuya especie de origen, el perro, no es naturalmente susceptible a la infección por *L. ivanovii* (196). Otra evidencia la tenemos en el hecho de que SmcL afecta selectivamente a aquellas membranas ricas en esfingomielina. Así, los eritrocitos de oveja, con un gran contenido en este fosfolípido de membrana (51% de los fosfolípidos totales), son altamente sensibles a la lisis por SmcL, mientras que los de caballo, con un bajo contenido en esfingomielina (11%) son refractarios (196). Esta selectividad lítica de SmcL es similar al de la  $\beta$ -toxina (SMasa) de *S. aureus*, para la que se ha establecido un rango de actividad frente a los eritrocitos directamente proporcional al contenido en esfingomielina en la membrana, siendo los de rumiante los más sensibles. Curiosamente, la presencia de  $\beta$ -toxina en *S. aureus* parece estar relacionada con el origen de las cepas, siendo más frecuente en los aislamientos bovinos (549,453). Sobre la base de estas observaciones, es muy tentador establecer un paralelismo entre la presencia de *smcL* en LIPI-2 y el tropismo patogénico de *L. ivanovii* hacia los rumiantes.

Es muy posible, que LIPI-2 juegue realmente un papel importante en las peculiares propiedades patogénicas de *L. ivanovii*, caracterizadas por un marcado tropismo tisular hacia el hígado y una adaptación específica de su infectividad hacia los rumiantes. De hecho, la propia adquisición de LIPI-2 ha podido ejercer una influencia determinante en el desarrollo de la especie *L. ivanovii* tal y como hoy la conocemos, facilitando, por las propiedades de virulencia aportadas y – posiblemente por dar acceso a determinados nichos exclusivos -, su divergencia del tronco genético común de las *Listerias* patógenas. El descubrimiento de LIPI-2 abre el estudio de las bases moleculares de la especificidad patogénica de *L. ivanovii*. Este trabajo de tesis, en el que hemos identificado, secuenciado y caracterizado genéticamente esta PAI de 22 kb, es tan sólo el primer paso en un largo camino que nos queda por recorrer, al final del cual esperamos llegar a descifrar con precisión cuál es el verdadero papel jugado por este locus en la virulencia de *L. ivanovii* y en el proceso patogénico que resulta de la interacción de este microorganismo con los tejidos del hospedador.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS.**

## 4.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y métodos de identificación y caracterización.

Las cepas de *Listeria* utilizadas en este trabajo están recogidas en las tablas 4.1 y 4.2. La tabla 4.1 está después de la bibliografía.

El medio de cultivo utilizado rutinariamente para *Listeria* fue infusión de cerebro y corazón (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI o BHI BioMerieux), al que se añadió agar (BioMerieux) al 1,6% cuando se requirió medio sólido. Los medios de cultivo se suplementaron con eritromicina a la concentración de 5 µg/ml cuando fue necesario (mutantes por transposición (Tn 1545) o cepas de *Listeria* complementadas con los plásmidos pHPS9, pLSV1 y sus recombinantes derivados).

Para la técnicas de clonaje molecular se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (224), MC1061 (77), MOSBlue (Amersham) y Top 10F' One Shot™ (Invitrogen). El medio de cultivo empleado fue LB (Luria-Bertani; 501), suplementado con 50 µg/ml de ampicilina si contenía el plásmido pMOSBlue o pCR®-TOPO; y 300 µg/ml de eritromicina si poseían los vectores pHPS9 o pLSV1. Cuando se utilizaron estos plásmidos, en los medios sólidos se añadieron X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido; Sigma) e IPTG (isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido; Sigma) para facilitar la selección de clones con inserto mediante  $\alpha$ -complementación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, según las recomendaciones habituales (14). Los antibióticos fueron adquiridos de la casa comercial Sigma y se prepararon siguiendo las indicaciones de Sambrook *et al.* (501)).

Las incubaciones se llevaron a cabo generalmente a 37°C y con agitación moderada (150 r.p.m.) en el caso de cultivos líquidos.

La identificación de las cepas de *Listeria* se realizó de acuerdo con los criterios recogidos en el Manual de Bergey (523) o mediante el sistema multisustrato API *Listeria* (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia). Los perfiles de utilización de azúcares se determinaron con el sistema API 50CH (BioMerieux), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La serotipia, fagotipia y análisis de macrorrestricción por electroforesis en campo pulsado fueron realizados en el Centro Internacional de Referencia de *Listeria* (Instituto Pasteur, París, Francia).

## 4.2. Plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizados aparecen en la tabla 4.3. Para detalles sobre la preparación de los plásmidos construidos en este trabajo, véase los apartados 4.15, 4.16 y 4.17.

### 4.3. Medición de actividad hemolítica.

En una aproximación semicuantitativamente se determinaron las actividades de las distintas cepas analizadas sobre placas de agar sangre, observando la extensión de los halos de hemólisis alrededor del crecimiento bacteriano. Se han utilizado placas comerciales de agar sangre Columbia con 5% de sangre de oveja (BioMerieux).

### 4.4. Medición de la actividad lecitinasa (PlcB).

La determinación semicuantitativa de la actividad PlcB de las cepas de *Listeria* se realizó mediante siembra en estrías sobre placas de BHI con yema de huevo y visualización de los halos de opacidad del medio alrededor del crecimiento bacteriano. El medio de yema de huevo se preparó con agar BHI al que se añadió, tras la esterilización en autoclave y una vez enfriado a 50°C, un 10% (v/v) de una emulsión preparada añadiendo una yema de huevo a 100 ml de solución salina estéril.

La titulación de la actividad PlcB en el sobrenadante de cultivo (SC) se realizó según un método turbimétrico ya descrito (182), con algunas modificaciones. Brevemente, se añadieron 200 µl de SC a 1,8 ml de suspensión de lecitina preparada con 1,4 ml de 0,15 M NaCl y 400 µl de solución de lecitina (3,6 g de lecitina (Sigma), 2,4 g de colato sódico, 1mM ZnSO<sub>4</sub>, 0,1 g de azida de sodio para evitar el crecimiento bacteriano durante la incubación, H<sub>2</sub>O destilada hasta 100 ml). La mezcla se incubó durante 18 horas a 37°C y se midió la actividad PlcB a 510 nm en un espectrofotómetro Hitachi 150-20. Una unidad lecitinasa (UPlcB) se definió arbitrariamente como la cantidad de enzima necesaria para determinar un incremento de 0,1 en la absorbancia a esa longitud de onda.

**Tabla 4.2.** Mutantes de *L. ivanovii* ATCC 19119<sup>T</sup>.

Mutante	Descripción	Referencia
44/2	Mutante por inserción de Tn 1545 en locus <i>lyrA</i> y con delección espontánea de 17,5 kb en la región de LIPI-2.	(300)
20/24	Mutante por inserción de Tn 1545 en <i>ilo</i> .	(300)
8/6	Mutante por inserción de Tn 1545 en <i>prfA</i> .	(300,314)
GD-1	Mutante espontáneo débilmente hemolítico por delección de 17,5 kb en región LIPI-2.	Este trabajo
GD-3	Mutante espontáneo débilmente hemolítico por delección de 17,5 kb en región LIPI-2.	(194)

$\Delta lyrA$	Mutante por delección en fase del gen <i>lyrA</i> .	Este trabajo
$\Delta prfA$	Mutante por delección en fase del gen <i>prfA</i> .	(144)
M4	Mutante espontáneo débilmente hemolítico por mutación puntual en <i>prfA</i> .	Este trabajo
IN-1	Mutante espontáneo débilmente hemolítico, defecto genético desconocido.	Este trabajo
NH-1	Mutante espontáneo débilmente hemolítico con delección en <i>prfA</i> , derivado de IN-1.	Este trabajo
$\Delta i-inIE$	Mutante por delección en fase del gen <i>i-inIE</i>	(144)
$\Delta i-inIF$	Mutante por delección en fase del gen <i>i-inIF</i>	(144)
$\Delta i-inIE,F$	Mutante doble por delección en fase de <i>i-inIE</i> e <i>i-inIF</i> ;	(144)
<i>lyrA</i> ::pLDVd	Mutante por inserción de pLDVd en <i>lyrA</i> mediante recombinación homóloga	Este trabajo
( <i>smcL</i> :: $\Omega$ Km)	Mutante de <i>smcL</i> por inserción del interposón $\Omega$ Km2	(195)

**Tabla 4.3.** Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.

	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
<b>pBR322</b>	Vector de clonaje en <i>E. coli</i> de medio número de copias.	(585)
<b>pGM10</b>	pBR322 + fragmento <i>HindIII</i> de 6,7 kb de la región de inserción de Tn 1545 en 44/2.	Este trabajo
<b>pJ14</b>	pBR322 + fragmento <i>HindIII</i> de 2,7 kb de la región <i>lyrA</i> de ATCC 19119 <sup>T</sup> .	Este trabajo
<b>pUCTn1545</b>	pUC18 + extremo izquierdo de Tn 1545 (gen <i>aphA-3</i> de resistencia a kanamicina)	Este trabajo
<b>pMOSBlue</b>	Vector para el clonaje directo de productos de PCR	Amersham
<b>pCR®-TOPO</b>	Vector para el clonaje directo de productos de PCR	Invitrogen
<b>pHPS9</b>	Vector bifuncional <i>E.coli/Bacillus-Listeria</i>	(223)
<b>pLSV1</b>	Vector bifuncional <i>E.coli/Listeria</i> termosensible )derivado de pET154-Ts) para recambio alélico en <i>Listeria</i> .	(599)

<b>pKK3535</b>	PBR322 + operón <i>rrnB</i> de <i>E. coli</i> .	(61)
<b>pBDVd</b>	pMOSBlue + fragmento DVd de <i>lyrA</i> .	Este trabajo
<b>pBlyrA</b>	pMOSBlue + <i>lyrA</i> de ATCC 19119 <sup>T</sup> .	
<b>pBorfD1-lyrA</b>	pMOSBlue+ <i>orfD1-lyrA</i> de ATCC 19119 <sup>T</sup> .	Este trabajo
<b>pLDVd</b>	pLSV1 + fragmento DVd de <i>lyrA</i> .	Este trabajo
<b>pHlyrA</b>	pHPS9 + <i>lyrA</i> de ATCC 19119 <sup>T</sup>	Este trabajo
<b>pHorfD1-lyrA</b>	pHPS9 + <i>orfD1-lyrA</i> de ATCC 19119 <sup>T</sup> .	Este trabajo
<b>pBprfA</b>	pMOSBlue + <i>prfA</i> de ATCC 19119 <sup>T</sup> .	Este trabajo
<b>pBM4</b>	pMOSBlue + <i>prfAM4</i> .	Este trabajo
<b>pBNH-1</b>	pMOSBlue + <i>prfANH-1</i> .	Este trabajo
<b>pHprfA</b>	pHPS9 + <i>prfA</i> de ATCC 19119 <sup>T</sup> .	Este trabajo
<b>pHM4</b>	pHPS9 + <i>prfAM4</i> .	Este trabajo
<b>pHNH-1</b>	pHPS9 + <i>prfANH-1</i> .	Este trabajo

**Tabla 4.4.** Oligonucleótidos diseñados y empleados en este trabajo.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>	<b>Orientación</b>	<b>Localización</b>
<b>GD-3</b>	GTCGTATCAAAGCTCATTTCAT	Reverse	Tn1545
<b>GD-4</b>	CTGTGAAAATGATTCACAGCT	Reverse	dwst. <i>orfU1</i>
<b>GD-5</b>	AAGCTTCTAACTCATTGGAAG	Forward	<i>orfU1</i>
<b>GD-7</b>	GACGATGAGCGCATTGTTAGA	Reverse	pBR322
<b>GD-8</b>	TGTAAGAAACGACTTATC	Forward	dwst. <i>orfU1</i>
<b>GD-9</b>	TGATATTTGCTATTGTCCG	Reverse	<i>orfU1</i>
<b>GD-10</b>	CACGTACAGCTTGGAATAAT	Forward	<i>orfD1</i>
<b>GD-12</b>	TGCATCTGTTATCATTGCCG	Reverse	<i>orfD1</i>
<b>GD-13</b>	TGTTATCGATAATGAGTTC	Forward	<i>orfD1</i>
<b>GD-14</b>	CCGCTAAACAGACAAGTA	Reverse	<i>lyrA</i>
<b>GD-15</b>	AAGACACGAGGAAGCCAC	Reverse	<i>lyrA</i>
<b>GD-16</b>	GAATTGCTTGTGCTAGT	Forward	<i>lyrA</i>
<b>GD-17</b>	TGTACAGTTTCGAAGTGATTC	Forward	<i>lyrA</i>
<b>GD-19</b>	TGGCATCGTTCCGCGAAATTC	Forward	<i>lyrA</i>
<b>GD-21</b>	CAGACGAACAGACCTTTTGTA	Forward	<i>lyrA</i>
<b>GD-22</b>	TTGACGTATGAACAATCGCTT	Forward	<i>lyrA</i>
<b>GD-23</b>	GCCATAGCTATTCACCTGTCA	Reverse	<i>lyrA</i>
<b>GD-24</b>	AGTTTCTCGGCTAAGAATGGA	Reverse	<i>lyrA</i>
<b>GD-25</b>	CCATTCTTAGCCGAGAAACTA	Forward	<i>lyrA</i>
<b>GD-26</b>	GATTGTTGAACCATTACTTGA	Forward	<i>dapD</i>
<b>GD-27</b>	TCAAGTAATGGTTCAACAATC	Reverse	<i>dapD</i>
<b>GD-28</b>	CAAGGGTTCTGGAAATATTCA	Reverse	upst. <i>orfU1</i>

GD-29	TGAATATTTCCAGAACCCTTG	Forward	upst. <i>orfU1</i>
GD-30	TCAGTTAGAGATGATTGGTTG	Forward	upst. <i>orfU2</i>
GD-31	CAACCAATCATCTCTAACTGA	Reverse	upst. <i>orfU2</i>
GD-32	TCAGTACTTGCTGGTGTAGTA	Forward	<i>dapD</i>
GD-33	TACTACACCAGCAAGTACTGA	Reverse	<i>dapD</i>
GD-34	CATTCTTTGTAACCTGTTTCT	Reverse	<i>hipA</i>
GD-35	AGTGGTAAAGTAATCCAGCCA	Reverse	dwst. <i>amaA</i>
GD-36	TAAGGAGTGAAGCGGCAGTGAGA	Forward	dwst. <i>amaA</i>
GD-37	CGATTGCGCCGCGAGTTGCAT	Forward	<i>hipA</i>
GD-38	GCACTTGCGTATTAACATCAT	Forward	<i>hipA</i>
GD-39	TGATGAAGTTATTTTACCTGA	Reverse	<i>amaA</i>
GD-40	GTTCTCGAAGCATAGGAGCGA	Forward	<i>amaA</i>
GD-41	GATATGGTAGTGGCAGCAAGT	Forward	<i>hipA</i>
GD-42	ACTCCGTTCAACGTGACTTGT	Reverse	dwst <i>hipA</i>
GD-43	CGTAAACTGCCAGATGAGAT	Reverse	<i>amaA</i>
GD-44	GCTGACTTTGCCGGTACATAA	Reverse	<i>hipA</i>
GD-45	CTAGCATAAGCCCTGGTAACT	Reverse	<i>orfU4</i>
GD-46	TATTGCGATTGTCGTTATGTA	Forward	upst. <i>orfU4</i>
GD-47	TCTCCTTGTAATAATGCTACTA	Reverse	<i>orfU4</i>
GD-48	GGTAGTAGTGCTATTTTACAA	Forward	<i>orfU4</i>
GD-49	TTACCAGGGCTTATGCTAGCT	Forward	<i>orfU4</i>
GD-50	GGTGCAAGCAGAAAACCAATT	Forward	<i>amaA</i>
GD-51	TGGCGAATTGGTTTTCTGCTT	Reverse	<i>amaA</i>
GD-52	GATCAGGTAAAATAACTTCAT	Forward	<i>amaA</i>
GD-53	GTTATGTACCGGCAAAGTCA	Forward	<i>hipA</i>
GD-53B	TGGATGCGATTATGTCTGAGT	Forward	upst. <i>orfU4</i>
GD-54	CACTTGCTGCCACTACCATAT	Reverse	<i>hipA</i>
GD-55	GAGTTAATACGCCAAGTGCA	Reverse	<i>hipA</i>
PI-1	GCTCTCTCATTTATCCAACT	Forward	<i>i-inIG</i>
PI-2	AGTTTATTTTTACTTATAGAT	Reverse	<i>i-inIG</i>
PI-3	CAACCTCAATAGCCAAGTA	Forward	<i>i-inIG</i>
PI-4	GTGTCTTTAAATATAGCGGTT	Reverse	<i>i-inIG</i>
PI-5	TCTGACCCAACATCCGTA	Reverse	<i>i-inIG</i>
PI-6	TGAATCTCACGCTGTAAGTAT	Forward	<i>i-inIG</i>
PI-7	CAGTTGGAACATGTTGAAGCT	Forward	upst. <i>i-inIG</i>
PI-8	CAACAAAAGTTAATACTTCCAC	Reverse	upst. <i>i-inIG</i>
PI-9	CACTGCTCAATTAGTTCGCTT	Forward	<i>i-inIG</i>
PI-10	TTCTGTTAGACTTGCTGCTGG	Reverse	<i>i-inIH</i>
PI-11	AGGCAGTTACGGATATTAGTC	Forward	dwst. <i>i-inIH</i>
PI-12	AACAACCTTTCTAATTTAGTG	Reverse	<i>i-inII</i>
PIQ-12	CTTAGTTCCGTTAAATCCTTC	Reverse	<i>i-inII</i>
PIQ-13	ATGTTACTTATCAAAAAGATAG	Forward	<i>i-inII</i>
PI-14	ATAAAAAGAGGAGTGTAATCG	Forward	upst. <i>i-inIH</i>
PI-15	GTGAAACAACCTCTGTAACAC	Reverse	<i>i-inIH</i>
PI-16	TGAACCCATATGCTATCAGCC	Forward	<i>i-inIJ</i>
PI-17	TCCATTGCATCTAAAGTTTCC	Reverse	<i>i-inIJ</i>
PI-18	GCGATGACGGCTTTATTGTAG	Reverse	<i>i-inIB</i>
PI-19	CACCCATGGTATGGTCCACCC	Forward	<i>i-inIB</i>
PI-20	TGGAGGCAACAATGGTATCGG	Forward	dwst. <i>i-inIB</i>
PI-21	CTATATCTCTTTAACATCTTC	Reverse	upst. <i>i-inIJ</i>
PI-22	TGTGGCGTGTGTTGAACACAAG	Forward	<i>i-inIJ</i>
PI-23	CGGACTAAGATCGCTTATTTG	Reverse	<i>i-inIG</i>
PI-24a	GATTGGACCACACCATTACTG	Reverse	<i>i-inIB</i>
PI-25a	GCCATAGGATCTTTGTCACGC	Forward	<i>i-inIB</i>
PI-26	CAGATAAGAGCGTTAGTGAC	Forward	<i>i-inIJ</i>
PI-30	ACTTTATCATAGTGCTCGGTG	Reverse	<i>i-inIB</i>
PI-31	CGTATTGCTGGCTACAAAGTG	Forward	<i>i-inIB</i>
PI-32	AGGAACACTTTTCAAGTTTATGC	Forward	<i>i-inIB</i>
PI-33	GTCTTTTGTCTATAAGGGTG	Reverse	<i>i-inIB</i>
PI-35	GTGGTAAAGTAATCCAGCCAC	Forward	<i>i-inIB</i>
PI-36	TAAGGAGTGAAGCGCAGTGAG	Forward	upst. <i>i-inII</i>
PI-37	GGATTAATAATCTTGACGAG	Forward	<i>i-inIB</i>
PI-38	ACGATAACAATTACGGTCTAGC	Reverse	<i>i-inIB</i>
PI-39	TAATGCTGCGATATTAGTTAC	Reverse	<i>i-inIB</i>
PI-40	AGATATAAGTGTATTAGAGAC	Forward	<i>i-inIB</i>
PI-43	TTGATAATGTCTCTGCGATA	Reverse	<i>i-inIB</i>
PI-44	TGACGCACTCGCACATTTATCC	Forward	<i>i-inIK</i>

PI-45	GCATTACCTCTTTCAACTCTC	Reverse	<i>i-inlK</i>
PI-46	AATGTGTAACGAACCAGCGG	Forward	<i>i-inlK</i>
PI-47	TCACATCTATGGAAGGAGTGC	Forward	<i>i-inlL</i>
PI-48	GTGTTGTTTCACTACTATGCG	Reverse	<i>i-inlL</i>
PI-49	CTTCATCTAGCTCTCTTTGCG	Reverse	<i>i-inlK</i>
PI-50	AATCAAAGGAGCTGGCTGGAC	Forward	<i>i-inlB2</i>
PI-51	GGAGCTTCCCACGACTAATGG	Reverse	<i>i-inlB2</i>
PI-52	TATACACGCTTGTGCAAATAC	Reverse	upst. <i>i-inlK</i>
PI-54	TCTCACTTGGTAGTATAAGCC	Reverse	<i>i-inlB2</i>
PI-56	TTGAGCTTCTACCCAACCAA	Reverse	<i>i-inlB2</i>
PI-57	CCAGATTAATGGACTTATATCC	Reverse	<i>i-inlB2</i>
PI-58	TTCAAGTGAATGTAACATTCC	Forward	<i>i-inlB2</i>
PI-59	GGAAGGTAGGTTAGCAAATAA	Forward	upst. <i>i-inlL</i>
PI-60	TTATTTGCTAACCTACCTTCC	Reverse	upst. <i>i-inlL</i>
PI-61	CCAGTTGTATATCAACCAAAC	Forward	<i>i-inlL</i>
PI-62	GTTTGTTGATATACAACCTGG	Reverse	<i>i-inlL</i>
PI-63	AAACATATAAGTTACTTCTGATG	Reverse	dwst. <i>i-inlL</i>
PI-64	ACCACTCGATACGATGATGTT	Forward	dwst. <i>i-inlL</i>
PI-65	TCGCTCTCGTTCAATGACGA	Forward	upst. <i>i-inlK</i>
PI-66	CCGTATCCAATGCCAATTAGT	Forward	<i>i-inlK</i>
PI-67	GCTAACGATAAGTCATTCCAA	Forward	upst. <i>i-inlB</i>
PI-68	TTGGAATGACTTATCGTTAGC	Reverse	upst. <i>i-inlB</i>
PI-69	AAGGGCTGCAAGTATTTCCG		
PI-70	CAGTGCATTAGCTAATTTGTC	Forward	<i>i-inlB</i>
PI-71	GTCACTACTAGAATTTGGTGC	Reverse	<i>i-inlB2</i>
PI-72	ATTTATCAAGTTTACTTAAACTC	Forward	<i>i-inlB2</i>
PI-73	GATTAGTTGATTGTTATTCATTA	Reverse	<i>i-inlB2</i>
PI-74	AAGTTCGACAAGTGCTGCAG	Reverse	<i>i-inlB2</i>
PI-75	TATCATCAAGCATATCCACGC	Reverse	<i>ysnB</i>
PI-76	ATTATCTTAAATCCTGGCAGC	Forward	<i>ysnB</i>
PI-77	CAGATACGAAGTTAGCAGAAG	Forward	<i>i-inlB2</i>
PI-78	TAAACCTATGACTGGCTATGC	Forward	<i>i-inlB2</i>
PI-79	TTGGTGGCGGATTTCCAAATG	Forward	<i>ysnB</i>
PI-80	GTGGGTATATGCTCACAACGC	Forward	upst. <i>i-inlB2</i>
PI-81	CAAACCGAAAATGTGCAAGCTG	Reverse	<i>ydel</i>
PI-82	TTCATGGACCGAGATGACAACG	Forward	<i>ysnB</i>
PI-83	GCAAAATAAAGTAAGTAAGCT	Forward	<i>ydel</i>
24A	TAACACCATTATATGGTTTGA	Forward	<i>i-inlE</i>
24B	CATACCAGTAAATGTGGTACT	Reverse	<i>i-inlE</i>
24C	TATAAATTCTCGTCATTAACA	Reverse	upst. <i>i-inlE</i>
24D	CACACCATTAAATACGACTCT	Reverse	<i>i-inlF</i>
24E	GTTAAATTAGCAAGGGCATCA	Reverse	<i>i-inlF</i>
24F	TTGATGCCCTTGCTAATTTAA	Forward	<i>i-inlF</i>
24G	TTAGATTCTCTAATCTTGCTAAT	Reverse	<i>i-inlF</i>
24H	AAGTATCGCTAAATTAGTTA	Reverse	<i>i-inlF</i>
24I	CTTTGTTTCCAACTCCATGT	Reverse	<i>i-inlF</i>
24J	CAAGCAGCTAATATTTCCAACA	Forward	<i>i-inlF</i>
24L	CGCACTATTATATCTATTGAT	Forward	<i>i-inlF</i>
24R	TGGTGTCTAATTTATGTAA	Forward	upst. <i>i-inlF</i>
24M	GCTTGATTTGGCTAATCAGAA	Forward	<i>i-inlF</i>
24-O	GATACTCATCACTAGCTTGTG	Forward	<i>smcL</i>
24-P	CATGTACCTTTGTTCCAGAAC	Reverse	<i>i-inlE</i>
PE-1	CAGCAGAAATCATCGAATCAG	Reverse	ORF1
PE-3	ACGCTGCCGATAAAGCTGG	Reverse	<i>ilyrA</i>
ED-1	AATACATGATGGATTTGCCCC	Forward	<i>orf9</i>
ED-2	ATTATTGCAGGTTTGATTGCC	Reverse	<i>orf9</i>
ED-3	CATATAAATGAAAATACAGGA	Forward	<i>orf9</i>
ED-4	TCGAATTGGGATTGGTTATC	Reverse	<i>orf9</i>
ED-5	AAGGTTGCTGGCATGAAAAG	Forward	dwst. <i>rnaH</i>
ED-6	TCAGGTGGACTGATTGGCTTG	Reverse	<i>orf9</i>
ED-7	GAAGTCGCAGTGCTTAAAAC	Forward	<i>orf9</i>
ED-8	CCCAATAAAAAGGACCAATAGC	Forward	<i>orf9</i>
ED-9	TTGGTTGTCTTCTATTTCCAC	Reverse	<i>orf10</i>
ED-10	TACGGCGATAATAACCATCAG	Forward	<i>orf9</i>
ED-11	TACTTGGTCTTAATAATTCCC	Reverse	<i>orf10</i>
ED-12	TATCGGGACTTTACTTGCCAG	Reverse	<i>orf9</i>
M495	TGAAGCAATCGTACGTGTAC	Forward	dwst. <i>prfA</i>

PrfA-1	CATTTCAACTAGAAATAATA	Reverse	upst. <i>prfA</i>
MPHE	ATTAAGTTGGGTAACGCCAG	Reverse	pHPS9
m-1	AGCGATGGTTCACCAAGCAAG	Forward	2302.1
m-2	AGAACCAACGCTCTCTTACAG	Reverse	2302.1
EFseq1	GGTTATTTTTTCATATAGAAGTC	Reverse	dwst. <i>orf3</i>
Efseq2	CGAGTAGAGGATAGTATGCC	Forward	upst. <i>orf3</i>
EFseq3	CTTCCTAGTTACTATAAAAAATAG	Forward	upst. <i>orf3</i>
EFdown2	AAGCTTTAACGCCTGGACGTCACCG	Reverse	dwst. <i>orf3</i>
Lim3	TCTCCTTCTGGTGTAAAGCAGT	Reverse	<i>lyrA</i>
Lim4	ACATTACGAATTGCTTGTGCA	Forward	<i>lyrA</i>
Lim5	CAATCGTTATATTCATTTGCA	Forward	<i>orfD1</i>
Lim6	TGTAGCCTATCATCGTCACTT	Reverse	<i>lyrA</i>
Lim7	TTAGATATCAACTCGCTGCTGGAA	Forward	<i>lyrA</i>
Lim8	CCAGATATCAGTGAAATTTGCACA	Reverse	<i>lyrA</i>
Lim9	AGCCGGGAAACCAACTTGCT	Forward	<i>lyrA</i>
Lim10	AAGCGGATCCATCGTTATATTCAT	Forward	<i>orfD1</i>
Lim11	GATGTGAATTCATTTGTTCCATGA	Reverse	<i>dapD</i>
Lim11a	GAAAGAATTCGGTGTGCATCCATTTGT	Reverse	<i>dapD</i>
Lim12A	AGTGTGCCCGGTTCAATGACACTA	Reverse	<i>lyrA</i>
Lim13A	CAAGACCCCGGGCAACGAAATTC	Forward	<i>lyrA</i>
Lim14	CGTCTTGTTACTATCCCTTCA	Reverse	<i>orfD1</i>
Lim15	GCAAGAAGATGAGTCTGCTGA	Forward	<i>orfD1</i>
Lim16	CGATAACATAATCTTCAATAT	Reverse	<i>dapD</i>
Liv12a	TTCTCGCCCGGGAACACTTGAAGCA	Reverse	<i>lyrA</i>
Liv17	CATATCCCGGGACAATCATCTATTTTCT	Reverse	<i>lyrA</i>
Liv18	CTTCACGGATCCATAAGTGCCGCAAT	Forward	<i>orfD1</i>
Liv19	TAAATTCCCGGGACAAGTGAAATAGCT	Forward	<i>lyrA</i>
Liv20	CAGCACCGAATTCAATTCTAGCATTGA	Reverse	<i>dapD</i>
MD-2	CCAGAATTCTCGCAGCGTTTGCAA	Forward	<i>lyrA</i>
MD-3	TCGCGGATCCAACCTGTTACAAGCGA	Reverse	<i>lyrA</i>
T-7	TAATACGACTCACTATAGGG	Reverse	pMOSBlue
U-19	CAAAAGGGTCA GTGCTGCA	Forward	pMOSBlue
M13Forward	GTAACGACGGCCAG		pCR <sup>®</sup> -TOPO
M13Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC		pCR <sup>®</sup> -TOPO
YS-1	ATGATTCATTGCGGGGA	Forward	<i>ysnB</i>
YS-2	ATGCTTCCTGGGTT	Reverse	<i>ysnB</i>
YS-3	TTTCCAAATGATTGGGT	Forward	<i>ysnB</i>
YS-4	TTCGTTGTCATCTCGGTCCATG	Reverse	<i>ysnB</i>

Los nucleótidos subrayados indican dianas de enzimas de restricción. Las letras minúsculas señalan los desemparejamientos introducidos en el oligonucleótido con respecto a la secuencia cromosómica. dwst. y upst. hacen referencia a la posición en región intergénica 3' o 5' respecto de los genes que se señalan a continuación.

La designación Lim se ha empleado para los cebadores diseñados a partir de los alelos de *L. monocytogenes*.

## 4.5. Medición de la actividad esfingomielinasa.

La actividad esfingomielinasa se determinó en los SC obtenidos al inicio de la fase estacionaria mediante un análogo cromogénico de la esfingomielina *N*- $\omega$ -trinitrophenylaminolaurylsphingosylphosphoryl choline (TNPAL-sphingomyelin; Sigma), siguiendo el método descrito por Gatt *et al.* (176). Una unidad de esfingomielinasa se definió arbitrariamente como la cantidad de enzima necesaria para provocar un incremento de 0,01 en la absorbancia medida a una longitud de onda de 330nm tras una de incubación de 2 h a 37°C.

## 4.6. Prueba de utilización de G-1-P.

Para medir la capacidad de utilización de G-1-P se utilizó medio base de azúcares con indicador de pH rojo de fenol (Biomérieux), ajustado a pH 8 con NaOH. Una vez autoclavado el medio se añadió el azúcar en forma de solución esterilizada por filtración, a través de membrana con 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, a una concentración final 10 mM. El medio suplementado se inoculó en proporción 1:200, con precultivos de 18 horas en BHI. Los precultivos se lavaron con medio base para retirar los posibles restos de BHI portadores de otros azúcares fermentables. La medición de la utilización de azúcares se llevó a cabo observando el color del medio a lo largo del tiempo y dando como positivo un resultado cuando éste viraba a amarillo vivo. Todas las mediciones se repitieron al menos 3 veces.

## 4.7. Extracción de DNA cromosómico y *Southern blot*.

Para la extracción de DNA cromosómico de *Listeria* se empleó el método del CTAB (14). Para ello se utilizaron cultivos de 18 horas en BHI, que fueron diluidos 1:2 en medio fresco con glicina (Sigma) (5% (p/v) concentración final), y posteriormente incubados durante 1 hora a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación y, tras un lavado con 1:5 del volumen de partida en tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8), se resuspendieron en un volumen igual de TE con sacarosa al 7% (Panreac) y lisozima (Sigma) a una concentración final de 3,5 mg/ml, incubándose la mezcla a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Finalizada esta incubación se añadieron EDTA (40 mM concentración final), dodecil sulfato sódico (SDS; 1% concentración final) y proteinasa K (0,1 mg/ml concentración final; Sigma), prolongándose la incubación durante otros 30 minutos. A continuación se añadieron NaCl, hasta una concentración final de 0,7 M, y solución CTAB (CTAB al 10% en 0,7 M NaCl) en proporción 1:9, incubándose la mezcla a 65°C durante 20 minutos, tras lo cual se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo. El DNA cromosómico se recuperó de la fase acuosa por precipitación con 0,7 volúmenes de isopropanol, y se lavó después en etanol al 70%, resuspendiéndolo finalmente en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

Para el análisis por *Southern blot*, los DNAs extraídos fueron digeridos con distintas enzimas de restricción, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 18 horas y posteriormente se transfirieron a membranas de Nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) con la ayuda de un aparato de vacío (Vacuum Blotter; BioRad) a una presión de -5 mm Hg. Para ello, se trató el gel con solución de fragmentación (0,25 M HCl) durante 10 minutos, se secó con papeles de filtro y se cubrió con solución de desnaturalización (0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl), dejando transcurrir 15 minutos antes de retirar dicha solución con ayuda de papeles de filtro; a continuación se trató durante otros 10 minutos con solución de neutralización (1,5 M NaCl + 0,5 M Tris HCl a pH 7,2 + 0,001 M EDTA), y finalmente se mantuvo durante 90 minutos cubierto con SSC 20 $\times$  (SSC 1 $\times$  es: 0,15M cloruro sódico, 0,015 M citrato sódico, pH 7,0). El DNA transferido se fijó a la membrana por radiación UV con un Cross-linker (Spectronics Corporation).

#### **4.8. Extracción de RNA total y análisis de transcripción (*Slot blot*, *Northern blot* y *primer extension* (PE)).**

Las extracciones de RNA total se realizaron siguiendo el método del fenol caliente descrito por Oelmüller *et al.* (416), con ligeras modificaciones. Las células bacterianas de un cultivo de 100 ml se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 2 ml de tampón AE (20 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, pH 5,5) conteniendo lisozima (Sigma) a una concentración final de 10 mg/ml y se incubaron durante 15 minutos a la misma temperatura utilizada para el cultivo. A continuación se añadieron otros 4 ml de tampón AE y 225 µl de SDS al 25%, realizando seguidamente una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) a 65°C durante 20 minutos. La mezcla se agitó cada 2 minutos a lo largo del tiempo de incubación y se enfrió en hielo durante 10 minutos antes de centrifugar. Tras añadir a la fase acuosa 1 ml de 2 M acetato sódico, pH 5, se realizó otra extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en frío y una tercera sólo con cloroformo. El RNA se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H<sub>2</sub>O. Para eliminar la posible contaminación con DNA cromosómico, todas las muestras se trataron con DNAsa libre de RNAsas (Boehringer Mannheim). Para inactivar la DNAsa se realizó una nueva extracción fenol-cloroformo, resuspendiéndolo finalmente en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. El RNA se conservó a -70°C.

La cantidad de RNA total se cuantificó finalmente por espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda, calculando la concentración del mismo mediante la relación  $1 \text{ DO}_{260} = 40 \text{ µg/ml}$ .

Para la técnica de *Slot blot*, se mezclaron 5 µg de RNA total con 3 volúmenes de tampón de desnaturalización (MOPS 1×(ácido 3-morfolino-propanosulfónico), 50% formamida, 2,2 M formaldehído (MOPS 1× es 0,4 M MOPS, 10 mM acetato sódico, 1 mM EDTA)). Estas mezclas se incubaron a 65°C durante 5 minutos en un bloque seco (Techne), introduciéndolas inmediatamente después en hielo. A cada muestra se añadieron 600 µl de SSC 10×. Las muestras así tratadas se transfirieron a membranas de Nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim), previamente embebidas en SSC 10×, mediante un aparato de microfiltración por vacío (Bio-Dot; Bio-Rad) ajustado a una presión de -5 mm Hg; durante el proceso. Una vez filtradas todas las muestras se lavaron 2-3 veces con SSC 10× antes de secar las membranas y fijar los RNAs por radiación UV.

La cantidad real de RNA presente en los *blots* se determinó mediante hibridación con el plásmido pKK3535, que contiene el operón *rmb* ribosomal de *E. coli* (61).

Para el análisis por *Northern blot* de los RNAs totales extraídos se han seguido exactamente los protocolos descritos en Sambrook *et al.* (501). Se precipitaron 10 µg de cada muestra a analizar, a continuación se resuspendieron en tampón desnaturalizante y fueron incubadas a 70° C durante 5 minutos. Posteriormente, se sometieron a una electroforesis en gel desnaturalizante con 1% de agarosa y 2,2 M de formaldehído. El RNA se transfirió a membranas de Nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) mediante capilaridad en SSC 10× (501). Por último, las muestras siguieron un proceso de fijación análogo al descrito en el apartado anterior para *Southern Blots*.

Los experimentos de PE se iniciaron con el marcaje mediante [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-dATP (14) del extremo 5' de 100 ng de los oligonucleótidos PE-1 y PE-3 (véase tabla 4.4). Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados mediante una columna NucTrap push (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos marcados con 5000.000 c.p.m. fueron añadidos a 70  $\mu$ g de RNA total. Los ácidos nucleicos fueron precipitados y resuspendidos en 30  $\mu$ l de tampón de hibridación (40 mM PIPES (pH 6,4), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA en 80% de formamida). A continuación, tras someter a las muestras a 70°C durante 5 minutos, se incubaron a 30°C (16 horas), se precipitaron y resuspendieron en 25  $\mu$ l de RT-buffer: (50 mM Tris-HCl (pH8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 5 mM KCl, 0,6 mM dNTPs, 1  $\mu$ l de RNAsin (Promega) por muestra). Se añadieron a cada muestra cuarenta unidades de Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (Stratagene). Tras un periodo de incubación de 90 minutos a 42°C, la reacción se detuvo mediante EDTA (20 mM de concentración final). Por último, el RNA de las muestras fue digerido con ribonucleasa pancreática que posteriormente se inactivó mediante una extracción fenol-cloroformo (1:1), se precipitó y resuspendió en 3  $\mu$ l de TE que se mezcló con 4  $\mu$ l de solución de formamida marcada con azul de bromofenol. Una alícuota de 4  $\mu$ l de cada muestra fue desnaturalizada por calor a 95°C durante 3 minutos y cargada para someterse a una electroforesis en gel de secuenciación de 6% de poli(acrilamida-urea). Para determinar el nucleótido exacto del inicio de la transcripción se migró en el mismo gel de forma paralela la reacción de secuenciación del fragmento de DNA correspondiente a la región estudiada con el mismo oligonucleótido empleado para el PE mediante el Kit comercial T7 sequencing (Pharmacia).

Con el fin de eliminar las posibles RNAsas presentes en los distintos materiales y reactivos utilizados se tuvieron las siguientes precauciones: todo el material de vidrio se esterilizó en horno Pasteur a 180°C durante 18 horas o más; el material de plástico se autoclavó dos veces a 121°C durante 20 minutos; el H<sub>2</sub>O así como todas las soluciones empleadas se trataron con 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma) durante 12 horas, procediendo posteriormente a la inactivación de este compuesto mediante autoclavado; las soluciones que contenían tampón Tris, que se desnaturaliza en presencia de DEPC, se prepararon con H<sub>2</sub>O previamente tratada con este agente; todas las manipulaciones se realizaron con guantes.

#### **4.9. Sondas de DNA e hibridación de ácidos nucleicos.**

Las mayoría de las sondas utilizadas fueron fragmentos intragénicos obtenidos por PCR con oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias previamente conocidas. Los productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 0,8% mediante el sistema comercial Qiaquick™ Gel Extraction (Qiagen). También se utilizaron como sondas los plásmidos pKK3535, pGM10 y pUC18::*aphA*-3 (véase tabla 4.3), que fueron extraídos y purificados como se detalla en el apartado 4. 19. Las sondas se marcaron con  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP (Amersham) por el sistema comercial Nick Translation (Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se han empleado condiciones de hibridación de alta y baja astringencia. Todas las hibridaciones se realizaron en un horno Hybridiser HB-ID, de Techne a 42°C en formamida al 50% en alta astringencia o a 37°C con 30% de formamida a baja astringencia. Las membranas se saturaron previamente a la misma temperatura de hibridación durante al menos 30 minutos en una solución de prehibridación que contenía 50% (30%) formamida desionizada, SSC 5×, solución de Denhardt 5×, 50 mM tampón sodio-fosfato (pH 6,8), 0,1% SDS, y 20 mg de DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado por calor. La hibridación se realizó con una solución que contenía 50%(30%) formamida, SSC 5×, solución de Denhardt 2×, 20 mM tampón sodio-fosfato (pH 6,8), 0,2% SDS, 20 mg de DNA de esperma de salmón, y la sonda marcada y desnaturalizada por calor (100°C durante 5 minutos). La incubación se llevó a cabo durante toda la noche. A continuación se realizaron para condiciones de alta astringencia, dos lavados a temperatura ambiente de 5 minutos con (SSC 2× + 0,1% SDS) y dos lavados a 65°C durante 30 minutos (SSC 0,1× + 0,1% SDS). Cuando se requirieron condiciones de baja astringencia se emplearon dos lavados de 30 minutos a 37°C con (SSC 2× + 0,1% SDS) seguidos de un lavado durante 30 minutos a 42°C con (SSC 1× + 0,1% SDS). En ambos casos se enjuagaron las membranas con SSC 2× para eliminar restos de SDS y, sin permitir que se secaran totalmente, se procedió a realizar las autorradiografías.

Para la reutilización de los *blots*, las membranas se deshibridaron en H<sub>2</sub>O bidestilada a 100°C durante 10 minutos en horno de hibridación, evitando su desecación. La eficacia de la deshibridación se comprobó cada vez, mediante autorradiografía de las membranas, antes de proceder a una nueva hibridación. Cada membrana se reutilizó 3 ó 4 veces como máximo.

#### **4.10. Hibridación de colonias.**

Para realizar hibridaciones de las colonias de *E. coli* DH5α seguimos el protocolo de lisis alcalina descrito (14), con pequeñas modificaciones. Brevemente, las colonias bacterianas se transfirieron a una membrana de Nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) y, a continuación, se sometieron a una lisis alcalina y desnaturalización del DNA. Seguidamente, el DNA fue fijado mediante UV como se ha descrito en el apartado 4.7. Se emplearon sondas marcadas con digoxigenina 11-dUTP (DIG) utilizando el Kit DIG-High Prime de marcaje de DNA al azar (Boehringer Mannheim) siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. Las hibridaciones se realizaron a alta astringencia utilizando las mismas condiciones descritas en el apartado 4.9 y empleando el buffer de hibridación DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim). Las señales de hibridación positiva se revelaron mediante el Kit para detección colorimétrica de ácidos nucleicos marcados con DIG siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

#### **4.11. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.**

En las amplificaciones realizadas para la comprobación de clones y la obtención de sondas para hibridación, se utilizaron las DNA polimerasas Biotaq (Ecogen), DyNa (Biolabs, New

England), y BioTaq (Biotools). Cuando fueron amplificados fragmentos de DNA por PCR para analizar posibles mutaciones o, para su posterior clonaje con fines de complementación o construcción de mutantes, se utilizó la DNA polimerasa Expand™ High Fidelity PCR (Boehringer Mannheim) según las instrucciones del fabricante. Se eligió esta enzima porque tiene la propiedad de introducir un mínimo número de errores durante la elongación de las cadenas de DNA.

Las PCRs se realizaron en los termocicladores PTC-100 y MiniCycler (M.J. Research, Inc.); y Mastercycler gradient (Eppendorf). Se procedió a una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C; seguida de 30 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización a 94°C durante 30-60 segundos (s), hibridación durante 30-60 s a una temperatura calculada en función de los oligonucleótidos utilizados (generalmente 5°C por debajo de la temperatura de desnaturalización más baja; sin embargo, si las temperaturas de ambos oligonucleótidos diferían en más de 5°C se introdujo la variación de ajustar durante 30 s la temperatura de hibridación con la del oligonucleótido que la presentaba más elevada y los últimos 30 s con el de temperatura de hibridación más baja), y elongación a 72°C (excepto cuando se amplificaban fragmentos de gran tamaño que se realizó a 68°C) durante 30 s a 4 minutos dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar. Finalmente se realizó una elongación final 10 minutos a 72°C (o a 68°C si los fragmentos a amplificar eran de tamaño superior a 2,5 kb). Las unidades de DNAs polimerasas empleadas variaron dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y las recomendaciones de las casas fabricantes.

#### **4.12. Paseo cromosómico (*Genome walking*) mediante PCR inversa.**

Esta técnica fue empleada para extender las secuencias terminales de fragmentos conocidos (*genome walking*). Para ello, aproximadamente 10 µg de DNA cromosómico extraído como se describe en el apartado 4.7 fue digerido con diferentes enzimas de restricción en un volumen final de 50 µl durante 12 horas con las cantidades y en las condiciones descritas por el fabricante. A continuación, se comprobó la eficiencia de la digestión analizando 2 µl de la muestra mediante electroforesis en geles de agarosa. Seguidamente, la enzima fue inactivada mediante una extracción fenol:cloroformo. El DNA digerido fue precipitado, y religado. Para ello, se resuspendió en 100 µl de 1x buffer de ligación con 30 unidades de T4 DNA ligasa (Amersham) manteniéndose durante 24-48 horas a 16°C. Finalmente la mezcla de ligación fue nuevamente precipitada y resuspendida en 30 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Por último, fueron empleados 2 µl como molde para las distintas reacciones de PCR, el resto fue conservado a -20°C y reutilizado en sucesivas ocasiones. Se empleó un panel de enzimas de restricción con diferente frecuencia de corte en el genoma de *Listeria*: *TaqI*, *RsaI*, y *DraI* como representantes de corte frecuente y *HindIII*, *HhaI*, *XbaI*, *HphI*, *HincII* para obtener fragmentos con una talla media superior. Las condiciones utilizadas en las reacciones de PCRs inversas se ajustaron a las descritas en el apartado anterior, con la salvedad de que las fases de elongación se prolongaron durante 3-4 minutos a una temperatura de 68°C. Se utilizaron las DNA polimerasas Biotaq (Ecogen), DyNa (Biolabs, New England), BioTaq (Biotools) y Expand™ High Fidelity.

#### 4.13. Secuenciación de DNA.

Se secuenciaron las dos hebras del DNA, directamente sobre los plásmidos o a partir de productos de PCR. Para disminuir los posibles errores de las DNAs polimerasas, se secuenciaron ambas cadenas de 3 productos de amplificación solapantes diferentes. Las primeras reacciones de secuenciación se llevaron a cabo inicialmente de forma manual empleando el Kit comercial T7 sequencing de Pharmacia, utilizando [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP como marcaje (Amersham-Buchler). Posteriormente, empleamos los secuenciadores automáticos ALF DNA de Pharmacia y Applied Biosystems 377(Perkin-Elmer) (Servicio de Secuenciación Automatizada de DNA de la Universidad Complutense de Madrid). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa DNA Strider 1.0. (354) y el paquete informático "Wisconsin Genetics Computer Group" (GCG) versión 10.0 para UNIX (Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Madrid). Los otros programas informáticos descritos a lo largo de este trabajo, empleados para analizar tanto las secuencias nucleotídicas como las aminoacídicas, fueron obtenidas a través de Internet fundamentalmente a partir del *National Center for Biotechnology* (USA) en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, el instituto SANGER del Reino unido, en la dirección <http://www.sanger.uk>, y la universidad de Lyon (Francia) en <http://www.pbil.uni-lyon1.fr>.

Los oligonucleótidonucleótidos utilizados para la secuenciación de las distintas fragmentos se detallan en la tabla 4.4.

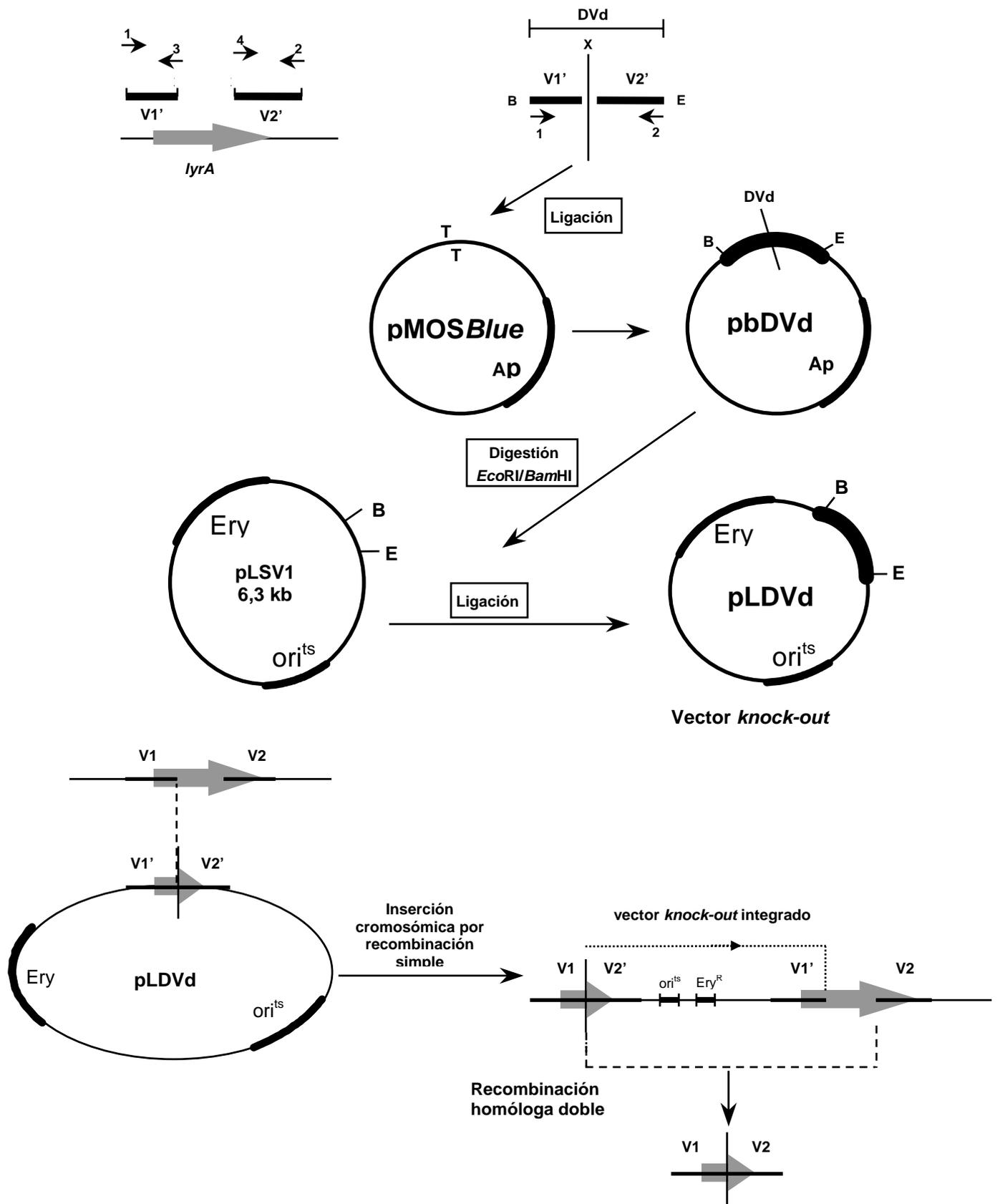
#### 4.14. Clonaje directo de productos de PCR.

Para el clonaje directo de productos de PCR purificados se utilizó el vector T comercializado por Amersham (pMOS*Blue* T-vector kit). Últimamente hemos utilizado el Kit TOPO TA Cloning® de *Invitrogen* para clonar fragmentos de tamaño superior a 2,5 kb por su mayor eficiencia de clonaje.

Para seleccionar clones con el inserto deseado, se realizó el análisis de minipreparaciones de DNA plasmídico o bien la amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidonucleótidos T7/U19 y M13Reverse/M13forward (véase tabla 4.4) diseñados en los extremos de pMOS*Blue* y pCR®-TOPO, respectivamente, o bien los oligonucleótidos correspondientes a los extremos del fragmento clonado. Para la identificación de los clones por PCR se lisaron las bacterias resuspendiendo las colonias a analizar en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y tratándolas con calor (5 minutos a 100°C).

#### 4.15. Construcción de mutantes delecionados en fase por doble recombinación homóloga.

Para crear las mutaciones por deleción en fase mediante doble recombinación homóloga se ha utilizado una estrategia basada en la construcción de un vector *knock out* derivado del vector termosensible pLSV1, conteniendo un fragmento compuesto por las dos regiones flanqueantes al segmento que se quiere deleccionar. Para la obtención del mutante  $\Delta$ *lyrA* se amplificaron mediante las parejas de oligonucleótidos Liv18/Liv17 y Liv19/Liv20 (véase tabla 4.4) los fragmentos V1' (300 pb) y V2' (366 pb), respectivamente, que flanquean los extremos 5' y 3' del segmento a deleccionar Fig. 4.1). Los oligonucleótidos Liv17 y Liv19 contienen la diana para *Xma*I, Liv18 para *Bam*HI y Liv20 para *Eco*RI. Ambos fragmentos (V1' y V2') se sigirieron con *Xma*I y posteriormente fueron ligados. Después de ser precipitada, la mezcla de ligación resuspendida en H<sub>2</sub>O destilada se utilizó como molde para realizar una segunda amplificación con los oligonucleótidos Liv18 y Liv20, obteniendo el fragmento denominado DVd. A continuación, este producto fue clonado en pMOS*Blue*, dando lugar al vector pbDVd (véase tabla 4.3). Para transferir este inserto al vector pLSV1, ambos vectores fueron sometidos a digestiones dobles *Eco*RI/*Bam*HI, seguidas de la correspondiente ligación, obteniéndose así el vector *knock out* pLDVd que contiene el fragmento deleccionado de *lyrA* y una pequeñas porción de sus regiones flanqueantes (véase tabla 4.3). Este plásmido se introdujo en *Listeria* mediante electroporación (véase apartado 4.17) y las células transformadas se seleccionaron a 30°C en BHI suplementado con 5 µg/ml de eritromicina. Estas condiciones se utilizaron rutinariamente para cultivar las cepas de *Listeria* que contenían el plásmido pLSV1 o cualquier construcción derivada que no se encontrase integrada en el cromosoma. Para iniciar la mutagénesis se partió de un cultivo en BHI con eritromicina 5 µg/ml durante 18 horas a 30°C de la cepa WT conteniendo pLDVd. A continuación se realizaron diluciones del cultivo ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), que se sembraron a razón de 100 µl por placa en agar BHI 5 µg/ml de eritromicina. Dichas placas se incubaron a una temperatura de 41,5°C que no permite la replicación del plásmido favoreciéndose así la selección e mutantes de inserción por recombinación homóloga del fragmento DVd de pLDVd y el alelo *lyrA* del DNA cromosómico. Las colonias obtenidas al cabo de 72 horas de incubación fueron analizadas mediante PCR detectar la integración de pLDVd en *lyrA*, en el mutante *lyrA*::pLDVd buscado (véase tabla 4.2). Para favorecer la eliminación del plásmido integrado y el alelo *lyrA* mediante doble recombinación homóloga, se realizaron 30 subcultivos a 37°C cada 12 horas en BHI, para finalmente someter un último subcultivo a 41,5°C durante 24 horas. A continuación, diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) del último cultivo se sembraron en placas de BHI. Las colonias obtenidas tras ser incubadas a 37°C fueron replicadas en placas de BHI y BHI suplementadas con 5 µg/ml de eritromicina. Estas placas se incubaron durante 48 horas a la temperatura no permisiva de 41,5°C para identificar aquellos clones incapaces de crecer en presencia de eritromicina y en los que, por tanto, se habría producido la eliminación de la copia cromosómica del vector. Las colonias con estas características fueron analizadas por PCR y/o *Southern blot* para comprobar la eliminación del plásmido y la existencia de una deleción del tamaño esperado en *lyrA*. Finalmente, la deleción en fase de *lyrA* fue comprobada por secuenciación.



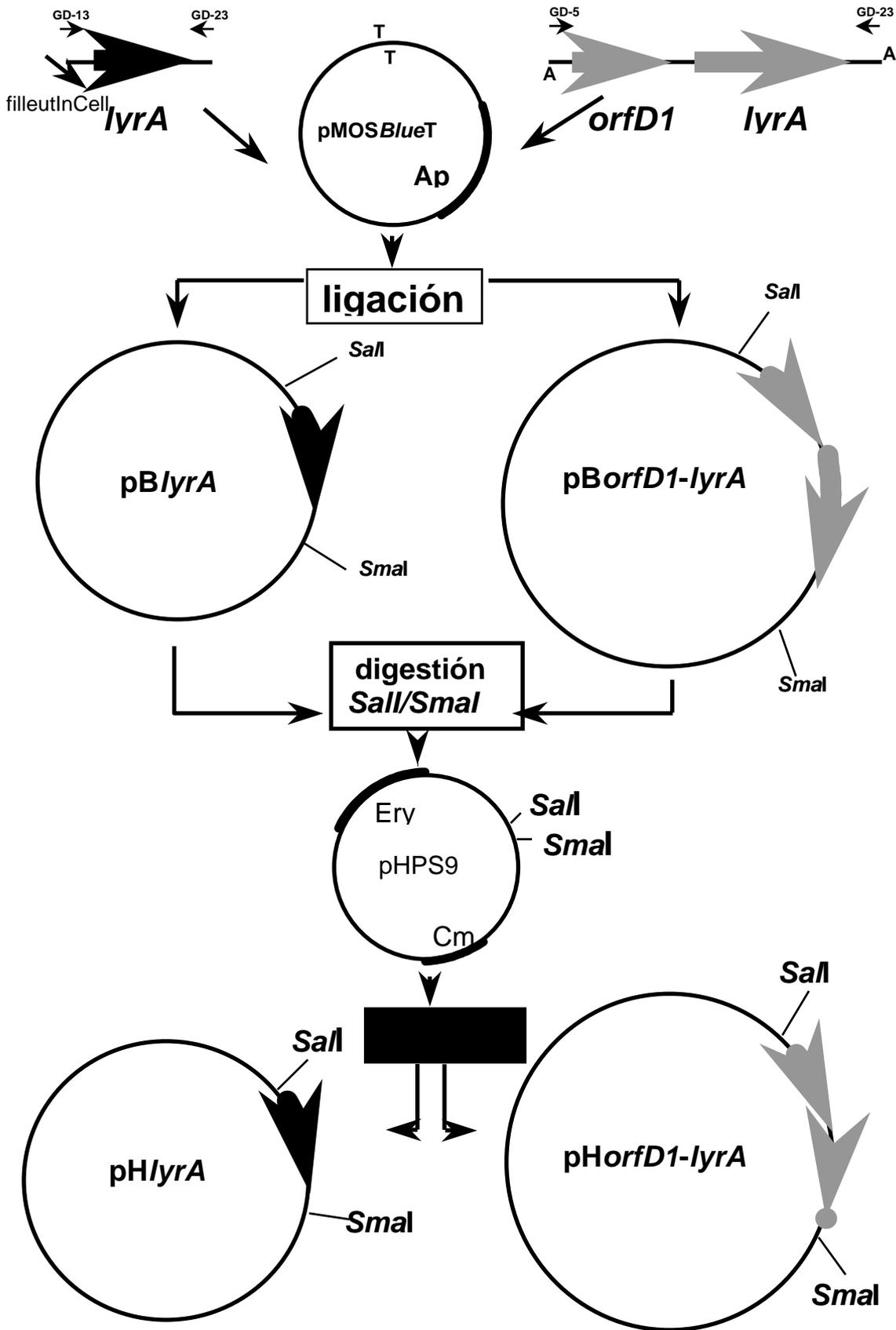
**Figura 4.1.** Diagrama de flujo en el que se representa la estrategia seguida para construir los mutantes en fase obtenidos por doble recombinación homóloga. Para más detalles, véase apartado 4.14.

#### **4.16. Preparación de construcciones de *lyrA* y *orfD1-lyrA*.**

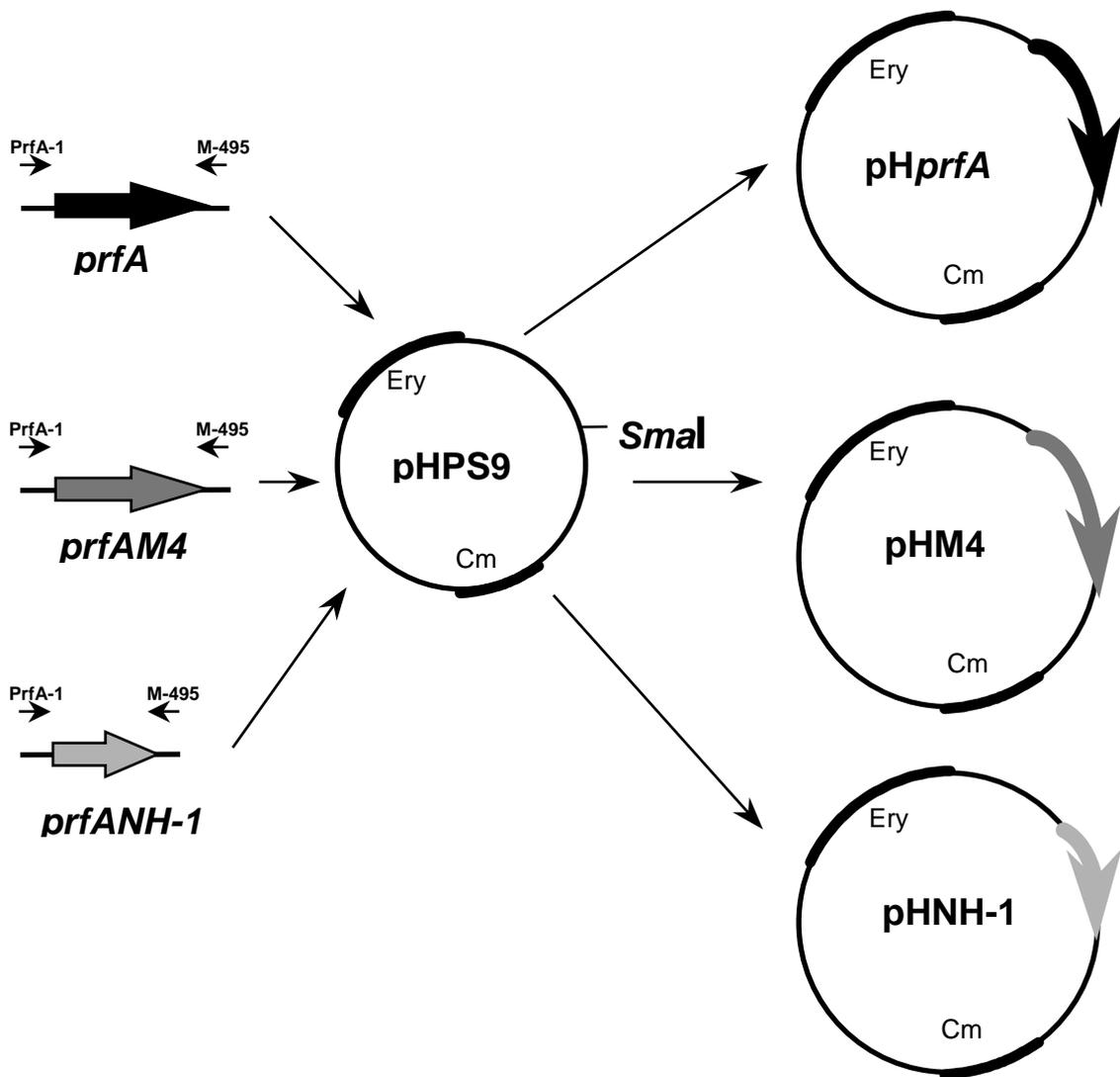
Para la construcción de los plásmidos recombinantes con la construcción del gen *lyrA* de la cepa WT de *L. ivanovii*, se amplificó un fragmento de 984 pb conteniendo el gen y su zona promotora (Figs. 3.1.4 y 4.2) con los oligonucleótidos GD-13 y GD-23 (véase tabla 4.4). Este producto fue clonado en el vector pMOS*blue*, dando lugar al plásmido pB*lyrA* (véase tabla 4.3 y Fig. 4.2). La construcción bicistónica *orfD1-lyrA* se realizó del mismo modo, utilizando los oligonucleótidos GD-5 y GD-23 (véase Tabla 4.4) para la amplificación de un fragmento de 1658 pb, dando lugar al plásmido pB*orfD1-lyrA* (véase Tabla 4.3 y Fig. 4.2). En ambas construcciones se seleccionaron únicamente los clones que presentaban su extremo 5' próximo a la diana *SaI* y su extremo 3' en el punto de corte de *SmaI*. Para transferir los insertos de los plásmidos de la serie pB al vector pHPS9 (223), se realizaron digestiones dobles *SmaI/SaI* y la correspondiente ligación con pHPS9 linearizado con las mismas enzimas, obteniéndose así los plásmidos de las series pH (véase Tabla 4.3 y Fig. 4.2). Las construcciones utilizadas para la complementación fueron secuenciadas para comprobar su integridad y que no contenían errores de amplificación.

#### **4.17. Preparación de construcciones de *prfA*.**

Para la construcción de los plásmidos recombinantes con el gen *prfA* de *L. ivanovii* WT así como de los mutantes M4 y NH-1 en forma monocistónica, se amplificaron con los oligonucleótidos PrfA-1 y M-495 fragmentos conteniendo el gen y su zona (Fig. 4.3). Estos productos, a diferencia del apartado anterior, fueron clonados directamente en el vector pHPS9 (223), previamente linearizado mediante digestión con *SmaI*, que crea extremos romos. Se seleccionaron los clones con la orientación que permitía que la zona promotora de *prfA* se encontrara bajo el control del promotor PS9. Se obtuvieron así los plásmidos de la serie pH, pH*prfA*, pHM4 y pHNH-1 (Tabla 4.3 y Fig. 4.2). Como para todas las construcciones utilizadas en complementaciones, los insertos fueron secuenciados para comprobar que no contenían errores de amplificación y mantenían las características de los alelos de los que procedían.



**Figura 4.2.** Diagrama de flujo que representa la estrategia seguida para preparar las distintas construcciones de *lyrA* y *orfD1-lyrA*. Para más detalle, véase apartado 4.16.



**Figura 4.3.** Esquema donde se representa la estrategia utilizada para preparar las distintas construcciones de *prfA*, *prfAM4* y *prfANH-1*. Para más detalle véase apartado 4.17.

#### 4.18. Introducción de plásmidos en *Listeria* mediante electroporación.

Para la introducción de plásmidos en *Listeria* se utilizó la electroporación según el protocolo descrito por Park y Stewart (425). Las bacterias se incubaron en BHI con 0,5 M sacarosa (Panreac) a 37°C y con agitación fuerte hasta que los cultivos alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0,2 (alrededor de 6 horas de incubación), momento en que se añadieron 10  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina para obtener células con la pared debilitada. Tras incubar durante 2 horas más, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron 4 veces con tampón Hepes (1mM Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazine-1-etano sulfónico; Fluka), 0,5 M sacarosa; pH 7,0), antes de concentrarlas 400 $\times$  mediante resuspensión en el mismo tampón con 10% de glicerol. Las electroporaciones se llevaron a cabo en cubetas apropiadas con una separación de electrodos de 0,1 ó 0,2 cm (Bio-Rad), en las que se introdujeron las mezclas de 50 u 80  $\mu\text{l}$  de células, respectivamente, con 1-2  $\mu\text{l}$  de plásmido; se aplicó un voltaje de 10.000V/cm, con una

resistencia de 400  $\Omega$  y una capacitancia de 25 F utilizando los aparatos Gene Pulser™ y Pulser Controller de BioRad. Una vez electroporadas, las bacterias se incubaron en BHI durante 1-2 horas en agitación suave (100 r.p.m.) y a continuación se sembraron en placas de agar BHI utilizando las condiciones de incubación y presión selectiva adecuadas.

#### **4.19. Otras técnicas genéticas.**

Las enzimas de restricción y modificación de DNA procedían de la casa comercial Pharmacia. Las ligaciones se introdujeron en *E. coli* DH5 $\alpha$  por transformación, utilizando células bacterianas competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl<sub>2</sub> (14). Los productos amplificados por PCR, así como los insertos extraídos destinados a subclonaje, se extrajeron y purificaron de los geles de agarosa al 0,8% mediante el sistema Qiaquick™ Gel Extraction de Qiagen. Los vectores digeridos con enzimas de restricción se purificaron utilizando el sistema comercial Clean Up (Promega) y Qiaquick™ PCR Purification Kit de Qiagen. Las extracciones rutinarias de plásmidos a partir de *E. coli* se realizaron según el método de minipreparación de DNA plasmídico por lisis alcalina (14). Esta misma técnica se utilizó para la extracción de plásmidos de *Listeria*, realizando durante la fase de lisis una incubación en lisozima durante 2 horas a 37°C. La preparación de plásmidos para hibridación, secuenciación, subclonaje de insertos o electroporación, se realizó utilizando el sistema comercial Plasmid Purification kit de Qiagen y Ultraclean™ MiniPlasmid Prep Kit (Hispanlab). La precipitación de ácidos nucleicos se realizó mediante el *carrier Pellet Paint™* Co-Precipitant (Novagen), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

#### **4.20. Electroforesis de proteínas e *immunoblotting*.**

El análisis de proteínas se realizó por SDS-PAGE y *Western immunoblotting*. La obtención de las proteínas precipitadas de los SC se realizó a partir de cultivos de *Listeria* en BHI en el inicio de su fase estacionaria. A continuación, mediante centrifugación se obtuvo el sobrenadante del cultivo que seguidamente fue esterilizado por filtración a través de membrana con poro de 0,22  $\mu$ m de diámetro (Millipore). Las proteínas fueron precipitadas en frío durante 12 horas con un 10% de volumen final de TCA (ácido tricloroacético), posteriormente fueron centrifugadas durante 1 hora a 12.000 x g a 4°C, lavadas (a temperatura de refrigeración) con 1 ml de acetona fría y resuspendidas en 1/5 del volumen original de SC de Laemmli Buffer 1x (312). Finalmente, las muestras fueron hervidas 10 minutos para favorecer su resuspensión en presencia de 1x Buffer de carga (Solución stock 4x: 4 ml de Glicerina (100%), 3 ml de SDS 10%, 2 ml de Tris-ClH 2 M (pH 6,8), 750  $\mu$ l de  $\beta$ -Mercaptoetanol, y 10 mg de Azul de Bromofenol ajustado hasta 10 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril). Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

La técnica de SDS-PAGE se realizó siguiendo exactamente las indicaciones y utilizando las soluciones descritas en el método del buffer discontinuo de Laemmli (312) utilizando un 12% de acrilamida para el gel de separación y un 5% en el gel de

empaquetamiento. La tinción con Azul de Coomassie R-250 y el desteñido se realizaron también conforme a Laemmli (312). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 2 horas mediante un Mini Trans-Blot® (Bio-Rad). Las membranas se saturaron con proteína en TBS (50 mM Tris-ClH (pH 7,5) y 1,5 M de NaCl) con 5% de leche desnatada) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT). La inmunodetección de ILO se realizó utilizando anticuerpos policlonales específicos obtenidos de conejo (amablemente cedidos por J. Kreft, Universidad de Würzburg, Alemania) diluidos 1:30 en TTBS (TBS + 0,1% de Tween 20). El reconocimiento de los anticuerpos primarios se realizó utilizando anticuerpos secundarios anticonejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad) (diluidos 1:2000). Las reacciones positivas fueron detectadas con 4-cloro-1-naftol o, alternativamente, el sistema ECL (*Western blotting analysis System*, Amersham) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **4.21. Curvas de crecimiento.**

Las curvas de crecimiento se realizaron en matraces de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo. Los medios se inocularon diluyendo en proporción 1:200 precultivos de 18 horas en BHI o LB en función del medio utilizado para el ensayo de crecimiento. El crecimiento bacteriano se midió regularmente determinando la DO de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi 150-20. Para garantizar la linealidad de los resultados, las mediciones se realizaron sobre diluciones apropiadas del cultivo de tal forma que la DO nunca fuese superior a 1, calculándose la DO final multiplicando por el correspondiente factor de dilución.

#### **4.22. Ensayos de virulencia.**

Se llevaron a cabo dos clases de ensayos de virulencia empleando el modelo murino. Los experimentos con el mutante 44/2, se realizaron mediante infección experimental en ratones hembra de raza Swiss (Charles River, Saint Aubin les Elboeuf, Francia) de 6 a 8 semanas de edad y libres de patógenos específicos (SPF), según métodos previamente descritos (461). Los experimentos con los mutantes GD-3 y GD-1 se realizaron en ratones SPF hembra de raza BALB/c (Harlan Ibérica). En ambos casos, grupos de 5 ratones fueron infectados por vía intravenosa con dosis de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  in 0,2 ml de PBS, calculándose la LD<sub>50</sub> se ha calculado según el método de Reed y Muench (465).

Para los estudios de virulencia en corderos, se inocularon lotes de tres animales procedentes de una misma explotación por vía intravenosa. Se administraron las diferentes dosis de las cepas analizadas resuspendidas en 10 ml de PBS. Las necropsias se realizaron en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Madrid (UCM).



## **5. CONCLUSIONES**

Las conclusiones más relevantes del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

**Primera.** Hemos identificado y caracterizado genéticamente una nueva región de virulencia de *Listeria*. Se trata de LIPI-2, una isla de patogenicidad de 22 kb que contiene el gen de una esfingomielinasa, *smcL*, rodeado de un gran número de genes de internalinas. LIPI-2 es específica de *L. ivanovii* y está probablemente implicada en el tropismo patogénico de esta especie.

**Segunda.** Esta isla se encuentra insertada, con una estructura genética similar, en el mismo punto cromosómico en todas las cepas de *L. ivanovii* analizadas, incluida la subsp. *londoniensis*. Esto revela que LIPI-2 forma parte desde hace tiempo del patrimonio genético de *L. ivanovii*, habiendo sido adquirida por esta especie antes de su diversificación en las dos subramas filogenéticas que la constituyen actualmente.

**Tercera.** LIPI-2 constituye el primer locus multigénico de virulencia descrito en bacterias gram-positivas que cumple la mayoría de los criterios que definen a las islas de patogenicidad, v.g. presenta un contenido en G+C significativamente distinto al del genoma de la especie, es inestable, y su punto de inserción se encuentra asociado a un locus tRNA.

**Cuarta.** El análisis del lugar de inserción de LIPI-2 en el núcleo genómico de las distintas especies de *Listeria*, enmarcado por los loci *ysnB* e *ydel*, revela la posible existencia de un punto caliente de variabilidad genética en el que existen distintos fragmentos de DNA insertados, como por ejemplo LIPI-2 en *L. ivanovii*.

**Quinta.** En este trabajo hemos identificado diez de los veintiún genes de internalina actualmente conocidos en *Listeria*, y descrito las dos primeras internalinas asociadas con la pared en *L. ivanovii*. Este tipo de internalinas están asociadas con el fenotipo invasivo y el tropismo celular en *L. monocytogenes*.

**Sexta.** La inestabilidad genética de LIPI-2 se traduce en una delección de 17.5 kb en el cromosoma de *L. ivanovii*, que abarca el extremo derecho de la isla así como un fragmento flanqueante del cromosoma. Dicha delección es reproducible y resulta en una pérdida de virulencia para el ratón y la oveja, aparentemente asociada con un cambio en el tropismo orgánico en esta última especie.

**Séptima.** Cuando *L. ivanovii* es expuesta a condiciones de estrés asociadas con elevada temperatura y/o fase estacionaria, responde generando con elevada frecuencia un fenotipo variante débilmente hemolítico que revierte a la situación original en cuanto se restablecen las condiciones normales de cultivo. Algunos de estos variantes, sin embargo, presentan mutaciones estables que afectan a loci de virulencia tales como *prfA* o LIPI-2, o a un locus hasta ahora no identificado y que podría estar implicado en la regulación coordinada de *smcL* e *i-inlE*.

**Octava.** El análisis de uno de los mutantes *prfA* obtenidos revela la importancia del dominio de cremallera de leucinas presente en la zona C-terminal en la función transcripcional de este regulador.

**Novena.** Hemos caracterizado una región cromosómica común a *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* en la que hemos identificado el primer regulador de la familia LysR descrito en *Listeria* (*LyrA*). Esta región se encuentra también en la especie apatógena *L. innocua*, por lo que se deduce que forma parte del núcleo genómico común presente en todas las especies del género. En consonancia con este hecho, una mutación *lyrA* no afecta a la virulencia.

**Décima.** Finalmente, nuestro trabajo pone claramente de manifiesto el peligro que suponen para la investigación en genética molecular de *Listeria* las mutaciones espontáneas cuando para la selección de eventos de mutación específicos se utiliza un sistema de cribado basado en el fenotipo. Para evitar sorpresas desagradables, pérdidas de tiempo y errores de interpretación, consideramos indispensable comprobar la asignación de función tras la mutagénesis mediante complementación génica.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Adam, T., Arpin, M., Prévost, M.C., Gounon, P., and Sansonetti, P.J. 1995. Cytoskeletal rearrangements during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J. Cell Biol.* **129**: 367-381.
1. Aiba, H., Fujimoto, S. and Ozaki, N. 1982. Molecular cloning and sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucl. Acids Res.* **10**: 1345-1361.
2. Akopyans, N.S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Youree, B.E., Reece, A., Bukanov, N.O., Drazek, E.S., Roe, B.A., and Berg, D.E. 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **28**(1): 37-53.
3. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K. and Watson, J.D. 1994. The cytoskeleton. In *Molecular biology of the cell*. M. Robertson ed. p. 787-861. 3th edn. Garland Publishing, Inc.
4. Alonso, R., Nicholson, P.S. and Pitt, T.L. 1993. Rapid extraction of high purity chromosomal DNA from *Serratia marcescens*. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**: 77-79.
5. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
6. Alvarez-Domínguez, C., Vázquez-Boland, J.A., Carrasco-Martín, E., López-Mato, P. and Leyva-Cobián, F. 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the *Listerial* surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect. Immun.* **65**: 78-88.
7. Ambudkar, S., Larson, V. and Maloney, P.C. 1986. Reconstitution of sugar transport system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**: 9083-9086.
8. Anton, W. 1934. Kritisch-experimenteller Beitrag zur biologie des *Bacterium monocytogenes*. Mit besonderer berücksichtigung seiner beziehung zur infektiösen mononukleose des menschen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe. A* **131**: 89-103.
9. Asahi, O. 1963. Pathogenesis of listeric encephalitis: invasion of nerve fibers by *Listeria monocytogenes*. In *Second Symposium on listeric infection*. pp. 99-108. Bozeman, Montana, Aircraft Printers.
10. Asaoka, Y., Nakamura, S.-I., Yoshida, K. and Nishizuka, Y. 1992. Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 414-417.
11. Audurier, A. 1989. Listeriosis: epidemiology and phage-typing. En: *Microbiología-89*. (Sociedad Española de Microbiología, ed.). Actas del XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología, Pamplona 24-27 Sept.. **1**: 245-246.
12. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1991. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons eds., New York.
13. Baba, T. and Schneewind, O. 1996. Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **15**: 4789-4797.
14. Bach, S., Buchrieser, C., Prentice, M., Guiyoule, A., Msadek, T., and Carniel, E. 1999. The High-Pathogenicity Island of *Yersinia enterocolitica* Ye8081 Undergoes Low-Frequency Deletion but Not Precise Excision, Suggesting Recent Stabilization in the Genome. *Infect. Immun.* **67**(10): 5091-5099.
15. Bancroft, G.J., Schreiber, R.D. and Unanue, E.R. 1991. Natural immunity: A T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* **124**: 5-24.
16. Barry, R.A., Bouwer, H.G.A., Portnoy, D.A., and Hinrichs, D.J. 1992. Pathogenicity and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **60**: 1625-1632.
17. Batut, J., Daveran-Mingot, M.-L., Jacobs, M.D.L., Garnerone, A. and Kahn, D. 1989. *fixK*, a gene homologous with *fix* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* **8**: 1279-1286.
18. Bäumler, A., Gilde, A., Tsois, R., van der Velden, A., Ahmer, B., and Heffron, F. 1997. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J. Bacteriol.* **179**: 317-322.
19. Bäumler, A., Tsois, R., and Heffron, F. 1997. Fimbrial adhesin of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **412**: 149-158.
20. Bäumler, A., Tsois, R., Ficht, T., and Adams, L.G. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **62**: 1623-1630.

21. Beattie, D.T., Shahin, R. and Mekalanos, J.J. 1992. A *vir*-repressed gene of *Bordetella pertussis* is required for virulence. *Infect. Immun.* 60: 571-577.
22. Behari, J. and Youngman, P. 1998. Regulation of *hly* expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by PrfA. *Infect. Immun.* 66: 3635-3642.
23. Belkum van, A., Scherer, S., Alphen van, L., and Verbrugh, H. 1998. Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2): 275-293.
24. Berche, P., Gaillard, J.-L. and Raveneau, J. 1989. Pathophysiology of *Listeria monocytogenes* infection. In *Immune disorders and opportunistic infections*, J.-P. Revillard and N. Wierzbicki eds., Fondation Franco-Allemande, Suresnes, France. Local immunity 5: 23-41.
25. Berche, P., Gaillard, J.-L. and Sansonetti, P.J. 1987. Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* as a prerequisite for *in vivo* induction of T cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 138: 2266-2271.
26. Berche, P., Gaillard, J.-L. and Sansonetti, P.J. 1988. Invasiveness and intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *Infection* 16(S2): 145-148.
27. Berche, P., Gaillard, J.-L., Geoffroy, C., and Alouf, J.E. 1987. T cell recognition of listeriolysin O is induced during infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 139: 3813-3821.
28. Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. and Sziegoleit, A. 1985. Mechanism of membrane damage by streptolysin O. *Infect. Immun.* 47:52-60.
29. Bibb, W.F., Gellin, B.G., Weaver, R. Schwartz, B., Plikaytis, B.D., Reeves, M.W., Pinner, R.W. and Broome, C.V. 1990. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2133-2141.
30. Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P. and Portnoy, D.A. 1990. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature.* 345: 175-176.
31. Bille, J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In *Foodborne listeriosis*, p. 71-74. A.L. Miller, J.L. Smith, and G.A. Somkyti, eds. Elsevier, Amsterdam.
32. Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M.-N., Caniaux, I., Monget, D. and Rocourt, J. 1992. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1857-1860.
33. Binder, D.A., Blanchard, J.S., and Roderick, S.L. 1996. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of tetrahydrodipicolinate-N-succinyltransferase. *Proteins* 26 (1): 115-117.
34. Birnboim, H.C. and Dolly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
35. Blanc-Potard, A.,B., and Groisman, E.,A. 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* 16: 5376-5385.
36. Blanc-Potard, A.-B., Solomon, F., Kayser, J., and Groisman, E.,A. 1999. The SPI-3 Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 181(3): 998-1004.
37. Blanden, R.V. and Langman, R.E. 1972. Cell-mediated immunity to bacterial infection in the mouse. Thymus-derived cells as effectors of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. *Scand. J. Immunol.* 1: 379-409.
38. Blatner, F. et al. 1997. The complete genome sequence of *E. coli* K12. *Science.* 277: 1453-1474.
39. Blum, G., Falbo, B., Caprioli, A., and Hacker, J. 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 189-196.
40. Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H., and Hacker, J. 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* 62: 606-614.
41. Böckmann, R., Dickneite, C., Middendorf, B., Goebel, W. and Sokolovic, Z. 1996. Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron. *Mol. Microbiol.* 22: 643-653.
42. Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Jacquet, C. and Piffaretti, J.-C. 1992 *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis*. subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 69-73.

43. Bohne, J., Kestler, H., Uebele, C., Sokolovic, Z. and Goebel, W. 1996. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol. Microbiol.* 20:1189-1198.
44. Bohne, J., Sokolovic, Z. and Goebel, W. 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 11: 1141-1150.
45. Bouwer, H.,G.,A., Nelson, C.,S., Gibbins, B.,L., Portnoy, D.,A., and Hinrichs, D.,J. 1992. Listeriolysin O is the target of the immune response to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 175: 1467-.
46. Boyd, J., Oza, M.N. and Murphy, J.R. 1990. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria *tox* iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 5968-5972.
47. Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Liendahl, G. and Cossart, P. 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* 25:285-294.
48. Braun, L., Ghebrehiwet, B., and Cossart, P. 2000. GC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 19:1458-1466.
49. Braun, L., Nato, F., Payraastre, B., Mazié, J.-C., and Cossart, P. 1999. The 213-amino acid LRR region of *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI-3 kinase and membrane ruffling. *Mol. Microbiol.* 34: 10-23.
50. Braun, L., Ohayon, Hl and Cossart, P. 1998. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol. Microbiol.* 27: 1077-1087.
51. Braun, V., and von Eichel-Streiber, C. . 1999. Virulence-Associated Mobile Elements in Bacilli and Clostridia. In Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. Edited by J. B. Kaper and J. Hacker. ASM, Washington, D. C Chap. 13: 233-264.
52. Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.T. 1957. *In* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7<sup>th</sup> edit.p. 597-599. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
53. Brehm, K., Kreft, J. y Vázquez-Boland, J.A. 1997. Identificación del *locus bvr* de *Listeria monocytogenes*, implicado en la represión de los genes de virulencia por  $\beta$ -glucósidos. XVI Congreso de la Sociedad Española de Microbiología (Barcelona).
54. Brehm, K., Kreft, J., Ripio, M.-T. and Vázquez-Boland, J.A. 1996. Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. *Microbiol. SEM*12: 219-236.
55. Brehm, K., Ripio, M.T. y Vázquez-Boland, J.A. Resultados no publicados.
56. Brehm, K., Ripio, M.T., Kreft, J., and Vázquez-Boland, J.A. 1999. The *bvr* Locus of *Listeria monocytogenes* Mediates Virulence Gene Repression by B-Glucosides. *J. Bacteriol.* 181(16): 5024:5032.
57. Brosch, R., Buchrieser, C. and Rocourt, J. 1991. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res. Microbiol.* 142: 667-675.
58. Brosius, J., Ulrich, A., Raker, M.A., Gray, A., Dull, T.J., Gutell, R.R. and Noller, H.F. 1981. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. *Plasmid* 6: 113-119.
59. Brown, E.,M., Reeves, D.,S. in: *Antibiotic and cherotherapy*. Seventh Edition (1997). Edited by O'Grandy, F., Lambert, H.,P., Finch, R.,G., Greenwood, D. Chap. 32.
60. Brunt, L.,M., Portnoy, D.,A., and Unanue, E.,R. 1990. Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8<sup>+</sup> T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J. Immunol.* 145: 3540-3546.
61. Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W. and Kohler, S. 1992. Structural and funtional properties of the p60 protein from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* 174: 8166-8171.
62. Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun, S.-K., Papatheodorou, L., Simm, A., and Goebel, W. 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol. Gen. Genet.* 261: 323-336.
63. Buchmeier, N.A. and Heffron, F 1990. Induction of *Salmonella* proteins upon infection of macrophages. *Science* 248: 730-732.
64. Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiyoule, A., and Carniel, E. 1998. The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into aun f the three chromosomal *asn tRNA* genes. *Mol. Microbiol.* 30: 965-978.

65. Buchrieser, C., Prentice, M., and Carniel, E. 1998. The 102-Kilobase Unstable Region of *Yersinia pestis* Comprises a High-Pathogenicity Island Linked to a Pigmentation Segment Which Undergoes Internal Rearrangement. *J. Bacteriol.* **180** (9): 2321-2329.
66. Burn, C.G. 1935. Characteristics of a new species of de genus *Listerella* obtained from human sources. *J. Bacteriol.* **30**: 573-591.
67. Bütikofer, P., Lin, Z.W., Chiu, D.T.-Y., Lubin, B. and Kuypers, F.A. 1991. Transbilayer distribution and mobility of phosphatidylinositol in human red blood cells. *J. Biol.Chem.* **265**: 16035-16038.
68. Caillaud, F., Carlier, C., Courvalin, P. 1987. Physical Analysis of the Conjugative Shuttle Transposon Tn1545. *Plasmid* **17**: 58-60.
69. Calderwood, S.B. and Mekalanos, J.J. 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bacteriol.* **169**: 4759-4764
70. Camilli, A., Goldfine, H. and Portnoy, D.A. 1991. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J. Exp. Med.* **173**: 751-754.
71. Camilli, A., Tilney, L.G. and Portnoy, D.A. 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **8**:143-157.
72. Carniel, E.,Guilvout, I., and Prentice, M. 1996.Characterization of a Large Chromosomal “High-Pathogenicity Island” in Biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **178** (23): 6743-6751.
73. Carter, P.S. and Collins, F.M. 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* **139**: 1189-1203.
74. Casadaban, M.,J., and Cohen, S.,N. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**: 179-207.
75. Censini, S., Lange, L., Xiang, Z., Crabtree, J.,E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, and Covacci, A. 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 14648-14653.
76. Chakraborty, T. 1996. The molecular mechanism of actin based intracellular motility by *Listeria monocytogenes*. *Microbiol. SEM***12**: 237-244.
77. Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Nieguhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C. J., Jockusch, B.M., Reinhard, M., Walter, U. and Wehland, J. 1995. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* **14**: 1314-1321.
78. Chakraborty, t., Hain, T., and Domann, E. 2000. Genome organizatin and the evolution of the virulence genes locus in *Listeria* species. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 167-174.
79. Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T. and Notermans, S. 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J. Bacteriol.* **174**:568-574.
80. Chand, P., and Sadana, J. R. 1999. Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Veterinary Record.* **145**: 83-84.
81. Cheetham, B.,F., and Katz, M.,E. 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* **18**: 201-208.
82. Chico, I., Ripio, M.T., Suárez, M., and Vázquez-Boland, J.A., Unpublished results.
83. Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
84. Christie, R., Atkins, N.E. and Munch-Petersen. 1944. A note on lytic phenomemon shown by Group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **22**: 197-200.
85. Coconnier, M.-H., Dlissi, E., Robard, M., Laboisse, C.,L., Gaillard, J.-L., and Servin, A.,L. 1998. *Listeria monocytogenes* stimulates mucus exocytosis in cultured human polarized mucosecreting intestinal cells through action of listeriolysin O. *Infect. Immun.* **66**: 3673-3681.
86. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., *et al.* 1998. Deciphering the biology of *Micobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**: 537-544.

87. Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.,J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., and Stackebrandt, E. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 240-246.
88. Conlan, J.W. and North, R.J. 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* **174**: 741-744.
89. Conlan, J.W. and North, R.J. 1992. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.* **60**: 5164-5171.
90. Conner, C.P., Heithoff, D.M., Julio, S.M., Sinsheimer, R.L., and Mahan, M.J. 1998. differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 4641-4645.
91. Cooper, J., Walker and D., R. 1998. Listeriosis. *Microbial Food Borne Pathogens.* **14**(1):113-125.
92. Cooper, R. and Dennis, S.M. 1978. Further characterization of *Listeria monocytogenes* serotype 5. *Can. J. Microbiol.* **24**: 598-599.
93. Cooper, R.H., Kobayashi, K. and Williamson, J.R. 1984. Phosphorylation of a 16-kDa protein by diacylglycerol-activated protein kinase C *in vitro* and by vasopressin in intact hepatocytes. *FEBS Lett.* **166**: 125-130.
94. Cossart, P. 1994. *Listeria monocytogenes*: strategies for entry and survival in cells and tissues. *In* Strategies for intracellular survival of microbes, D.G. Russell ed., Bailliere's Clinical Infectious Diseases International Practice and Research. **1**: 285-304.
95. Cossart, P. 1995. Actin-based bacterial motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 94-101.
96. Cossart, P. and Gicquel-Sanzey, B. 1982. Cloning and sequencing of the *crp* gene of *Escherichia coli* K 12. *Nucl. Acids Res.* **10**: 1363-1378.
97. Cossart, P. and Kocks, C. 1994. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **13**: 395-402.
98. Cossart, P. and Lecuit, Marc. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* **17**(14): 3797-3806.
99. Cossart, P. and Mengaud, J. 1989. *Listeria monocytogenes* a model system for the study intracellular parasitism. *Mol. Biol. Med.* **6**: 463-474.
100. Cossart, P., Boquet, P., Normark, S. and Rappuoli, R. 1996. Cellular microbiology emerging. *Science.* **271**: 315-316.
101. Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, F., Pérez-Díaz, J.C. and Berche, P. 1989. Listeriolysin O is essential for the virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* **57**: 3629-3636.
102. Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. 1999. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. *Science.* **284**: 1328-1333.
103. Cowart, R.E. and Foster, B.G. 1981. The role of iron in the production of hemolysin by *Listeria monocytogenes*. *Curr. Microbiol.* **6**: 287-290.
104. Coyne, J., A., and Charlesworth, B. 1996. Mechanisms of punctuated evolution. *Science* **274**: 1748-1749.
105. Croicé, J., Arvieux, J., Berche, P. and Colomb, M.G. 1993. Activation of the human complement alternative pathway by *Listeria monocytogenes*: evidence for direct binding and proteolysis of the C3 component on bacteria. *Infect. Immun.* **61**: 5134-5139.
106. Cruz-Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A. and Glaser, P. 1995. Anaerobic transcription in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *EMBO J.* **14**: 5984-5994.
107. Cummins, A.J., Fielding, A.K., and McLaughlin, J. 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J. Infect.* **28**: 89-91.
108. Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A. and Southwick, F.S. 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6068-6072.
109. Dallmier, A.W. and Martin, S.E. 1990. Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 65-72.

110. Datta, A.R. and Kothary, M.H. 1993. Effects of glucose, growth temperature, and pH on Listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3495-3497.
111. de Chastellier, C. and Berche, P. 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect. Immun.* 62: 543-553.
112. De Crecy-Lagard, V., Glaser, P., Lejeune, P., Sismeiro, O., Barber, C.E., Daniels, M.J. and Danchin, A. 1990. A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 172: 5877-5883.
113. De Crombrughe, B., Busby, S. and Buc, H. 1984. Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science.* 224: 831-838.
114. De Vries, F. P., van Der Ende, A., van Putten, J.P., Danker, J. 1996. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect. Immun.* 64: 2998-3006.
115. Demuth, A., Chakraborty, T., Krohne, G., and Goebel, W. 1994. Mammalian cells transfected with the listeriolysin gene exhibit enhanced proliferation and focus formation. *Infect. Immun.* 62: 5102-5111.
116. Dennis, S. M. 1975. Perinatal lamb mortality in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 51:75-79
117. Dersch, P., Schmidt, K. and Bremer, E. 1993. Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* 8: 875-889.
118. Devereux, J., Haerberli, P., and Smiththies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programmes for the VAX. *Nucl. Acids. Res.* 12: 387-395.
119. Devrets, D. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *M. Immunol.* 158: 5305-5313
120. Dickneite, C., Böckmann, R., Spory, A., Goebel, W. and Sokolovic, Z.. 1998. Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activation factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol. Microbiol.* 27: 915-928.
121. Dijskstra, R.G. 1987. Listeriosis in animals. First isolations of *Listeria* type 5 in The Netherlands. *Acta Microbiol. Hung.*(Xth Int. Symp. on Listeriosis, Pécs aug. 1988)1988, Hungría. Libro de resúmenes, p. 62.
122. Domann, E., Leimeister-Wächter, M., Goebel, W. and Chakraborty, T. 1991. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* 59: 65-72.
123. Domann, E., Wehland, J., Niebuhr, K., Haffner, C., Leimeister-Wächter, M. and Chakraborty, T. 1993. Detection of a PrfA-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect. Immun.* 61: 3073-3075.
124. Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. and Chakraborty, T. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* requires for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11: 1981-1990.
125. Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A. Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J. and Chakraborty, T. 1997. Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect. Immun.* 65: 101-109.
126. Domínguez-Bernal, G., kref, J., González-Zorn, B., Vega, Y., Montero, N., Suárez, M., Ripio, M.-T., and Vázquez-Boland, J.-A. 1997. Identificación de un nuevo regulador en *Listeria*, LivR de la familia de los factores de transcripción LysR, probablemente involucrado en el control de la virulencia. Presentación oral. XX Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular. Facul. Veterinaria. UCM, Spain. 17-20 septiembre.
127. Domínguez-Rodríguez, L., Vázquez-Boland, J.A., Fernández-Garayzábal, J.F., Echalecu-Tranchant, P., Gómez-Lucía, E., Rodríguez-Ferri, E.F. and Suárez-Fernández, G. 1986. Microplate technique to determine hemolytic activity for routine typing of *Listeria* strain. *J. Clin. Microbiol.* 24: 99-103.
128. Dons, L., Rasmussen, O.F. and Olsen, J.E. 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 6: 2919-2929.
129. Dramsi, S., Biswas, Y., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. and Cossart, P. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* 16:251-261.

130. Dramsi, S., Dehoux, P. and Cossart, P. 1993. Common features of Gram-positive bacterial proteins involved in cell recognition. *Mol. Microbiol.* 9: 1119-1122.
131. Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrum, M., Goossens, P.L. and Cossart, P. 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect. Immun.* 65: 1615-1625.
132. Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. and Cossart, P. 1993. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. *Mol. Microbiol.* 9: 931-941.
133. Dramsi, S., Lévi, S., Triller, A., and Cossart, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into Neurons Occurs by Cell-to Cell Spread: an in Vitro Study. *Infect. Immun.* 66: 4461-4468.
134. Drevets, D.A., Sawyer, R.T., Potter, T.A. and Campbell, P.A. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 63: 4268-4276.
135. Ebright, R.H., Kolb, A., Buc, H., Kunkel, T.A., Krakow, J.S. and Beckwith, J. 1987. Role of glutamic acid-181 in DNA-sequence recognition by the catabolite gene activator protein (CAP) of *Escherichia coli*: Altered DNA-sequence-recognition properties of [Val<sup>181</sup>] CAP and [Leu<sup>181</sup>] CAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6083-6087.
136. Edelson, B.,T., Cossart, P., and Unanue, E.,R. 1999. Cutting edge: paradigm revisited:antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J. Immunol.* (15): 163: 4087-4090.
137. Elena, S.,F., Cooper, V.,S., and Lenski, R.,E. 1996. Punctuated evolution caused by selection of rare beneficial mutations. *Science* 272: 1802-1804.
138. Elischerova, K., Cupkova, E., Uurgeova, E., Lysy, J. , Sesevickova, A. 1990. Isolation of *Listeria ivanovii* in Slovakia. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 39;228-236.
139. Engelbrecht, F., Chun, S.-K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. and Sokolovic, Z. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* 21: 823-837.
140. Engelbrecht, F., Dickneite, C., Lampidis, R., Götz, M., DasGupta, U., and Goebel, W. 1998. Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (*inlC*) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *Mol. Gen. Genet.* 257: 186-197.
141. Engelbrecht, F., G. Domínguez-Bernal, J. Hess, C. Dickneite, L. Greiffenberg, R. Lampidis, D. Raffelsbauer, J.J.D. Daniels, J. Kreft, S.H.E. Kaufmann, J.A. Vázquez-Boland, and W. Goebel. 1998. A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 30: 405-417.
142. Errebo-Larsen, H. and Seeliger, H.P.R. 1966. A mannitol-fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. *In Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis, Bilthoven, The Netherlands.* p. 35-39.
143. Farber, J.M. and Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.
144. Feng, G., Tsui, H.-C. C., Winkle, M., E. 1996. *J. Bacteriol.* 178: 2388.
145. Fetherston, J. D., P. Schuetze, and R.D. Perry. 1992. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol.* 6: 2693-2704.
146. Fetherston, J.D. and Perry, R.D. 1994. The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. *Mol. Microbiol.* 13: 697-708.
147. Fields, P.L., Groisman, E.A. and Heffron, F. 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243: 1059-1062.
148. Findlay, B., and Falkow, S. 1997. Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* 61: 136-169.
149. Finlay, B., and Ruschkowski, S. 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* 99: 283-296.
150. Finlay, B.B. and Cossart, P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 276: 718-725.
151. Fischetti, V.A. 1989. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 285-314.

152. Fischetti, V.A., Pancholi, V. and Schneewind, O. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* 4: 1603-1605.
153. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O, Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., *et al.* 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* Jul28; 269(5223): 496-512.
154. Fleming, D., S., Campbell, P., A. 1997. Some macrophages kill *Listeria monocytogenes* while others do not. *Immunological Reviews.* 158: 69-77.
155. Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonal, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312: 404-407.
156. Fortnagel, P. 1993. Glycolysis. *In Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria.* A.L. Sonnenstein, J. Hoch and R. Losick, eds. p. 171-180. ASM Press.
157. Franco, A.,A., Cheng, R.,K., Chung, G.-T., Wu, S., Oh, H.-B., and Sears, C., L. 1999. Molecular Evolution of the Pathogenicity Island of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Strains. *J. Bacteriol.* 181(21): 6623-6633.
158. Fraser, G. 1962. A plate method for the rapid identification of *Listeria (Erysipelothrix) monocytogenes*. *Vet. Rec.* 74: 50-51.
159. Freitag, N.E. and Portnoy, D.A. 1994. Dual promoters of the *Listeria monocytogenes prfA* transcriptional activator appear essential *in vitro* but are redundant *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 12: 845-853.
160. Freitag, N.E., Rong, L. and Portnoy, D.A. 1993. Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 61: 2537-2544.
161. Freitag, N.E., Youngman, P. and Portnoy, D.A. 1992. Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 1293-1298.
162. Fünfstück, R., Tschäpe, H., Stein, G., Kunath, H., Bergner, M., and Wessel, G. 1986. Virulence properties of *E. coli* strains in patients with chronic pyelonephritis. *Infection* 14: 3-8.
163. Fuzi, M. and Pillis, Y. 1962. Production of opacity in egg-yolk medium by *Listeria monocytogenes*. *Nature (London)* 196:195.
164. Gaillard, J.-L. and Finlay, B.B. 1996. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect. Immun.* 64: 1299-1308.
165. Gaillard, J.-L., Berche, P. and Sansonetti, P. 1986. Transposón mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 52: 50-55.
166. Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. and Cossart, P. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive Cocci. *Cell* 65: 1127-1141.
167. Gaillard, J.-L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. and Sansonetti, P. 1987. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell Caco-2. *Infect. Immun.* 55: 2822-2829.
168. Gaillard, J.-L., Jaubert, F. and Berche, P. 1996. The *inlA/B* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes *in vivo*. *J. Exp. Med.* 183: 359-369.
169. Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., and Berche, S. 2000. The serine-protease ClpP is essential for the intracellular parasitism of the pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35: 1286-1294.
170. Garges, S. and Adhya, S. 1985. Sites of allosteric shift in the structure of the cyclic AMP receptor protein. *Cell* 41: 745-751.
171. Garges, S. and Adhya, S. 1988. Cyclic AMP-induced conformational change of cyclic AMP receptor protein (Crp): intragenic suppressors of cyclic AMP-independent Crp mutations. *J. Bacteriol.* 170: 1417-1422.
172. Gaston, K., Bell, A., Kolb, A. and Busby, S. 1990. Stringent spacing requirements for transcription activation by Crp. *Cell* 62: 733-743.
173. Gatt, S., Dinur, T., and Barenholz, Y. 1978. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta.* 530: 503-507.

174. Geginat, G., Lalic, M., Kretschmar, M., Goebel, W., Hof, H., Palm, D., and Bubert, A. 1998. Th1 cells specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*. *J. immunol.* **160**: 6046-6055.
175. Geginat, G., Nichterlein, T., Kretschmar, M., Schenk, S., Hof, H., Lalie-Mülthaler, M., Goebel, W., and Bubert, A. 1999. Enhancement of the *Listeria monocytogenes* p60-specific CD4 and CD8 T cell memory by nonpathogenic *Listeria innocua*. *J. Immunol.* **162**: 4781-4789.
176. Gentscher, I., Sokolovich, Z., Mollenkopf, H.J., Hess, J., Kaufmann, S.H., Kuhn, M., Krohne, G.F. and Goebel, W. 1995. *Salmonella* strain secreting active listeriolysin changes its intracellular localization. *Infect. Immun.* **63**: 4202-4205.
177. Geoffroy, C., Gaillard, J.-L., Alouf, J., and Berche, P. 1989. Production of thiol-dependent haemolysin by *Listeria monocytogenes* and related species. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 481-487.
178. Geoffroy, C., Gaillard, J.-L., Alouf, J.E. and Berche, P. 1987. Purification, characterization and toxicity of de sulfhydryl-activated haemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **55**: 1641-1646.
179. Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J.-L., Lecroisey, A., Vázquez-Boland, J.A., Alouf, J. and Berche, P. 1991. Purification and characterization of an extracellular 29-Kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **59**: 2382-2388.
180. Gerstel, B., Grobe, L., Pistor, S., Chakraborty, T. and Wehland, W. 1996. The ActA polypeptides of *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor related binding sites for host microfilament proteins. *Infect. Immun.* **64**: 1929-1936.
181. Gill, D.A. 1933. Circling disease: a meningoencephalitis of sheep in New Zeland. Notes on a new species of pathogenic organism. *Vet. J.* **89**: 258-270.
182. Gill, D.A. 1937. Ovine bacterial encephalitis (circling disease) and the bacterial genus *Listerella*. *Australian Vet. J.* **13**: 46-56.
183. Gilmore, A.P. and Burridge, K. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-biphosphate. *Nature* **381**: 531-535.
184. Goebel, W. and Kreft, J. 1997. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiol.* **5**: 86-88.
185. Goebel, W., Chakraborty, T., Domann, E., Köheler, S., Kuhn, M., Leimeister-Wächter, M., Sokolovic, Z. and Wuenscher, M. 1991. Studies on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. *Infect.* **19S**: 195-197.
186. Goethal, K., van Montagu, M., Holsters, M. 1992. Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 1646-1650.
187. Goldberg, M.B., Theriot, J.A. and Sansonetti, P.J. 1994. Regulation of presentation of IcsA, a *Shigella* protein essential to intracellular movement and spread, is growth phase dependent. *Infect. Immun.* **62**: 5664-5668.
188. Goldfine, H. and Knob, C. 1992. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect. Immun.* **60**: 4059-4067.
189. Goldfine, H., Knob, C., Alford, D. and Bentz, J. 1995. Membrane permeabilization by *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C is independent of phospholipid hydrolysis and cooperative with listeriolysin O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2979-2983.
190. Golsteyn, R.M., Beckerle, M., Koay, T. and Friederich, E. 1997. Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Sci.* **110**: 1893-1906.
191. González-Zorn, B., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Ripio, M.-T., Vega, Y., Novella, S., Rodríguez, A., Chico, I., Tierrez, A., and Vázquez-Boland, J.A. 2000. SmcL, a novel membrane-damaging virulence factor in *Listeria*. *Int. Med. Microbiol. Infect. Dis.* (in press).
192. González-Zorn, B., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Ripio, M.-T., Vega, Y., Novella, S., and Vázquez-Boland, J.A. 1999. The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol. Microbiol.* **33**(3): 510-523.
193. González-Zorn, B., Garrido, P., and Vázquez-Boland, J.-A. Unpublished results
194. Gottesmann, S., Wickner, S., and Maurizi, M.,R. 1997. Protein quality control; triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* **11**: 815-823.
195. Gouin, E., Dehoux, P., Mengaud, J., Kocks, C. and Cossart, P. 1995. *iactA* of *Listeria ivanovii*, although distantly related to *Listeria monocytogenes actA*, restores actin tail formation in an *L. monocytogenes actA* mutant. *Infect. Immun.* **63**: 2729-2737.

196. Gouin, E., Mengaud, J. and Cossart, P. 1994. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a non-pathogenic species. *Infect. Immun.* **62**: 3550-3553.
197. Gray, M.L. and Killinger, A.H. 1966. *Listeria monocytogenes* and *Listerial* infections. *Bact. Rev.* **30**: 309-382.
198. Green C.,J., Stewart G.,C, Hollins, M.,A., Vold, B.,S., Bott, K.,F. 1985. Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* ribosomal RNA operon, *rrnB*. *Gene* **37**:261-266.
199. Green C.,J., Vold BS. 1983. Sequence analysis of a cluster of twentyone tRNA genes in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **11**: 5763-5774.
200. Gregory, S. H., Wing, E. j. 1993. IFN- $\gamma$  inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J. immunol.* **151**:1401-1409.
201. Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J. and Wing, E.J. 1996. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells *in vivo*. *Infect. Immun.* **64**: 3983-3986.
202. Greiffenberg, L., Goebel, W., Sik kim, K. Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., and Kuhn. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with Human Brain Microvascular Endothelial Cells: InlB-Dependent Invasion, Long-Term Intracellular Growth, and Spread from Macrophages to Endothelial Cells. *Infect. Immun.* **66**: 5260-5267.
203. Greiffenberg, L., Sokolovic, Z., Schnittler, H.-J., Spory, A., Böckmann, R., Goebel, W., and Kuhn, M. 1997. *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 163-170.
204. Groisman, E. A., Ochman, H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.* **87**: 791-794
205. Groisman, E.A., and Ochman, H. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in Microbiol.* **5**: 343-349.
206. Groves, R.D. and Welshimer, H.J. 1977. Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three *in vitro* reactions. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 559-563.
207. Grutzkau, A., Hanski, C., Hahn, H. and Riecken, E.O. 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other invasive bacteria. *Gut* **31**: 1011-1015.
208. Guiney, D.G., Libby, S., Fang, F.C., Krause, M. and Fierer, J. 1995. Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends Microbiol.* **3**: 275-279.
209. Guzman, C.A., Rohde, M., Chakraborty, T., Domann, E., Hudel, M., Wehland, J. and Timmis, K.N. 1995. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* **63**: 3665-3673.
210. Haanes, E.J, Clearly, F.P. 1989. Identification of a divergent M protein gene and an M protein-related gene family in *Streptococcus pyogenes* serotype 49. *J Bacteriol.* **171**: 6397-6408.
211. Haas, A., Dumbsky, M. and Kreft, J. 1992. Listeriolysin genes: complete sequence of *ilo* from *Listeria ivanovii* and *Iso* from *Listeria seeligeri*. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**: 81-84.
212. Hacker, J., and Kaper, J. 1999. The concept of pathogenicity islands in : *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements*. ASM Press, pp. 1-11.
213. Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., and Goebel, W. 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vivo* and *in vitro* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathogen* **8**: 213-225.
214. Hacker, J., Blum-Oehler, G., Janke Britta, Nagy, G., and Goebel W. 1999. Pathogenicity islands of Extraintestinal *Escherichia coli*. in: *Pathogenicity islands and other Mobile Virulenc Elements*. ASM Press.; pp: 59-76
215. Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., Tschäpe, H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
216. Hage-Chahine, C.M., Giudice, G.D., Lambert, P.H. and Pechere, J.C. 1992. Hemolysin-producing *Listeria monocytogenes* affects the immune response to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens. *Infect. Immun.* **60**: 1415-1421.
217. Hahn, H. and Kaufman, S.H.E. 1981 The role of the cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 1221-1250.
218. Haima, P., D. van Sinderen, H. Schotting, S. Bron, and G. Venema. 1990. Development of a  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* **86**:63-69.

219. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
220. Hanawa, T., Yamamoto, T. and Kamiya, S. 1995. *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of protein induced by environmental stresses. *Infect. Immun.* 63: 4595-4599.
221. Harman, J.G., McKenney, K. and Peterkofsky, A. 1986. Structure-function analysis of three cAMP-independent forms of the cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* 261: 16332-16339.
222. Hartwing, J.H., Bokoch, G., Carpenter, C.L., Janmey, P. A., Taylor, L.A., Toker, A., and Stossel, T.P. 1995. Thrombin receptor ligation and activated rac uncaps actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell.* 82: 643-653.
223. Harty, J.T., and Pamer, E.,G. 1995. CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 154: 4642-4650.
224. Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., and Kuhn, M. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of P3888D<sub>1</sub> macrophages results in a biphasic NF- $\kappa$ B (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3994-3999.
225. Havell, E.A. 1986. Synthesis and secretion of interferon  $\alpha$  by murine fibroblasts in response to intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 54: 787-792.
226. Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., Wallace, J.C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6602-6606.
227. Hensel, M., Niokolous, T., and Egelseer, C. 1999. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 31: 489-498.
228. Hensel, M., Shea, J.,E., Bäumlner, A.,J., Gleeson, C., Blattner, F., and Holden, D.,W. 1997. Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179: 1105-1111.
229. Hespeling, U., Jungermann, K. and Puschel, G.P. 1995. Feedback-inhibition of glucagon-stimulated glycogenolysis in hepatocyte/Kupffer cell cocultures by glucagon-elicited prostaglandin production in Kupffer cells. *Hepatology.* 22: 1577-1583.
230. Hess, J., Dietrich, G., Gentschev, I., Miko, Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W., and Kaufmann, S.,H. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1458-1463.
231. Hess, J., Dreher, A., Gentschev, I., Goebel, W., Ladel, C. Miko, D. and Kaufmann, S.,H. 1996. Protein p60 participates in intestinal host invasion by *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl. Bakteriologie.* 284: 263-272.
232. Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W., and Kaufmann, S.,H. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 1458-1463.
233. Hess, J., Gentschev, Y., Szalay, G., Ladel, C., Bubert, A., Goebel, W. and Kaufmann, S.H.E: 1995. *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and *in vivo* survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 63: 2047-2053.
234. Higgins, J.A., Hitchin, B.W. and Low, M.G. 1989. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* as a probe for the distribution of phosphatidylinositol in hepatocyte membranes. *Biochem. J.* 259: 913-916.
235. Hitbold, B., and Ziegler, H.,K. 1994. Mechanisms of processing and presentation of the antigens of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Agents. Dis.* 2: 314-323.
236. Hitbold, B., Saffley, S.,A., and Ziegler, H.,K. 1996. The presentation of class I and class II epitopes of listeriolysin O is regulated by intracellular localization and by intercellular spread of *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 157: 1163-1175.
237. Hof, H. 1984. Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a. *Med. Microbiol. Immunol.* 173: 207-218.
238. Hof, H., and Hefner, P. 1988. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* 16 (Suppl 2): S141-S144.
239. Hou, Y.,M. 1999. Transfer RNAs and pathogenicity islands. *Trends Biochem Sci.* Review. 24(8): 295-298.
240. Hughes, B.P., Rye, K.-A., Pickford, L.B., Barritt, G.J. and Chalmers, A.H. 1984. A transient increase in diacylglycerols is associated with the action of vasopressin on hepatocytes. *Biochem. J.* 222: 535-540.

241. Huillet, E., Larpin, S., Pardon, and P., Berche, P. 1999. Identification of a new locus in *Listeria monocytogenes* involved in cellobiose-dependent repression of *hly* expression. *FEMS Microbiology Letters*. **174**: 265-272.
242. Hunter, R. 1973. Observations on *Listeria monocytogenes* type 5 (Iwanov) isolated in New Zealand. *Med. Lab. Technol.* **30**:51-56.
243. Inouye, S., sunshine, M.,G., Six, E.,W., and Inouye, M. 1991. Retronphage R73: and *E. coli* phage that contains a retroelement and integrates into a tRNA gene. *Science* **252**: 969-971.
244. Ireton, K. and Cossart, P. 1998. Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**: 276-283.
245. Ireton, K., and Cossart, P. 1997. Host-Pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Ann. Rev. Genet.* **31**:113-38.
246. Ireton, K., Payrastre, B., and Cossart, P. 1999. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**: 17025-17032.
247. Ireton, K., Payrastre, B., Chap, H.,Ogawa, W., Sakaue, G., Kasuga, M. and Cossart, P. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science*. **274**: 780-782.
248. Irvine A.S. and Guest, J.R. 1993. *Lactobacillus casei* contains a member of the Crp-FNR family. *Nucl. Acids Res.* **21**: 753.
249. Isberg, R. R., and Tran Van Nhieu, G. 1994. Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 395-422.
250. Ivanov, I. 1962. Untersuchungen über die Listeriose der Schafe in Bulgarien. *Monatsh. Veterinaermed.* **17**: 729-736.
251. Ivanov, I. 1975. Establishment of non-motile strains of *Listeria monocytogenes* type 5. In M. Woodbine (de.) Problems of listeriosis. Leicester University Press, Leicester. Pags.:18-26
252. Jensen V. B., Harty, J. T. and Jones B. D. 1998. Interactions of the Invasive Pathogens Salmonella typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M Cells and Murine Peyer's Patches. *Infect. Immun.***66**:3758-3766.
253. Jones, D. 1992. Current classification of the Genus *Listeria*. Libro de resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, p. 7-8. Copenague, Dinamarca.
254. Jones, S. and Portnoy, D.A. 1994. Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect. Immun.* **62**: 5608-5613.
255. Jones, S., Preiter, K. and Portnoy, D.A. 1996. Conversion of an extracellular cytolysin into a phagosome-specific lysin which supports the growth of an intracellular pathogen. *Mol. Microbiol.* **21**: 1219-1225.
256. Jonquières, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., and Cossart, P. 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **34**(5): 902-914.
257. Kajava, A.,V. 1998. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **277**: 519-527.
258. Kampelmacher, E. H., and Van Noorle Jansen, L. M: 1980. Listeriosis in humans and animals in the Neetherlands (1957-1977). *Zbl. Bakt. Hyg., Abt. I, Orig.* **A246**:211-227.
259. Karaolis, D.,K.,R., Johnson, J.,A., Bailey, C.,C., Boedeker, E.,C., and Kaper, J.,B. 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 3134-3139.
260. Karen E. *et al.* 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323-329.
261. Karunasagar, I., Lampidis, R., Goebel, W., and Kreft, J. 1997. Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 303-310.
262. Karunasagar, Y., Krohne, G. and Goebel, W. 1993. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect. Immun.* **61**: 162-169.
263. Karunasagar, Y., Senghaas, B., Krohne, G. and Goebel, W. 1994. Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**: 3554-3558.

264. Kathariou, S. and Pine, L. 1991. The type strain(s) of *Listeria monocytogenes*: a source of continuing difficulties. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 41: 328-330.
265. Kathariou, S., Metz, P., Hof, H. and Goebel, W. 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 169: 1291-1297.
266. Kathariou, S., Pine, L., George, V., Carlone, G.M. and Holloway, B.P. 1990. Nonhemolytic *Listeria monocytogenes* mutants that are also noninvasive for mammalian cells in culture: evidence for coordinate regulation of virulence. *Infect. Immun.* 58: 3988-3995.
267. Kathariou, S., Rocourt, J., Hof, H. and Goebel, W. 1988. Levels of *Listeria monocytogenes* hemolysin are not directly proportional to virulence in experimental infections of mice. *Infect. Immun.* 56: 534-536.
268. Kaufmann, S.H.E. 1988. Listeriosis: new findings-current concer. *Microb. Pathog.* 5: 225-231.
269. Kaufmann, S.H.E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 129-163.
270. Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, c., Memet, S., Israel, A., and Berche, P. 1990. Listeriolysin O-dependen activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*; activation of NF- $\kappa$ B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol. Microbiol.* 31: 1709-1722.
271. Kennedy, P. C., and Miller, R. B. 1993. *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 3. 4<sup>th</sup> edn. Eds. K.V.F. Jubb, P. C. Kennedy, N. Palmer. New York, Academic Press. p405.
272. Khan, M.A., Seaman, A. and Woodbine, M. 1972. *Listeria monocytogenes*-haemolysin: lecithinase. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 19: 341-352.
273. Kim, J., Adhya, S. and Garges, S. 1992. Allosteric changes in the cAMP receptor protein of *Escherichia coli*: hinge reorientation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9700-9704.
274. Klarsfeld, A.D., Goossens, P.L. and Cossart, P. 1994. Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol. Microbiol.* 13: 585-597.
275. Knapp, S. and Mekalanos, J.J. 1988. Two *trans*-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 170: 5059-5066.
276. Knapp, S., Hacker, J., Jarchau, T., Goebel, W. 1986. Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J. Bacteriol.* 168: 22-30.
277. Kobe, B., Deisenhofer, J. 1994. The leucine-rich repeat: aversatile bindin motif. *Trends biochem. Sci.* 19:415-421.
278. Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. and Cossart, P. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the ActA gene product, a surface protein. *Cell* 68: 521-531.
279. Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H. and Cossart, P. 1993. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J. Cell Sci.* 105: 699-710.
280. Kocks, C., Marchand, J.-B., Gouin, E., d'Hauteville, H., Sansonetti, P.J., Carlier, M.-F. and Cossart, P. 1995. The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol. Microbiol.* 18: 413-423.
281. Kohbata, S., Yokoyama, H. and Yabuuchi. 1986. Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol. Immunol.* 30: 1225-1237.
282. Kohler, C., Leimeister-Wächter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F. and Goebel, W. 1990. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 58: 1943-1950.
283. Köhler, S., Teyssier, J., Cloeckeaert, A., Rouot, B. and Liautard, J.P. 1996. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol. Microbiol.* 20: 701-712.
284. Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. and Adhya, S. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 749-795.
285. Kolesnick, R.,N., and Krönke. 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 643-665.
286. Kowarz, L., Coynault, C., Robbe-Saule, V. and Norel, F. 1994. The *Salmonella typhimurium kat* (*rpoS*) gene: cloning, nucleotide secence, and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. *J. Bacteriol.* 176: 6852-6860.

287. Kreft, J., Bohne, J., Gross, R., Kestler, H., Sokolovic, Z. and Goebel, W. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by the transcriptional regulator PrfA. *In* Signal transduction and bacterial virulence, R. Rappuoli, V. Scarlato and B. Arico eds. R.G. Landes Company, Austin, TX. pp.129-142.
288. Kreft, J., D. Funke, R. Schlesinger, F. Lottspeich, and W. Goebel. 1989. Purification and characterization of cytolysins from *Listeria monocytogenes* serovar 4b and *Listeria ivanovii*. *Acta Microbiol. Hung.* **36**:189-192
289. Kreft, J., Dumbsky, M. and Theiss, S. 1995. The actin polymerization protein from *Listeria ivanovii* is a large repeat protein which shows only limited amino acid sequence to ActA from *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**: 113-122.
290. Kreft, J., Schlesinger, R., Weber, M., and Goebel, W. 1990. Characterization of Hemolysin-Mutants of *Listeria ivanovii*. Rappuoli et al. (Eds.). *Bacterial Protein Toxins. Zbl. Bakt. Suppl.* 1<sup>st</sup>. Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
291. Kreft, J., Vázquez-Boland, J.-A., Eva, Ng., Goebel, W. 1999. Virulence Gene Cluster and Putative Pathogenicity Islands in *Listeriae*. Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. Edited by J. B. Kaper and J. Hacker. ASM, Washington, D. C.
292. Krüll, M., Nost, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Suttorp, N. 1997. *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* **159**: 1970-1976.
293. Kuhn, M. and Goebel, W. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* **57**:55-61.
294. Kuhn, M. and Goebel, W. 1995. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet. Engin.* **17**: 31-51.
295. Kuhn, M. and W. Goebel 1994. Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect. Immun.* **62**: 348-356.
296. Kuhn, M., Kathariou, S. and Goebel, W. 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **56**: 79-82.
297. Kuhn, M., Prevost, M.-C., Mounier, J. and Sansonetti, P.J. 1990. A nonvirulent mutant of *Listeria monocytogenes* does not move intracellularly but still induces polymerization of actin. *Infect. Immun.* **58**: 3477-3486.
298. Kunst, F. et al. 1997. The complete genome sequence of the gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**: 249-256.
299. Kuspsch, E.M., Knepper, B., Kuroki, T., Heuer, I., Meyer, T.F. 1993. Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes epithelial cells. *EMBO J.* **12**: 641-650.
300. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
301. Lampidis, R., Emmerth, M., Karunasagar, I., and Kreft, J. The virulence gene cluster from *Listeria seeligeri* contains large insertions and a partial gene duplication. Unpublished data.
302. Lampidis, R., R. Gross, Z. Sokolovic, W. Goebel and J. Kreft, 1994. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcriptional regulators. *Mol. Microbiol.* **13**: 141-151
303. Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
304. Lane, F.C. and Unanue, E.R. 1972. Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis. *J. Exp. Med.* **135**: 1104.
305. Lasa, I., Dehoux, P. and Cossart, P. 1998. Actin polymerization and bacterial movement. *Biochim. Biophys Acta* **1402**: 217-228.
306. Lasa, I., Gouin, E., Goethals, M., Vancompernelle, K., David, V., Vandekerckhove, J. and Cossart, P. 1997. Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **16**: 1531-1540.
307. Lasa, Y., David, V., Gouin, E., Marchand, J.-B. and Cossart, P. 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol. Microbiol.* **18**: 425-436.
308. Lawrence, J.G., and Ochman, H. 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9413-9417.

309. Lawrence, J.G., and Roth, J.R. 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* **143**: 1843-1860.
310. Lebrun, M., Mengaud, J., Ohayon, H., Nato, F. and Cossart, P. 1996. Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **21**: 579-592.
311. LeClerc, J. E., L. Baoguang, W. L. Payne, and T. A. Cebula. 1996 High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science*. **274**:1208-1210
312. Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner B., Cossart, P. 1999. A single amino acid in E.cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **18**(14): 3956-3963.
313. Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., and Cossart, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with and intact leucine-rich-repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* **65**: 5309-5319.
314. Lee, C., A. 1996. Pathogenicity islands and evolution of bacterial pathogens. *Infect. Agents. Dis.* **5**: 1-7.
315. Lefford, M.J., Warner, S. and Amell, L. 1979. *Listeria* pneumonitis: influence of route immunization on resistance to airborne infection. *Infect. Immun.* **25**: 672-679.
316. Leimeister-Wächter, M., Domann, E. and Chakraborty, T. 1991. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **5**: 361-366.
317. Leimeister-Wächter, M., Domann, E. and Chakraborty, T. 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174**: 947-952.
318. Leimeister-Wächter, M., Goebel, W. and Chakraborty, T. 1989. Mutations affecting hemolysin production in *Listeria monocytogenes* located outside the listeriolysin gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 23-30.
319. Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W. and Chakraborty, T. 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 8336-8340.
320. Lengeler, J.W., Jahreis, K. and Wehmeier, U.F. 1994. Enzymes II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1188**: 1-28.
321. Lessing, M.P., Curtis, G.D. and Bowler, I.C. 1994. *Listeria ivanovii* infection. *J. Infect.* **29**: 230-231.
322. Lindsay, J.,A., Ruzin, A., Ross, H.,F., Kurepina, N., and Novick, R.,P. 1998. The gene for toxin shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **29**(2): 527-543.
323. Lingnau, A., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. and Wehland, J. 1996. Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect. Immun.* **64**: 1002-1006.
324. Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J. and Chakraborty, T. 1995 Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and-independent mechanisms. *Infect. Immun.* **63**: 3896-3903.
325. Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A. and Broome, C.V. 1988. Epidemiologic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* **319**: 823-828.
326. Lorber, B. 1997. Listeriosis: State-of- the-art clinical article. *Clinical Infectious Diseases.* **24**:1-11.
327. Low, J. C., Wright, F., McLauchlin, J., and Donachie, W. 1993. Serotyping and distribution of *Listeria* isolates from cases of ovine listeriosis. *Vet. Record.* **133**: 165-166.
328. Low, M.G. and Sltiel, A.R. 1988. Structural and funtional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science* **239**: 268-275.
329. Lowe, T.,M., Eddy, S.,R. 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucl. Acids Res.* **25**: 955-964.
330. Lu, M. and Kleckner, N. 1994. Molecular cloning and characterization of the *pgm* gene encoding phosphoglucomutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 5847-5851.
331. MacDonald, T.T. and Carter, P.B. 1980. Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect. Immun.* **28**: 516-523.
332. MacInnes, J., Kim, J., Lian, C.-L. and Soltes, G. 1990. *Actinobacillus pleuropneumoniae hlyX* gene homology with the *fnr* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 4587-4592.

333. MacKanness, G.B. 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* **166**: 381-406.
334. MacKanness, G.B. 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* **120**: 105-120.
335. MacLeod, N. S. M., and Watt, J. A. 1974. *Listeria monocytogenes* type 5 as a cause of abortion in sheep. *Vet. Rec.* **95**:365-367.
336. Mager, W.H. and De Kruijff, A.J.J. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* **59**: 506-531.
337. Magnusson, I., Rothman, D.L., Jucker, B., Cline, G.W., Shulman, R.G. and Shulman, G.I. 1994. Liver glycogen turnover in fed and fasted humans. *Am. J. Physiol.* **266**: 796-803.
338. Malorny, B., Morelli, G., kusecek, B., Kolberg, J., Achtman, M. 1998. Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. *J. Bacteriol.* **180**: 1323-1330.
339. Marck, C. 1988. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic. Acids. Res.* **16**: 1829-1836.
340. Marco, A., Altamira, J., Prats, N., López, S., Domínguez, L., Domingo, D. and Briones, V. 1997. Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microb. Pathog.* **23**:255-263.
341. Marco, A.J., Prats, N., Ramos, J.A., Briones, V., Blanco, M. Domínguez, L. and Domingo, M. 1992. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *L. monocytogenes* in mice. *J. Comp. Pathol.* **107**: 1-9.
342. Marquis, H., Bouwer, H.G.A., Hinrichs, D.J. and Portnoy, D.A. 1993. Intracitoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect. Immun.* **61**: 3756-3760.
343. Marquis, H., Doshi, V. and Portnoy, D.A. 1995. The broad-range phospholipase C and metalloprotease mediate listeriolysin-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.* **63**: 4531-4534.
344. Martin, E.D., Gothard, W.P., Levine, D.F. 1994. *Listeria ivanovii* infection. *J. Infect.* 1994. **29**(2): 230-31.
345. Massillon, D., Bollen, M., De Wulf, H., Overloop, K., Vastapel, F., Van Hecke, P. and Stalmans, W. 1995. Demonstration of a glycogen/glucose-1-phosphate cycle in hepatocytes from fasted rats. *J. Biol. Chem.* **270**: 19351-19356.
346. Matic, I., Radman, M., Taddei, F., Picard, B., Doit, C., Bingen, E., Denamur, E., Elion, J. 1997. Highly Variable Mutation Rates in Commensal and Pathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **277**: 1833:1834.
347. Matic, I., Rayssiguier, D., Radman, M. 1995. *Cell.* **80**: 507
348. Maurelli, A.,T., Fernández, R.,E., Bloch, C.,A., Rode, C.,K., and Fasano, A. 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 3943-3948.
349. Maurelli, A.T. and Sansonetti, P.J. 1988. Identification of a chromosomal gene controlling temperature-regulated expression of *Shigella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2820-2824.
350. McDaniel, T.,K., Jarvis, K.,G., Donnenberg, M.,S., and Kaper, J.,B. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 1664-1668.
351. Mecsas, J., and Strauss, E.,J. 1996. Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerging Infect. Dis.* **2**: 271-288.
352. Mekalanos, J.J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 1-7.
353. Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. 1986 Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 663-700.
354. Mengaud, J., Braun-Breton, C. and Cossart, P. 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol. Microbiol.* **5**: 367-272.
355. Mengaud, J., Chevenert, J., Geoffroy, C., Gaillard, J.-L. and Cossart, P. 1987. Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect. Immun.* **55**: 3225-3227.
356. Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vázquez-Boland, J.A., Milon, G. and Cossart, P. 1991. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**: 2273-2283.

357. Mengaud, J., Geoffroy, C. and Cossart, P. 1991. Identification of an operon involved in virulence of *Listeria monocytogenes*: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* 59: 1043-1049.
358. Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M. and Cossart, P. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84: 923-932.
359. Mengaud, J., Vicente, M.F. and Cossart, P. 1989. Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes hly* region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infect. Immun.* 57: 3695-3701.
360. Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Pérez-Díaz, J.C. and Cossart, P. 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 56: 766-772.
361. Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M. and Youngman, P. 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 23: 1075-1085.
362. Miliotis, M.D., Koornhof, H.J. and Phillips, J.I. 1989. Invasive potential of noncytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli* in an *in vitro* Henle 407 cell model. *Infect. Immun.* 57: 1928-1935.
363. Miller, J.F., Mekalanos, J. and Falkow, S. 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* 243: 916-922.
364. Modrich, P. 1991. Mechanisms and biological effects of mismatch repair *Ann. Rev. Genet.* 25: 229-253.
365. Moncrief, J.S., Duncan, A.J., Wright, R.L., Baroso, L.A., and Wilkings, T.D. 1998. Molecular characterization of the fragilysin pathogenicity islet of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* 66: 1735-1739.
366. Morschhäuser, J., Vetter, V., Emödy, L., and Hacker, J. 1994. Adhesin regulatory genes within large, unstable DNA regions of pathogenic *Escherichia coli*: cross-talk between different adhesin gene clusters. *Mol. Microbiol.* 11: 555-566.
367. Moss, J.E., Cardoza, T.J., Zychlinsky, A., and Groisman, E.A. 1999. The *selC*-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 33: 74-83.
368. Mourrain, P., Lasa, I., Gautreau, A., Gouin, E., Pugsley, A. and Cossart, P. 1997. ActA is a dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10034-10039.
369. Murray, E.G.D., Webb, R.E. and Swann, M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed *Bacillus monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 407-439.
370. Myers, E.R., Dallmier, A.W. and Martin, S.E. 1993. Sodium chloride, potassium chloride, and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2082-2086.
371. Nair, S., Debré, I., Msadek, T., Gaillot, O., and Berche, P. 2000. CtsR is a repressor of the class heat shock genes in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* (in press).
372. Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, v., and Berche, P. 1999. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 31: 185-196.
373. Nakazawa, M. and Nemoto, H. 1980. Synergistic hemolysis phenomenon of *Listeria monocytogenes* and *Corynebacterium equi*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42: 603-607.
374. Navarre, W.W., and Schneewind, O. 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTGX motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 14: 115-121.
375. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Third Edition; Approved Standard. 1993. Document M7-A3. 13(25).
376. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 1994. Document M100-S5. 14(16).
377. Nelson, G. J. 1967. Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. *Biochim Biophys Acta.* 144: 221-232
378. Niebuhr, K., Chakraborty, T., Rohde, M., Gazlig, T., Jansen, B., Köllner, P., and Wehland, J. 1993. Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets". *Infect. Immun.* 61: 2793-2802.
379. Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J. and Chakraborty, T. 1997. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* 16: 54333-5444.

380. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Bunak, S., and von Heijne, Gunnar. 1997. Identification of prokaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*. **10**: 1-6.
381. Nieman, R.E. and Lorber, B. 1980. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature 1968-1978. *Rev. Infect. Dis.* **2**: 207-227.
382. Nishibori, T., Xiong, H., Kawamura, I., Arakaca, M., and Mitsuyama, M. 1996. Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infect. Immun.* **64**: 3188-3195.
383. Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-614.
384. North, R.J. 1970. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infections. *J. Exp. Med.* **132**: 521-534.
385. North, R.J. 1978. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* **121**: 806-809.
386. Notermans, S.H.W., Dufrenne, J., Leimeister-Wächter, M., Domann, E. and Chakraborty, T. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2666-2670.
387. Novella, S., and Vázquez-Boland, J.-A. Unpublished results.
388. Nowack-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J.S., Gould, S.J., and Joyce E. Loper. 1999. Characterization of the Pyoluteorin Biosynthetic Gene Cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **181** (7): 2166-2174.
389. Nyfeldt, A. 1929. Etiologie de la mononucléose infectieuse. *C. R. Soc. Biol.* **101**: 590.
390. O'Byrne, C.P. and Dorman, C.J. 1994. The *spv* virulence operon of *Salmonella typhimurium* LT2 is regulated negatively by the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein system. *J. Bacteriol.* **176**: 905-912.
391. O'Byrne, C.P., and Dorman C.J. 1994. The *spv* Virulence Operon of *Salmonella typhimurium* LT2 Is regulated Negatively by the Cyclic AMP (cAMP)-cAMP Receptor Protein System. *J. Bacteriol.* **176**(3): 905-912.
392. Ochman, H., F., Soncini, F.,C., Solomon, F., and Groisman, E.,A. 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7800-7804.
393. Ochman, H., Soncini, F.,C., Solomon, F., and Groisman, E.,A. 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7800-7804.
394. Oelmüller, U., Krüger, N., Steinbüchl, A. and Friedrich, C.G. 1990. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microb. Meth.* **11**: 73-84.
395. Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Reichardt, W., Witte, W., Götz, F., and Hacker, J. 1999. Mobile Elements, Phages, and Genomics Islands of *Staphylococci* and *Streptococci*. In: Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. Edited by J. B. Kaper and J. Hacker. ASM, Washington, D. C. Chap. **14**: 265-287.
396. Osebold, J.W. and Inouye, T. 1954. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural host. I. Rabbit studies. *J. Infect. Dis.* **95**: 52-66.
397. Osebold, J.W. and Inouye, T. 1954. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural host. II. Sheep studies. *J. Infect. Dis.* **95**: 67-78.
398. Ott, M. 1993. Dynamics of the Bacterial Genome: Deletions and Integrations as Mechanisms of Bacterial Virulence Modulation. *Zbl. Bakt.* **278**: 457-468.
399. Parida, S., K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion to *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **28**: 81-93.
400. Park, J., Lee, Y., Lim, Y., Kwon, S., Lee, C., and Yoon, B. 2000. Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein in Caco.2 Cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 35-40.
401. Park, S.F. 1994. The repression of listeriolysin O expression in *Listeria monocytogenes* by the phenolic  $\beta$ -D-glucoside, arbutin. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 258-260.
402. Park, S.F. and Kroll, R.G. 1993. Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **8**: 653-661.

403. Park, S.F. and Stewart, G.S.A.B. 1990. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* 94: 129-132.
404. Parker, C. and Hutkins, R.W. 1997. *Listeria monocytogenes* Scott A transports glucose by high-affinity and low-affinity glucose transport systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 543-546.
405. Patte, J.-C. Biosynthesis of Threonine and Lysine. *Cipto.* 32: 528-541.
406. Peel, M., Donachie, W. and Shaw, A. 1988. Temperature-dependent expression of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western blotting. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2171-2178.
407. Pelech, S.L. and Sanghera, J.S. 1992. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 17: 233-238.
408. Perna, N.T., Mayhew, G.,F., Posfai, G., Elliot, S., Donnenberg, M.,S., Kaper, J.,B., and Blattner, F.,R. 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66: 3810-3817.
409. Piffaretti, J.-C., Kresserbuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J.M., Selander, R.K. and Rocourt, J. 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3818-3822.
410. Pine, L., Weaver, R.E., Carlone, G.M., Pienta, P.A., Rocourt, J., Goebel, W., Kathariou, S., Bibb, W.F. and Malcolm, G.B. 1987. *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 and NCTC 7973 contain a nonhemolytic, nonvirulent variant. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2247-2251.
411. Pirie, J.H.H. 1927. New diseases of veld, rodents, "Tiger River Dsease" *Publ. S. African. Inst. Med. Research.* 3: 163-186.
412. Pirie, J.H.H. 1940. The genus *Listerella Pirire*. *Science* (Washintong) 91: 383.
413. Pistor, S., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. and Wehland, J. 1994. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 13: 758-763.
414. Pistor, S., Chakraborty, T., Walter, U. and Wehland, J. 1995. The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr. Biol.* 5: 517-525.
415. Podbielski, A., Krebs, B., Kaufhold, A. 1994. Genetic variability of the *emm*-related gene of the large *vir* regulon of group A streptococci: potential intra- and intergenomic recombination events. *Mol. Gen. Genet.* 243: 691-698.
416. Portnoy, D.A. 1992. Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 20-24.
417. Portnoy, D.A. 1994. Cellular biology of *Listeria monocytogenes* infection. In *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis*, p. 279-293. V.L. Miller, J.B. Kaper, D.A. Portnoy and R.R. Isberg eds. American Society for Microbiology, Washington, USA.
418. Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W. and Cossart, P. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60: 1263-1267.
419. Portnoy, D.A., Jacks P.S. and Hinrichs, D. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *L. monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167: 1459-1471.
420. Portnoy, D.A., Schreiber, R.D., Connelly, P. and Tilney. 1989. Gamma interferon limits access of *L. monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J. Exp. Med.* 170: 2141-2146.
421. Portnoy, D.A., Tweter, R., Kehoe, M. and Bielecki, J. 1992. Capacity of listeriolysin, streptolysin O and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. *Infect. Immun.* 60:2710-2717.
422. Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
423. Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, Y. and Berche, P. 1993. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 61: 1576-1580.
424. Pradel, E. and Boquet, P.L. 1988. Acid phosphatase of *Escherichia coli* molecular cloning and analysis of *agp*, the structural gene for a periplasmic acid glucose phosphatase. *J. Bacteriol.* 170: 4916-4923.
425. Pradel, E. and Boquet, P.L. 1989. Mapping of the *Escherichia coli* acid glucose-1-phosphatase gene *agp* and analysis of its expression *in vivo* by use of a *agp-phoA* protein fusion. *J. Bacteriol.* 171: 3511-3517.

426. Pradel, E. and Boquet, P.L. 1991. Utilization of exogenous glucose-1-phosphate as a source of carbon or phosphate by *Escherichia coli* K12: respective roles of acid glucose-1-phosphatase, hexose-phosphate permease, phosphoglucomutase and alkaline phosphatase. *Res. Microbiol.* **142**: 37-45.
427. Prévot, S. 1961. *Traité de Bacteriologie systematique*. Dunod, Paris. **2**: 31.
428. Promadej, N., Fiedler, F., Cossart, P., Dramsi, S., and Kathariou, S. 1999. Cell Wall Teichoic Acid Glycosylation in *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Requires *glcA*, a Novel, Serogroup-Specific Gene. *J. Bacteriol.* **181**(2): 418-425.
429. Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J. P., Berche, P. and Gaillard, J. L. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect. Immun.* **66**:747-755.
430. Racz, P., Tenner, K. and Merö, E. 1972. Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab. Invest.* **26**: 694-700.
431. Racz, P., Tenner, K. and Szivessy, K. 1970. Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa. I. Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelia cells. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **17**: 221-236.
432. Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S. H. E., and Goebel, W. 1998. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet.* **260**: 144-158.
433. Rajakumar, K., Sasakawa, C., and Adler, B. 1997. Using a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect. Immun.* **65**: 4606-4614.
434. Rakin, A., Noelting, C., Schubert, S., and Heesemann, J. 1999. Common and Specific Characteristics of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **67**(10): 5265-5274.
435. Ralovich, B., Emödy, L. and Merö, E. 1972. Biological properties of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **19**: 323-326.
436. Rasmussen, O.F., Beck, T., Olsen, J.E., Dons, L. and Rossen, L. 1991. *Listeria monocytogenes* isolates can be classified into two major types according to the sequence of the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* **59**: 3945-3951.
437. Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J.-L., Gaillard, J.-L., Alouf, J.E. and Berche, P. 1992. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.* **60**: 916-921.
438. Ray, W.J., Jr. and Peck, E.J., Jr. 1972. Phosphoglucomannomutase. *In* The enzymes, p. 407-477 P.D. Boyer ed., vol. 6. Academic Press, New York.
439. Rayssiguier, D., Thaler, S., Radman, M. 1989. *Nature*. **342**:396
440. Recsei, P.A., Gruss, A.D., and Novick, R.P. 1987. Cloning sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 1127-1131.
441. Reed, L.,J., and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Am J. Hyg.* **27**: 493-497.
442. Renzoni, A., Karsfeld, A., Dramsi, S., and Cossart, P. 1997. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* **65**, 1515-1518.
443. Richaud, C., Richaud, F., Martin, D., Haziza, C., and Patte, J.-C. 1984. Regulation of expression and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dapD* gene. *J. bio. Chem.* **259**: 14824-14828.
444. Ripio, M.-T., G. Domínguez-Bernal, M. Lara, M. Suárez, and J.-A. Vázquez-Boland. 1997. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes* *J. Bacteriol.* **179**:1533-1540.
445. Ripio, M.-T., G. Domínguez-Bernal, M. Suárez, K. Brehm, P. Berche, and J.-A. Vázquez-Boland. 1996. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res. Microbiol.* **147**:371-384.
446. Ripio, M.-T., Geoffroy, C., Domínguez, G., Alouf, J.E., and Vázquez-Boland, J.A. 1995. The sulphhydryl-activated cytolysin and a sphingomyelinase C are the major membrane-damaging factors involved in cooperative (CAMP-like) haemolysis of *Listeria* spp. *Res. Microbiol.* **146**: 303-313.
447. Ripio, M.-T., K. Brehm, M. Lara, M. Suárez, and J.-A. Vázquez-Boland. 1997. Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J. Bacteriol.* **179**:7174-7180.

448. Ripio, M.T., Vázquez-Boland, J.A., Vega, Y., Nair, S., Berche, P. 1998. Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**: 45-50.
449. Ripio, M.-T., Vega, Y., Novella, S., González-Zorn, B., Domínguez-Bernal, G., Rodríguez, S., Suárez, M. and Vázquez-Boland, J.A. 1998. La utilización de hexosas-fosfato por *Listeria monocytogenes* está controlada positivamente por el regulador central de la virulencia PrfA. Comunicación oral. II Reunión del Grupo de Microbiología Molecular de la SEM. Univ. Valencia. Spain. 20-23 Julio.
450. Ritter, A., Blum, G., Emödy, L., Kerenyi, L., Böck, A., Neuhierl, B., Rabsch, W., Scheutz, F., and Hacker, J. 1995. tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **17**: 109-121.
451. Rocourt, J and Catimel, B. 1985. Caractérisation biochimique des espèces du genre *Listeria*. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* **260**: 221-231.
452. Rocourt, J. 1988. Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection.* **16**: 89-91
453. Rocourt, J. and Grimont, P.A.D. 1983. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 866-869.
454. Rocourt, J. and Seeliger, H. P. R. 1985: Distribution des espèces du genre *Listeria*. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A* **259**: 317-330.
455. Rocourt, J. and Seeliger, H.P.R. 1987. Is haemolysis an *in vitro* marker of the pathogenic strains of the genus *Listeria*? *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **138**: 277-279.
456. Rocourt, J. Audurier, A., Courtieu, A.L., Durst, J., Ortel, S., Schrettenbrunner, A. and Taylor, A.G. 1985. A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. Hyg. A*, **259**: 489-497.
457. Rocourt, J., Alonso J.-M. and Seeliger, H.P.R. 1983. Virulence comparée des cinq groupes génomiques de *Listeria monocytogenes (sensu lato)*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. **134A**: 359-364.
458. Rocourt, J., and Cossart, P. *Listeria monocytogenes. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Edited by Michael P. Doyle, Larry R. Beuchat and Thomas J. Montville. *Caplo.* **18**: 337-352.
459. Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacket, C. and Piffaretti, J.C. 1992. Assignement of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 171-174.
460. Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P.A.D. and Seeliger, H.P.R. 1982. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes sensu lato*. *Curr. Microbiol.* **7**: 383-388.
461. Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, R., Malinverni, R. and Bille, J. 1986. Méningite purulente aigue à *Listeria seeligeri* chez un adulte immuno-compétent. *Schweiz. Med. Wochenscr.* **116**: 248-251.
462. Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, R., Malinverni, R. and Bille, J. 1986. Virulence modérée d'une souche humaine de *Listeria seeligeri*. *In Proceedings of the 9th International Symposium on the Problems of Listeriosis*, p. 266-270. A.-L. Courtieu, E.P. Espaze and A.E. Reynaud eds. Nantes, Francia.
463. Rocourt, J., Schrettenbrunner, A. and Seeliger, H.P.R. 1983. Differentiation biochimique des groupes génomiques de *Listeria monocytogenes (sensu lato)*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **134A**: 65-71.
464. Rocourt, J., Wehmeyer, U. and Stackebrandt, E. 1987. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 266-270.
465. Rocourt, J., Wehmeyer, U., Cossart, P. and Stackebrandt, E. 1987. Proposal to retain *Listeria murrayi* and *Listeria grayi* in the genus *Listeria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 298-300.
466. Rogers, H. W., Unanue, E. R. 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* **61**: 5090-5096.
467. Rosen, H., Gordon, S. and North, R.J. 1989. Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in nonphagocytic cells. *J. Exp. Med.* **170**: 27-37.
468. Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J., N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, H., R. 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 819-829.

469. Rosenshine, I., Tang, P., and Findlay, B.,B. 1994. *Listeria monocytogenes*, an invasive bacterium, stimulates MAP kinases upon attachment to epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* **5**: 455-464.
470. Rouquette, C. and Berche P. 1996. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. *Microbiol. SEM* **12**: 245-258.
471. Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S., and Berche, P. 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting escape from the phagosome of macrophages. *Mol. Microbiol.* **27**:1235-1245.
472. Rouquette, C., Ripio, M.T., Pelligrini, E., Bolla, J.M., Tascón, R., Vázquez-Boland, J.A., and Berche, P. 1996. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **21**: 977-987.
473. Ruhland, G.J., Hellwig, M., Wanner, G. and Fiedler, F. 1993. Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60 detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. *J. Gen. Microbiol.* **139**:609-616.
474. Safley, S.,A., Cluff, C.,W., Marshall, N.,E., and Ziegler, H.,K. 1991. Role of listeriolysin O in the T lymphocyte response to infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **146**: 3604-3616.
475. Sallen, B., Rajoharison, S., Desverenne, S., Quinn, F., and Mabilat, C. 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 669-674.
476. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
477. Sanchez, Y. and Lindquist, S.L. 1990. Hsp104 is required for thermotolerance. *Science.* **248**: 1112-1115.
478. Sánchez-Campillo, M., Dramsi, S., Gómez-Gómez, J.M., Michel, E., Dehoux, P., Cossart, P., Baquero, F. and Pérez-díaz, J.C. 1996. Modulation of DNA topology by *flaR*, a new gene from *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **18**: 801-811.
479. Sanger, J.M., Sanger, J.W. and Southwick, F.S. 1992. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **60**: 3609-3619.
480. Sansonetti, P.J., Arondel, J., Fontaine, H., d'Hauteville, H. and Bernardini, M.L. 1991. OmpB (osmo-regulation) and IcsA (cell-to-cell spreading) mutants of *Shigella flexneri*: vaccine candidates and probes to study the pathogenesis of shigellosis. *Vaccine* **9**: 416-422.
481. Saxe, S. and Revzin, A. 1979. Cooperative binding to DNA of catabolite activator protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **18**: 255-263.
482. Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
483. Schirmer, E.,C., Glover, J.,R., Singer, M.,A., and Lindquist, S. 1996. HSP-100/Clp proteins; a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 289-296.
484. Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W, Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**: 203-206.
485. Schleicher, J. and Urbaneck, D. 1966. Experimental listeriosis in domestic and laboratory animals. X. Reproduction of cerebral listeriosis in sheep. *Arch. Exp. Vet. Med.* **20**: 23-48.
486. Schlüter, D., Chahoud, S., Lassmann, H., Schuman, A., Hof, H., and Deckert-Schlüter. 1996. Intracerebral targets and immunomodulation of murine *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**: 14-24.
487. Schmidt, M. and Holmes, R.K. 1993. Analysis of diphtheria toxin repressor-operator interactions and characterization of a mutant repressor with decreased binding activity for divalent metals. *Mol. Microbiol.* **9**: 173-181.
488. Schubert, S., Rakin, A., Karch, E., Carniel, E., and Heesemann, J. 1998. Prevalence of the "High-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* **66**: 480-485.
489. Schuchat, A., Swaminathan, B. and Broome, C.V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 169-183.
490. Schultz, E.W., Terry, M.C., Brice, A.T. and Gebhardt, L.P. 1934. Bacteriological observation on a case of meningoencephalitis. *Proc. Soc. Biol. Med.* **31**: 1021-1023.
491. Schütze, s., Machleidt, T., and Krönke, M. 1994. The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J. Leukocyte Biol.* **56**: 533-541.

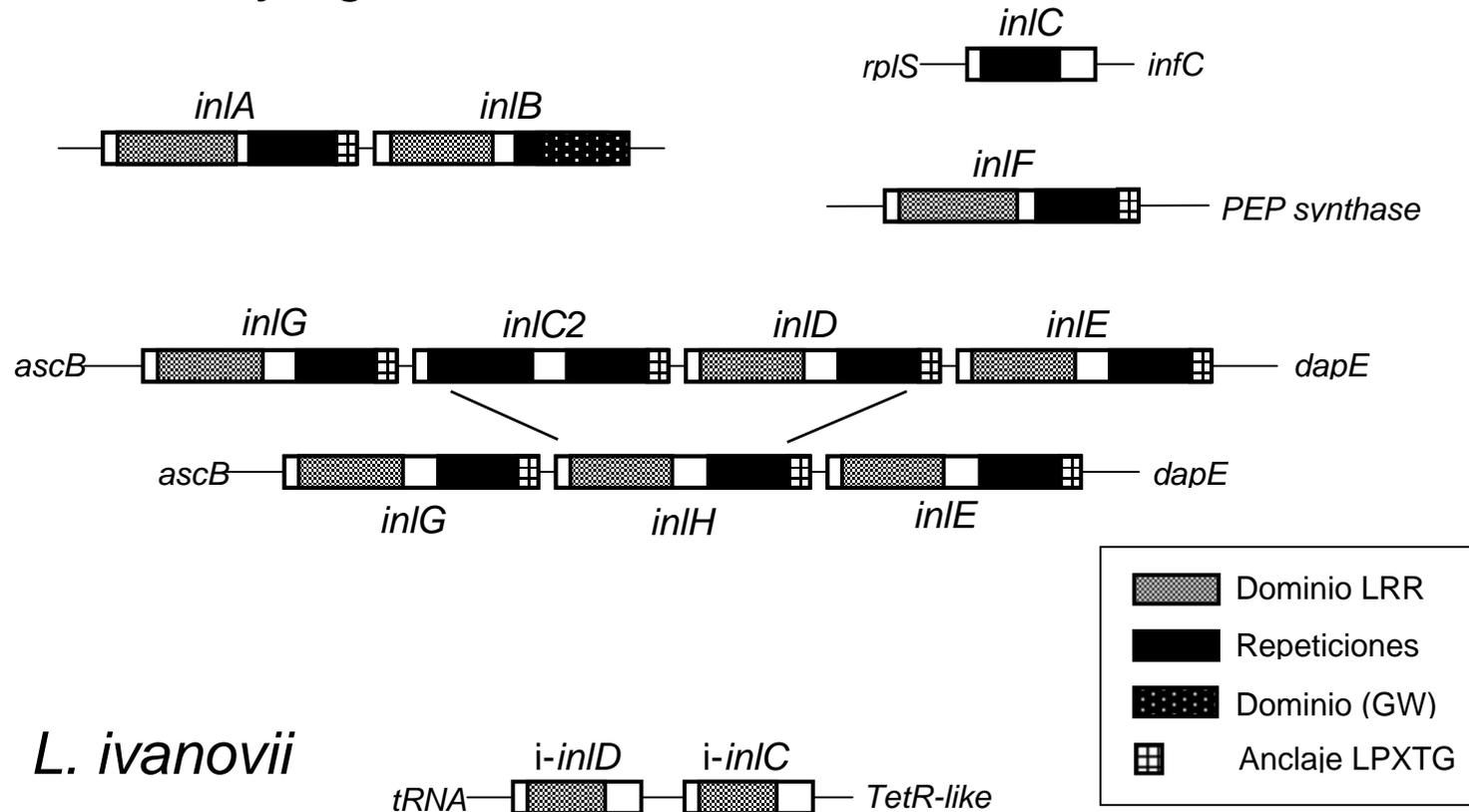
492. Schwan, W.R., Demuht, A., Kuhn, M. and Goebel, W. 1994. Phosphatidylinositol -specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* contributes to intracellular survival and growth of *Listeria innocua*. *Infect. Immun.* 62: 4795-4803.
493. Schwartz, B., Ciesielski, C.A., Broome, C.V., Gaventa, S., Brown, G.R., Gellin, B.G., Hightower, A.W, Mascola, L. and the Listeriosis Study Group. 1988. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hotdogs and undercooked chicken. *Lancet* ii: 779-782.
494. Seeliger, H. P. R. 1976. Notion actuelle sur l' epidemiologie de la listeriose. *Med. Mal. Infect.* 9: 6-14.
495. Seeliger, H. P. R., Schrettenbrunner, A., Pongratz, G., and Hof, H. 1982. Zur Sonderstellung stark hämolysierender Sämme der Gattung *Listeria*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A* 252:176-190
496. Seeliger, H.P.R. 1981. Nonpathogenic *Listeriae*: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 1 Orig. Reihe A* 249: 487-493.
497. Seeliger, H.P.R. and Höhne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In *Methods in microbiology*, vol. 13 pp. 31-49. T. Bergan and J.R. Norris, eds. Academic Press, London.
498. Seeliger, H.P.R. and Jones, D. 1986. *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds. p. 1235-1245. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
499. Seeliger, H.P.R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P.A.D and Jones, D. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 336-337.
500. Sheehan, B., C. Kocks, S. Dramsi, E. Gouin, A.D. Klarsfeld, J. Mengaud, and P. Cossart 1994. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 192: 187-216.
501. Sheehan, B., Klarsfeld, A, Ebright, R. and Cossart, P. 1996. A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol. Microbiol.* 20: 785-797.
502. Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T. and Cossart, P. 1995. Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J. Bacteriol.* 177: 6469-6476.
503. Sheehan, B., Kocks, C., Dramsi, S., Gouin, E., Klarsfeld, A.D., Mengaud, J. and Cossart, P. 1994. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 192: 187-216.
504. Sibelius, U., Chakraborty, T., Krögel, B., Wolf, J., Rose, F., Schmidt, R., Wehland, J., Seeger, W. and Grimminger, F. 1996. The *Listerial* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C synergize to elicit endothelial cell phosphoinositide metabolism. *J. Immunol.* 157: 4055-4060.
505. Sibelius, U., Rose, F., Chakraborty, T., Darji, A., Wehland, J., Weiss, S., Seeger, W. and Grimminger, F. 1996. Listeriolysin is a potent inducer of the phosphatidylinositol response and lipid mediator generation in human endothelial cells. *Infect. Immun.* 64: 674-676.
506. Sibelius, U., Schulz, E.-C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W., and Grimminger, F. 1999. Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect. Immun.* 67: 1125-1130.
507. Sirard, J.-C., Fayolle, C., de Chastellier, C., Mock, M., Leclerc, C., and Berche, P. 1997. Intracytoplasmic delivery of listeriolysin O by a vaccinal strain of *Bacillus anthracis* induces CD8 mediated protection against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 159: 4435-4443.
508. Skalka, B., Smola, J. and Elischerová, K. 1982. Different haemolytic activities of *Listeria monocytogenes* strains determined on erythrocytes of various sources and exploiting the synergism of equi factor. *Zbl. Vet. Med. B.* 29: 642-649.
509. Skalka, B., Smola, J. and Elischerova, K. 1982. Routine test for *in vitro* differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains. *J. Clin. Microbiol.* 15: 503-507.
510. Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A. and Goldfine, H. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 63: 4231-4237.
511. Smyth, C.J. and Duncan, J.L. 1978 Thiol-activated (oxigen-labile) cytolysins. In *Bacterial toxins and cell membranes*, p.129-183. J. Jeljaszewicz and T. Eadström eds., Academic Press, Inc., New York.
512. Sokolovic, Z. and Goebel, W. 1989. Synthesis of listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. *Infect. Immun.* 57: 295-298.

513. Sokolovic, Z., Riedel, J., Wuenschel, M., and Goebel, W. 1993. Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol. Microbiol.* 8: 219-227.
514. Sonna, J.A., Ambudkar, S. and Maloney, P.C. 1988. The mechanism of glucose-6-phosphate transport by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263: 6625-6630.
515. Spiro, S. and Guest, J.R. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 399-428.
516. Squires, C., and Squires, C.,L. 1992. The Clp proteins: proteolysis regulators and molecular chaperones? *J. Bacteriol.* 174: 1081-1085.
517. Stein, M.,A., Leung, K.,Y., Zwick,M., del Portillo, F.,G., and Findlay, B.,B. 1996. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 20: 151-164.
518. Stock, J.B., Ninfa, A., Stock, A.M. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53: 450-490.
519. Strauss, E.,J., and Falkow, S. 1997. Microbial pathogenesis: genomics and beyond. *Science* 276: 707-712.
520. Stuart, S.E. and Welshimer, H.J. 1973. Intrageneric relatedness of *Listeria* Pirie. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 8-14.
521. Stuart, S.E. and Welshimer, H.J. 1974. Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus, *Murraya*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 177-185.
522. Sullivan, M.A., Yasbin, R.E. and Young, F.E. 1984. New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. *Gene.* 29: 21-26.
523. Sun, A.N., Camilli, A., and Portnoy, D.A. 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 58: 3770-3778.
524. Swanson, J. A., and Baer, S.C. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5: 89-93.
525. Swenson, D.,L., Bukanov, N.,O., Berg, D.,E., and Welch, R.,A. 1996. Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infect. Immun.* 64: 3736-3743.
526. Takahashi, M., Blazy, B. and Baudras, A. 1979. Non-specific interactions of Crp from *E. coli* with native and denaturated DNAs: control of binding by cAMP and cGMP and by cation concentration. *Nucl. Acid Res.* 7: 1699-1712.
527. Tang, P., Rosenshine, I., Cossart, P. and Finlay, B.B. 1996. Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect. Immun.* 64: 2359-2361.
528. Theriot, J.A. 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/Cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 136: 1165-1168.
529. Theriot, J.A., Mitchison, T.J., Tilney, L.G. and Portnoy, D.A. 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature.* 357: 257-260.
530. Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J. and Mitchison, T.J. 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and cell-free extracts. *Cell* 76: 505-517.
531. Tierrez, A. and Vázquez-Boland, J.,A. (resultados no publicados).
532. Tilney, L.G., DeRosier, D.J. and Tilney, M.S. 1992. How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement. *J. Cell Biol.* 118: 71-81.
533. Tilney, L.G. and Portnoy, D.A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 109: 1597-1608.
534. Tilney, L.G., DeRosier, D.J., Webber, A. and Tilney, M.S. 1992. How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. II. Nucleation, actin filament polarity, filament assembly, and evidence for a pointed end capper. *J. Cell Biol.* 118: 83-93.
535. Titball, R.W. 1998. Bacterial phospholipases. *J. Applied Microbiol. Symposium Supplement.* 84: 127S-137S.
536. Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T. and Sasakawa, C. 1993. Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* in *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. *J. Bacteriol.* 175: 6142-6149.

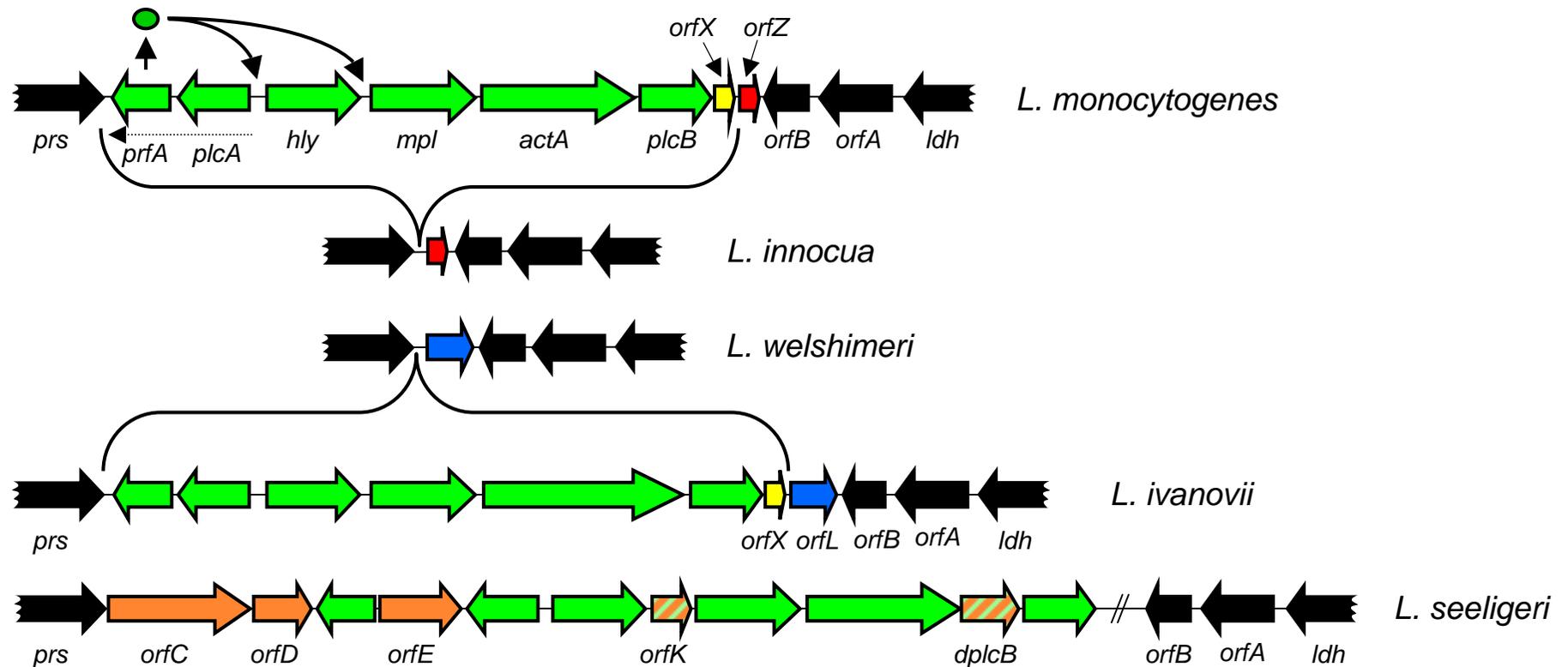
537. Trieu-Cuot, P., Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., and Courvalin, P. 1993. Sequence requirements for target activity in site-specific recombination mediated by the Int protein of transposon Tn1545. *Mol. Microbiol.* **8**: 179-185.
538. Ushida, C. and Aiba, H. 1990. Helical phase dependent action of Crp: effect of the distance between the Crp site and the -35 region on promoter activity. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6325-6330.
539. Vázquez-Boland, J.-A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., And Goebel, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microb. Infect.* (submitted).
540. Vázquez-Boland, J.A., Domínguez, L., Blanco, M., Rocourt, J., Fernández-Garayzábal, J.F., Gutiérrez, C.B., Tascón, R.I. and Rodríguez-Ferri, E.F. 1992. Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria*-selective enumeration medium and phage typing. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 368-371.
541. Vázquez-Boland, J.A., Domínguez, L., Fernández, J.F., Rodríguez-Ferri, E.F., Briones, V., Blanco, M. and Suárez, G. 1990. Revision of the validity of CAMP tests for *Listeria* identification. Proposal of an alternative method for the determination of haemolytic activity by *Listeria* strains. *Acta Microbiol. Hung.* **27**: 201-206.
542. Vázquez-Boland, J.A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. and Suárez, G. 1992. *Listeria monocytogenes* CAMP reaction. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 343.
543. Vázquez-Boland, J.A., Domínguez, L., Rodríguez-Ferri, E.F. and Suárez, G. 1989. Purification and characterization of two *Listeria invanovii* cytolysins, a sphingomyelinase C and a thiol-activated toxin (ivanolysin O). *Infect. Immun.* **57**: 3928-3935.
544. Vázquez-Boland, J.A., Domínguez, Lucas, Rodríguez-Ferri, E.F., Fernández-Garayzábal, J.F. and Suárez, G. 1989. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolitic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 95-100.
545. Vázquez-Boland, J.A., Ferrer, D. y Rocourt, J. 1991. Heterogeneidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de un brote de listeriosis en adultos ocurrido en Valencia en 1989. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **9**: 442-444.
546. Vázquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J. and Cossart, P. 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* end possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **60**: 219-230.
547. Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M.T., Böckmann, R., González-Zorn, B., Novella, S., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., and Vázquez-Boland, J.A. 1998. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA\*(Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J. Bacteriol.* **180**, 6655-6660.
548. Vega-Palas, M.A., Flores, E. and Herrero, A. 1992. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belong to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* **6**: 1853-1859.
549. Viale, A. M., Kovayashi, H., Akazawa, T. and Henikoff, S. 1991. *rcbR*, a gene coding for a member of the LysR family of transcriptional regulators, is located upstream of the expressed set of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase genes in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **173**:5224-5229.
550. Vicente, M.F., Baquero, F., and Pérez-Díaz, J.C. 1985. Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* haemolysin in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**: 77-79.
551. Vines, A., Reeves, M.W., Hunter, S. and Swaminathan, B. 1992. Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.* **143**: 281-294.
552. Visick, J.E. and Clarke, S. 1995. Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.* **16**: 835-845.
553. Vokes, S., A., Reeves, S., A., Torres, A., G., and Payne, S., M. 1999. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* **33**(1): 63-73.
554. Wadsworth, S.,J., and Goldfine, H. 1999. *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. *Infect. Immun.* **57**: 1770-1778.
555. Waldor, M., K., and Mekalanos, J., J. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910-1914.
556. Wassef, J.S., Keren, D.F. and Mailloux, J.L. 1989. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect. Immun.* **57**: 858-863.
557. Watson, N. 1988. A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene.* **70**(2): 399-403.

558. Watson, R.J., Rastogi, V.K. 1993. Cloning and nucleotide sequencing of *Rhizobium meliloti* aminotransferase genes: an aspartate aminotransferase required for symbiotic nitrogen fixation is atypical. *J Bacteriol.* **175**:1919-1928.
559. Wawrzynow, A., Banecki, B., and Zylicz, M. 1996. The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol. Microbiol.* **21**: 895-899.
560. Weber, I.T. and Steitz, T.A. 1987. Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**: 311-326.
561. Weiglein, I., Goebel, W., Troppmair, J., Rapp, U., Demuth, A., and Kuhn, M. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of HeLa cells results in listeriolysin O-mediated transient activation of the Raf-Mek-Map kinase pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**: 189-195.
562. Welch, M., D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D., and Mitchison, T., J. 1998. Interaction of Human Arp2/3 Complex and the *Listeria monocytogenes* ActA Protein in Actin Filament Nucleation. *Science.* **281**: 105-108.
563. Welch, M.D., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**: 265-269.
564. Welshimer, H.J. and Meredith, L. 1971. *Listeria murrayi* sp. n.: a nitrate-reducing mannitol-fermenting *Listeria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**: 3-7.
565. Wernars, K., Heuvelman, K., Notermans, S., Domann, E., Leimeister-Wächter, M., and Chakraborty, T. 1992. Suitability of the *prfA* gene, which encodes a regulator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, in the identification of pathogenic *Listeria* spp. *App. Environ. Microbiol.* **58**: 765-768.
566. West, S.E., Sample, A.K. and Runyen-Janecky, L.J. 1994. The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J. Bacteriol.* **176**: 7532-7542.
567. Wetzler, T.F., Freeman, N.R., French, M.L., Renkowski, L.A., Eveland, W.C. and Carver, O.J. 1968. Biological characterization of *Listeria monocytogenes*. *H.L.S.* **5**: 46-62.
568. Wood, M.W., Jones, A. M., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Mol. Microbiol.* **29**(3): 883-891.
569. Wood, S., Mautoushek, N. and Czuprynski, C. 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect. Immun.* **61**: 3068-3072.
570. Wuenscher, M.D., Köhler, S., Goebel, W., and Chakraborty, T. 1991. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet.* **228**: 177-182.
571. Yamamoto, T., Hanawa, T. and Ogata, S. 1994. Induction of *Yersinia enterocolitica* stress protein by phagocytosis with macrophage. *Microbiol. Immunol.* **38**: 295-300.
572. Yamamoto, T., Hanawa, T., Ogata, S. and Kamiya, S. 1996. Identification and characterization of the *Yersinia enterocolitica* *gsrA* gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress. *Infect. Immun.* **64**: 2980-2987.
573. Youngman, P. 1987. Plasmid vectors for recovering and exploiting Tn917 transpositions in *Bacillus* and others Gram-positive bacteria. In *Plasmids, a practical approach*, pp. 79-103. K.G. Hardy ed. IRL Press, Oxford, UK.
574. Youngman, P., Perkins, J.B. and Losick, R. 1983. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 2305-2309.

# *L. monocytogenes*

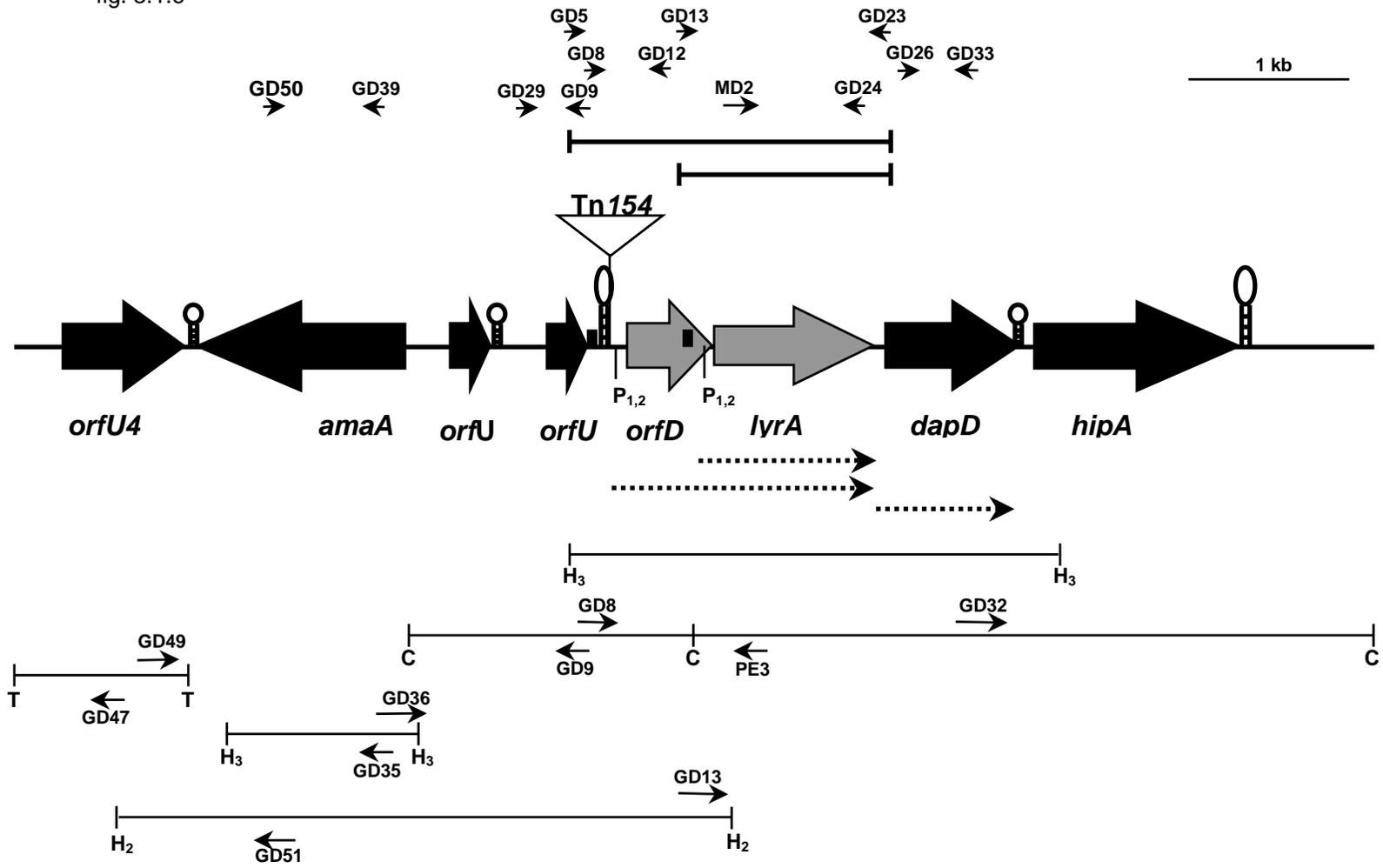


**Fig. 1.4.** Representación esquemática de la estructura genética de la familia multigénica de internalinas en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. La dirección de transcripción en todos los caso va desde la izquierda a la derecha. Las características estructurales más relevantes de las proteínas codificadas también se indica (para más detalles apartado 3.3.2.5.1). Se señala la diferente organización gen entre los dos clusters de *inIs* sugiere que *inIH* ha sido ética encontrada en el mismo locus de *inIs* en dos aislados del serovar 1/2a de *L. monocytogenes* cepa EGD. El análisis comparado de la secuencia generado como consecuencia de la recombinación entre el extremo 5' de *inIC2* y el extremo 3' de *inID* (432).



**Fig. 1.2.** Representación esquemática de la estructura genética de la región cromosómica del cluster *hly* de virulencia en *Listeria* spp. Los genes que pertenecen al cluster central de virulencia están señalados en verde. Esta región central de virulencia se encuentra insertada en la región cromosómica flanqueada por *prs* y *orfB*. Los genes que se encuentran presentes en todas las especies de *Listeria*, delimitando la región *hly* de virulencia, se indican en negro. En *L. monocytogenes*, en la región intergénica *plcB-orfB*, se resaltan dos ORFs representadas en amarillo (*orfX*) y rojo (*orfZ*) que delimitan el posible punto de delección del cluster *hly* de virulencia en *L. innocua* (texto en 1.3.1). En la región *plcB-orfB* de *L. ivanovii*, se señalan dos ORFs, *orfX* (en amarillo para resaltar que es ortólogo de *orfX* *L. monocytogenes*) y *orfL* en azul (sin ortólogo en *L. monocytogenes* pero si en *L. welshimeri*). Como en *L. monocytogenes*, estas ORFs delimitan el punto de delección del cluster de virulencia en la especie apatógena *L. welshimeri*. Las ORFs adicionales presentes en el cluster central de virulencia de *L. seeligeri*, se señalan en naranja (*orfC*, *D* y *E*), o bien rayadas en naranja y verde (*orfK*, *dplcB*), con lo que indicamos que los proteínas muestran similitud con productos del cluster central de virulencia (*OrfK* exhiben un 39% de similitud con *PlcA* y *dPlcB* es un duplicado truncado de *PlcB*). Esta figura es una modificación de la publicada en (539).

fig. 3.1.6



**Figura 3.1.6.** Organización física y transcripcional del locus *lyrA* de *L. ivanovii* y su región flanqueante. Debajo de cada gen están representados los transcritos identificados mediante *Northern blot* que se indican esquemáticamente con flechas punteadas. El punto de inserción de Tn 1545 está señalada con un triángulo. Se indican los puntos de inicio de la transcripción (P), las posibles cajas-LysR (rectángulos), y estructuras secundarias compatibles con constituir terminadores (bucles). Los segmentos representados en trazo grueso en la parte superior de la figura representan los fragmentos de DNA insertados en pHP59 que dan lugar a las construcciones para *trans* complementar con *lyrA* y *orfD1-lyrA*. Las flechas pequeñas se corresponden con los principales oligonucleótidos utilizados. Los segmentos representados en la parte inferior representan los fragmentos obtenidos por PCR inversa con distintas enzimas de restricción: H<sub>3</sub>, *Hind*III; C, *Clal*; T, *Taq*I; H<sub>2</sub>, *Hinc*II.

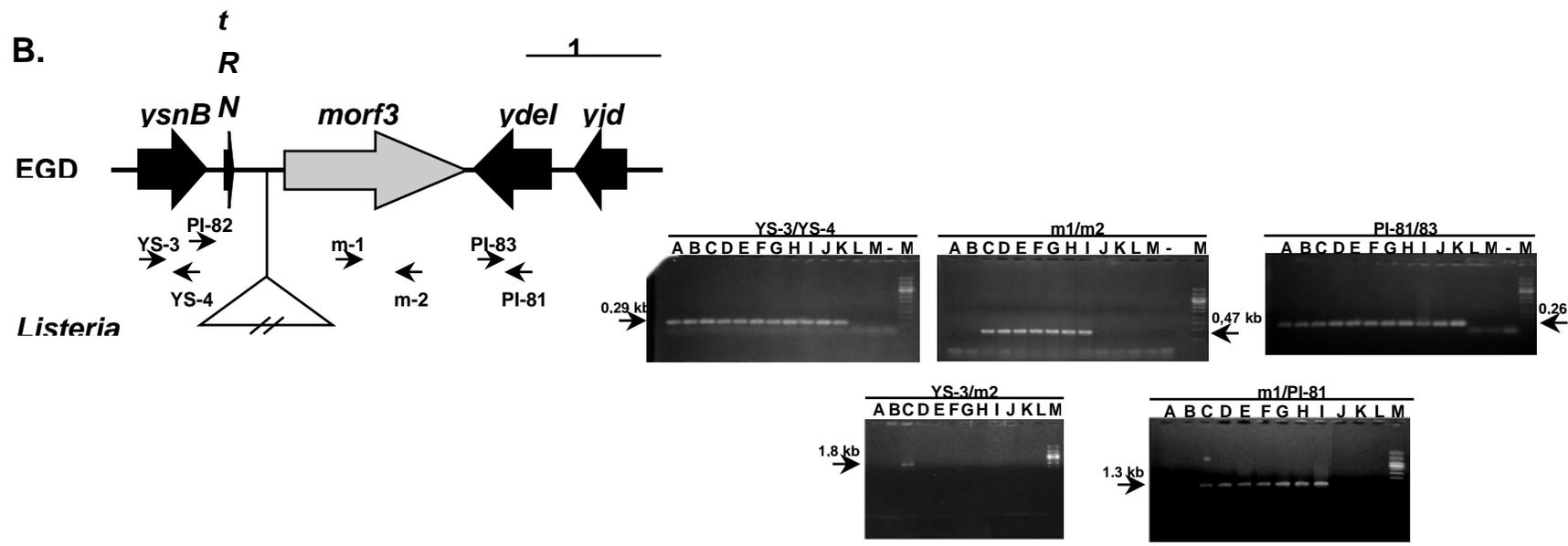
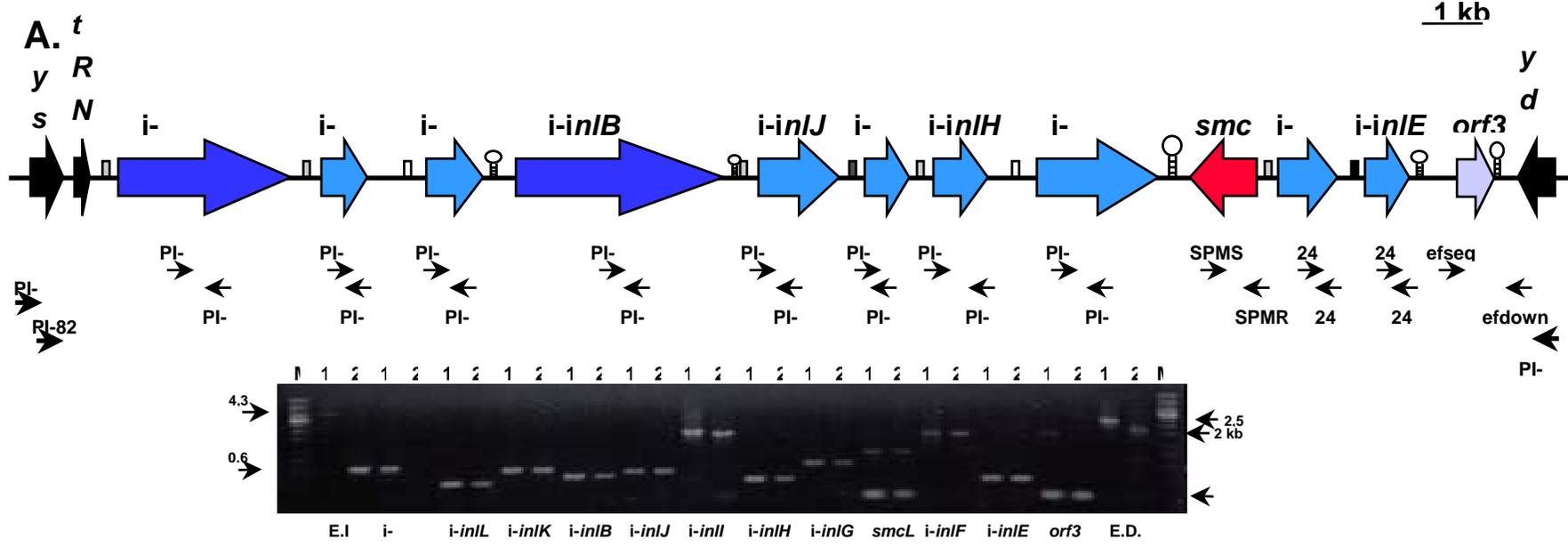


Figura 3.3.11.

**Tabla 3.2.1.** Propiedades de los mutantes débilmente hemolíticos.

	Mutantes				Controles			
	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	WT	$\Delta$ -prfA	$\Delta$ i-inIE	smcL:: $\Omega$ Km
Actividad hemolítica en AS <sup>a</sup>	+	+++	+	++	++++	+	++++	++
Halo de hemólisis incompleta <sup>a</sup>	+++	+	+	-	+++	+++	+++	-
Reacción de CAMP con <i>R. equi</i> :								
forma	Pala	Pala	Pala	Cerilla	Pala	Pala	Pala	Cerilla
tamaño	Grande	Pequeña	Pequeña		Grande	Grande	Grande	
Expresión de <i>plcB</i> <sup>b</sup>	0.28±0.019	24.63±0.52	0.16±0.04	25.88±3	25.15±1.92	0.13 ±0.09	-	+++
Producción de i-InIE	-	+	-	-	+++	-	-	+++
Utilización de G-1-P <sup>c</sup>	Lento	Rápido	No lo utiliza	Rápido	Rápido	No la utiliza	Rápido	Rápido
Unidades de actividad SMasa <sup>d</sup>	25	19.7±1.91	9.5±1.77	2.95±1.10	35.55±3.85	26	36	3.9±0,9

<sup>a</sup>Las actividades hemolíticas de las distintas cepas de *L. ivanovii* se han valorado semicuantitativamente con la siguiente escala: -, reacción negativa; + a +++++, distintos grados de reacción positiva en placas de agar sangre cultivadas a 37°C durante 36 horas.

Los sobrenadantes de los mismos cultivos en el inicio de la fase estacionaria de crecimiento fueron utilizados para medir las actividades SMasa, lecitinasa, utilización de G-1-P y, tras ser precipitados con TCA, analizados mediante SDS-PAGE al 12% (Figs 3.2.5 y 3.2.6) (véase materiales y métodos). Todos los datos representan la medida de, al menos, tres determinaciones  $\pm$  la desviación estándar.

<sup>b</sup>La expresión de *plcB* se ha medido determinando la actividad lecitinasa en los SC. Una unidad lecitinasa (UPlcB) se definió arbitrariamente como la cantidad de enzima necesaria para determinar un incremento de 0.1 en la absorbancia a una longitud de onda de 510nm.

<sup>c</sup>Una unidad de actividad SMasa se ha definido arbitrariamente como la cantidad de enzima necesaria para determinar un incremento, en dos horas a 37°C, de 0.01 en la absorbancia medida a una longitud de onda de 330. La actividad SMasa residual que aparece en las variantes de clase IV y en un mutante por inserción en el gen *smcL* (*smcL*:: $\Omega$ Km), se le ha atribuido a la actividad SMasa de la fosfolipasa C PlcB de amplio rango de sustrato (véase texto y 179,192, ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

<sup>d</sup>Capacidad de utilización de G-1-P a 37°C determinada por el tiempo (en horas) requerido para acidificar el medio de cultivo. Se utilizó medio base para azúcares rojo fenol con una concentración del azúcar de 10mM (véase apartado de materiales y métodos y (447)). Una rápida utilización se considera un resultado positivo en 12 horas y una lenta utilización después de 72 horas de incubación. La no utilización indica que no se produjo acidificación del medio tras más de un mes de incubación.

Todas las cepas utilizadas están descritas en la tabla 4.1 de materiales y métodos.



**Tabla 3.3.5 A.** Porcentaje de Identidad<sup>a</sup> entre las internalinas pequeñas y secretadas.

Internalina (tamaño)	i-InIC (aa solapados)	i-InID	i-InIE	i-InIF	i-InIG <sup>b</sup>	i-InIH	i-InII	i-InIJ	i-InIK	i-InIL
<b>i-InIC (296)</b>		53,04 (296)	56,7 (231)	47,3 (296)	<b>63,1</b> (296)	50,4 (272)	62,9 (230)	47,8 (296)	54,4 (296)	49,0 (261)
<b>i-InID (313)</b>			54,9 (231)	54,2 (296)	55,6 (313)	49,5 (272)	53,0 (230)	46,8 (310)	<b>56,6</b> (312)	46,3 (261)
<b>i-InIE (231)</b>				51,5 (231)	53,0 (231)	54,5 (231)	<b>70,4</b> (230)	50,4 (231)	48,5 (231)	45,9 (231)
<b>i-InIF (320)</b>					53,4 (320)	45,6 (272)	49,8 (230)	45,4 (310)	<b>56,3</b> (312)	45,2 (261)
<b>i-InIG (615)</b>						50,5 (272)	56,3 (230)	48,15 (310)	44,3 (310)	49,6 (261)
<b>i-InIH (272)</b>							47,0 (230)	45,3 (272)	45,7 (272)	<b>56,0</b> (261)
<b>i-InII (230)</b>								47,5 (230)	47,8 (230)	43,0 (230)
<b>i-InIJ (416)</b>									44,3 (312)	44,5 (261)
<b>i-InIK (312)</b>										45,6 (261)
<b>i-InIL (261)</b>										

<sup>a</sup> Los porcentajes de identidad se han calculado alineando las secuencias aminoacídicas de las distintas internalinas mediante el programa BESTFIT utilizando un tamaño de GAP de 8, del paquete informático GCG versión 10.0 para UNIX (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)

<sup>b</sup> Todos los alineamientos se han optimizado entre el extremo N-terminal (310 aa) de i-InIG y el resto de las internalinas.

En negrita se destacan los porcentajes de identidad más significativos que coinciden con los agrupamientos descritos en el apartado 3.3.3. Así, *i-InIE* e *i-InII*; *i-InIL* e *i-InIH*; *i-InIF*, *i-InIK*, *i-InIJ*; y, por último la proteína quimérica *i-InIG* que presenta gran homología con *i-InIC* en su mitad N-terminal.

**Tabla 3.3.5B.** Porcentaje de identidad <sup>a</sup> entre las internalinas grandes asociadas a la superficie de LIPI-2, InIB e InIA de *L. monocytogenes*.

Internalina (tamaño en aa)	i-InIB2 (aa solapados)	i-InIB	InIB	InIA
<b>i-InIB2 (897)</b>		60,6 (897)	37,0 (630)	39,4 (800)
<b>i-InIB (1078)</b>			35,8 (630)	35,9 (800)
<b>InIB (630)</b>				36,4 (630)
<b>InIA (800)</b>				

Nótese como el porcentaje de identidad entre las dos internalinas de superficie de LIPI-2 contrasta marcadamente con el que muestran el resto de las *i-InI* entre sí, lo que sugiere un posible origen por duplicación, al igual que las *s-InIs* de LIPI-2.

**Tabla 3.3.1.** Principales características de las distintas ORFs flanqueantes a LIPI-2

ORF/nombre del gen	Codón de iniciación	Codón de stop	Posible caja RBS (posición) <sup>a</sup>	nº aa/tamaño de proteína <sup>b</sup> (kDa)	Punto <sup>b</sup> isoelectrico	Homólogo en <i>L. monocytogenes</i> EGDe (% identidad/aa solapados <sup>c</sup> )	Homólogo en las bases de datos (nº acceso)(% identidad <sup>c</sup> )	Posible función <sup>d</sup>	Referencia
<b>YsnB</b>	ND	TAG	ND	ND	ND	2303.1/YsnB (94%/123)	YsnB_BACSU (sp: P94449)(46%/113)	Desconocida	(298)
<b>ORF4/ydeI</b>	ATG	TAA	GAGG (-10/-13)	197/22,5	7,7	2301.1/YdeI (%/197)	YdeI_BACSU (BG12136)(61%/197)	Desconocida	(298)
<b>ORF5/yjdN</b>	ATG	TAA	AGGAGG (-8/-13)	132/14,9	4,24	2300.1/YjdN(%/132)	YjdN_ECOLI (sp: P16681)(30%/130)	Desconocida	(¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)
<b>ORF6</b>	ATG	TAA	GGAGGG (-7/-12)	203/23,1	7,7	2299.1(77%/199)	YhfR_BACSU (sp: Y14084)(24%/184)	probable fosfoglicerato mutasa	(298)
<b>ORF7</b>	ATG		AGGAGG (-7/-12)	86/9,4	4,18	4053.1(84%/65)	No tiene	Desconocida	
<b>ORF8/RnaH</b>	ATG	TAA	GAGGA (-6/-10)	470/53,1	9,25	2298.1(91%/470)	DEAD_BACSU (sp: P42305)(59%/474)	Probable RNA helicasa dependiente de ATP	(298)
<b>ORF9</b>	ATG	TGA	AAGGGA (-5/-9)	401/44,3	9,1	2293.1(81%/401)	YwoG_BACSU (BG70065)(24%/380)	Homólogo a proteínas de resistencia a quinolonas	
<b>ORF10</b>	ATG	TAA	AAGGA (-10/-14)	219/25,94	5,60	2292.1(90%/219)	PrfA_LISMO (X61210)(27%/208)	Homólogo a reguladores transcripcionales de la familia FnR	(genoma <i>Listeria</i> )

<sup>a</sup> La posición se corresponde con la distancia en nucleótidos desde el posible codón de inicio de la traducción.

<sup>b</sup> Se han calculado el tamaño, en kDa, y el pI de las proteínas utilizando la aplicación ProtParam, disponible en <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>.

<sup>c</sup> Los porcentajes de identidad han sido calculados utilizando el programa BLAST sin filtro, utilizando el algoritmo de Altschul (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), disponible en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast>.

<sup>d</sup> La posible función está basada en los datos de homología obtenidos en las bases de datos.

ND indica no determinado.

**Tabla 4.1.** Cepas de *Listeria* utilizadas en este trabajo.

Cepas	Otras denominaciones	Descripción	Origen	Procedencia	Referencia
<i>L. ivanovii</i>					
ATCC <sup>d</sup> 19119 <sup>T</sup>	SLCC 2779 <sup>T</sup> ; PAM <sup>e</sup> 424	Cepa tipo, serovar 5	Colección	H.P.R. Seeliger	(498)
D-23	CLIP <sup>a</sup> 75820; PAM 209	Cepa silvestre, serovar 5	Clínico, bovino	Nuestro Laboratorio	–
P-55	CLIP <sup>a</sup> 75819; PAM 55	Cepa silvestre, serovar 5	Clínico, ovino	Nuestro Laboratorio	–
CLIP <sup>a</sup> 12229	CLIP <sup>a</sup> 75822; PAM 709	Cepa tipo de la ssp. <i>londoniensis</i> , serovar 5	Colección	J. Rocourt	(42)
<i>L. monocytogenes</i>					
P14	PAM 14	Cepa silvestre, serovar 4b	Clínica, humana	Nuestro laboratorio	(545)
EGD-e	PAM 358	Cepa silvestre, serovar 1/2a	Colección	T. Chakraborty (Alemania)	(369)
L028	PAM 259	Cepa silvestre, serovar 1/2c	Colección	P. Cossart (Francia)	(550)
SLCC <sup>c</sup> 2755	PAM 484	Cepa silvestre, serovar 1/2b	Colección	H.P.R. Seeliger	(497)
SLCC <sup>c</sup> 2373	–	Cepa silvestre, serovar 3a	Colección	H.P.R. Seeliger	(497)
SLCC <sup>c</sup> 2540	–	Cepa silvestre, serovar 3b	Colección	H.P.R. Seeliger	(497)
<i>L. innocua</i>					
ATCC 33090	NCTC 11288; PAM 153	Cepa tipo, serovar 6a	Colección	H.P.R. Seeliger	–
ATCC 33091	NCTC 11289; PAM 152	Cepa silvestre de referencia del serovar 6a	Colección	H.P.R. Seeliger	–
<i>L. seeligeri</i>					
CIP <sup>b</sup> 100100	SLCC 3954; PAM 499	Cepa tipo, serovar 1/2b	Colección	J. Rocourt	(453)
SLCC 5921	PAM 498	Cepa silvestre, serovar 1/2b	Colección	H.P.R. Seeliger	–
<i>L. welshimeri</i>					
SLCC 5334	CIP 8149; PAM 497	Cepa tipo, serovar 6a	Colección	J. Rocourt	(453)
C20	PAM 572	Aislado de alimentos, serovar 6b	Nuestro laboratorio	J. P. Encinas	–
<i>L. grayi</i>					
ATCC 19120	–	Cepa tipo ssp. <i>grayi</i>	Colección	–	(459)
691	–	Cepa silvestre de ssp. <i>murrayi</i>	Nuestro laboratorio	–	–

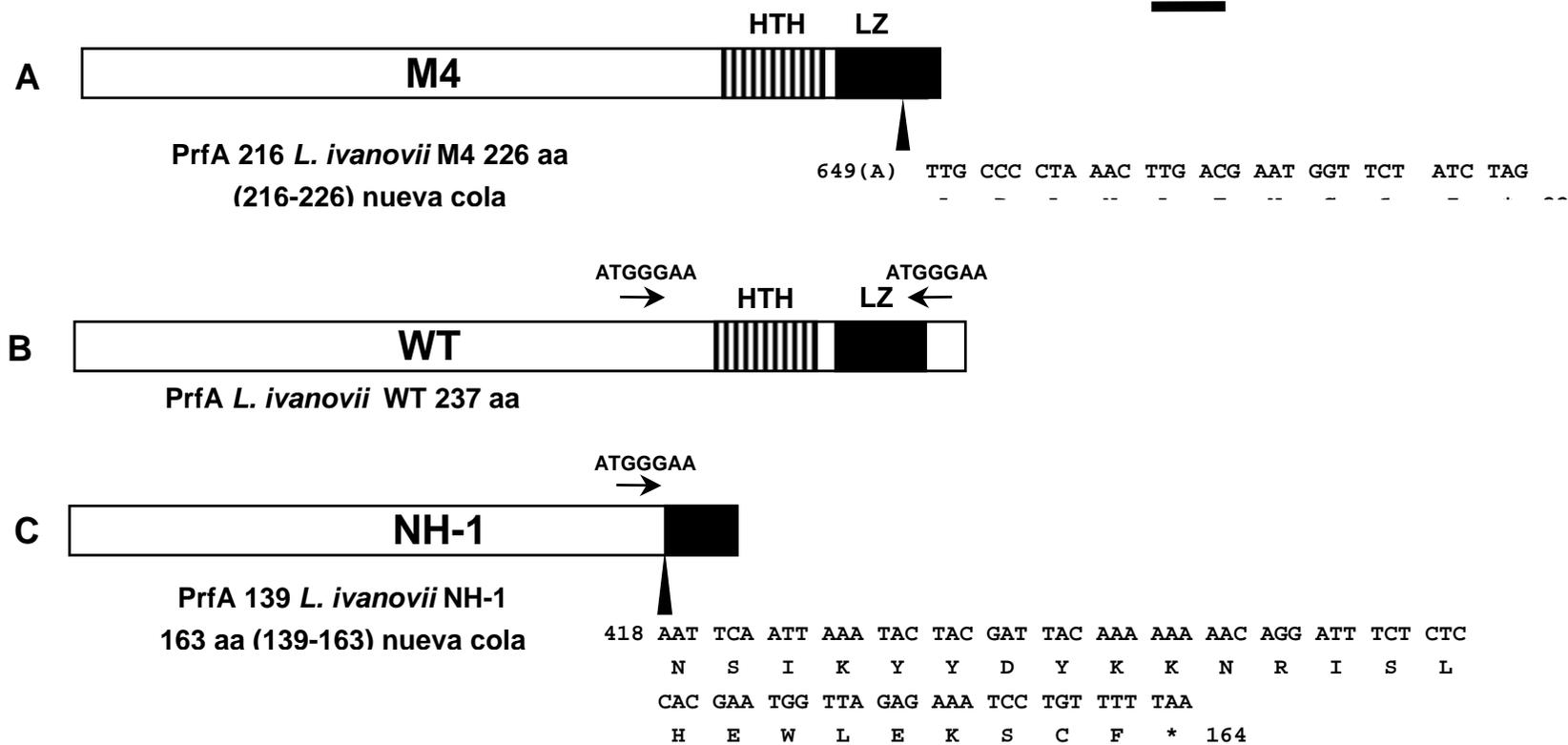
<sup>a</sup> Collection de *Listeria* de l'Institut Pasteur.

<sup>b</sup> Collection de l'Institut Pasteur.

<sup>c</sup> Seeliger *Listeria* Culture Collection.

<sup>d</sup> American Type Culture Collection.

<sup>e</sup> Colección del Grupo de Patogénesis Molecular Bacteriana.



**Figura 3..2.8.** Esquema de las principales características de organización de la estructura primaria de PrfA comparado con los dos PrfA mutados. Principales diferencias a nivel de su secuencia nucleotídica.

**B.** Representación de PrfA WT en el que se indica en su extremo C-Terminal el posible dominio **HTH** (*helix-turn-helix*, se corresponde con la zona rayada) y el motivo de cremalleras de leucinas **LZ** (*leucine zipper*, indicado por una zona punteada). Las dos repeticiones directas de secuencias de nucleótidos se encuentran señaladas por dos flechas horizontales.

**A.** Representación de PrfA del mutante M4 (M4PrfA). Un triángulo vertical indica el punto donde comienza la nueva proteína (representada por una zona fondo negro) originada por el cambio en la fase de lectura producido por la delección de una A en su secuencia nucleotídica. La nueva secuencia de nucleótidos así como su traducción a aminoácidos (representados por código unilettra, debajo) está representada en la parte final del esquema de iPrfA.

**C.** Esquema de PrfA del mutante NH (NHPrfA). El punto de recombinación está indicado por un triángulo vertical. El nuevo extremo generado en NHPrfA está representada esquemáticamente por un recuadro con trama negra. En el extremo final de NHPrfA se muestra la nueva secuencia de nucleótidos originada por la recombinación y su correspondiente traducción a aminoácidos (en código unilettra, debajo). La posición nucleotídica se indica a la izquierda y la de aminoácidos a la derecha.



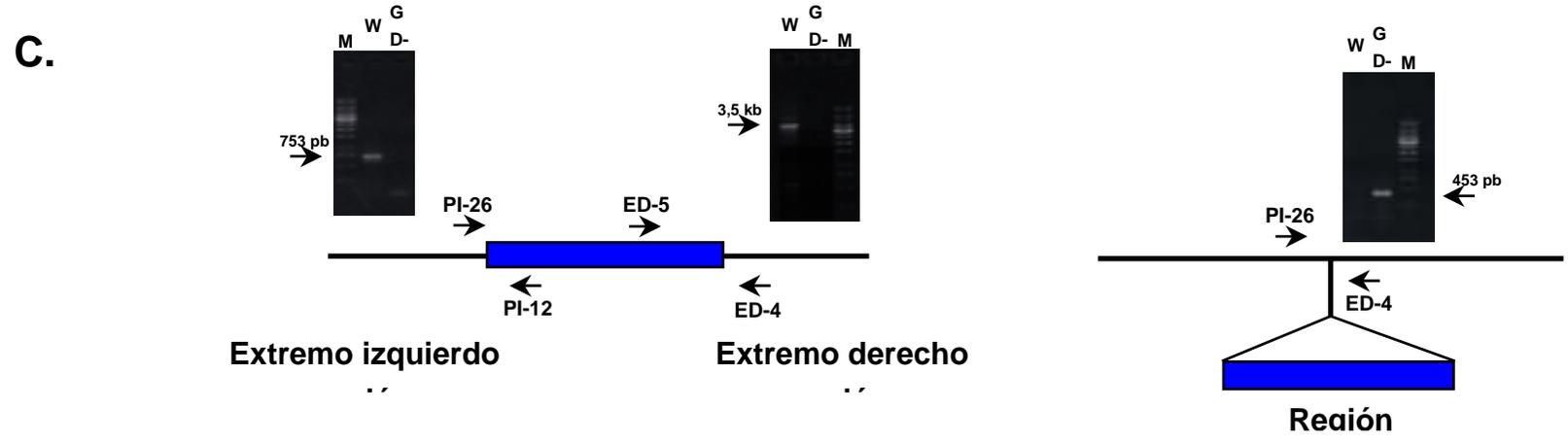
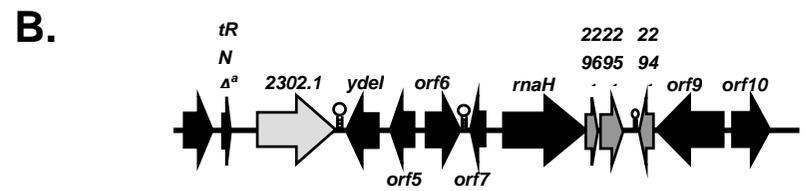
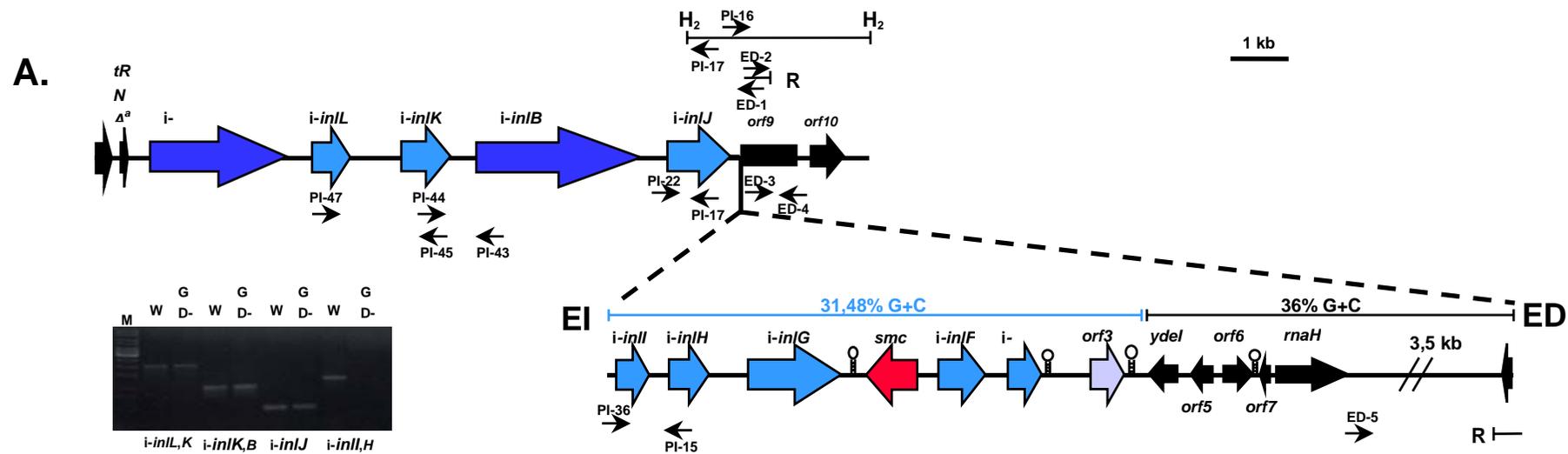
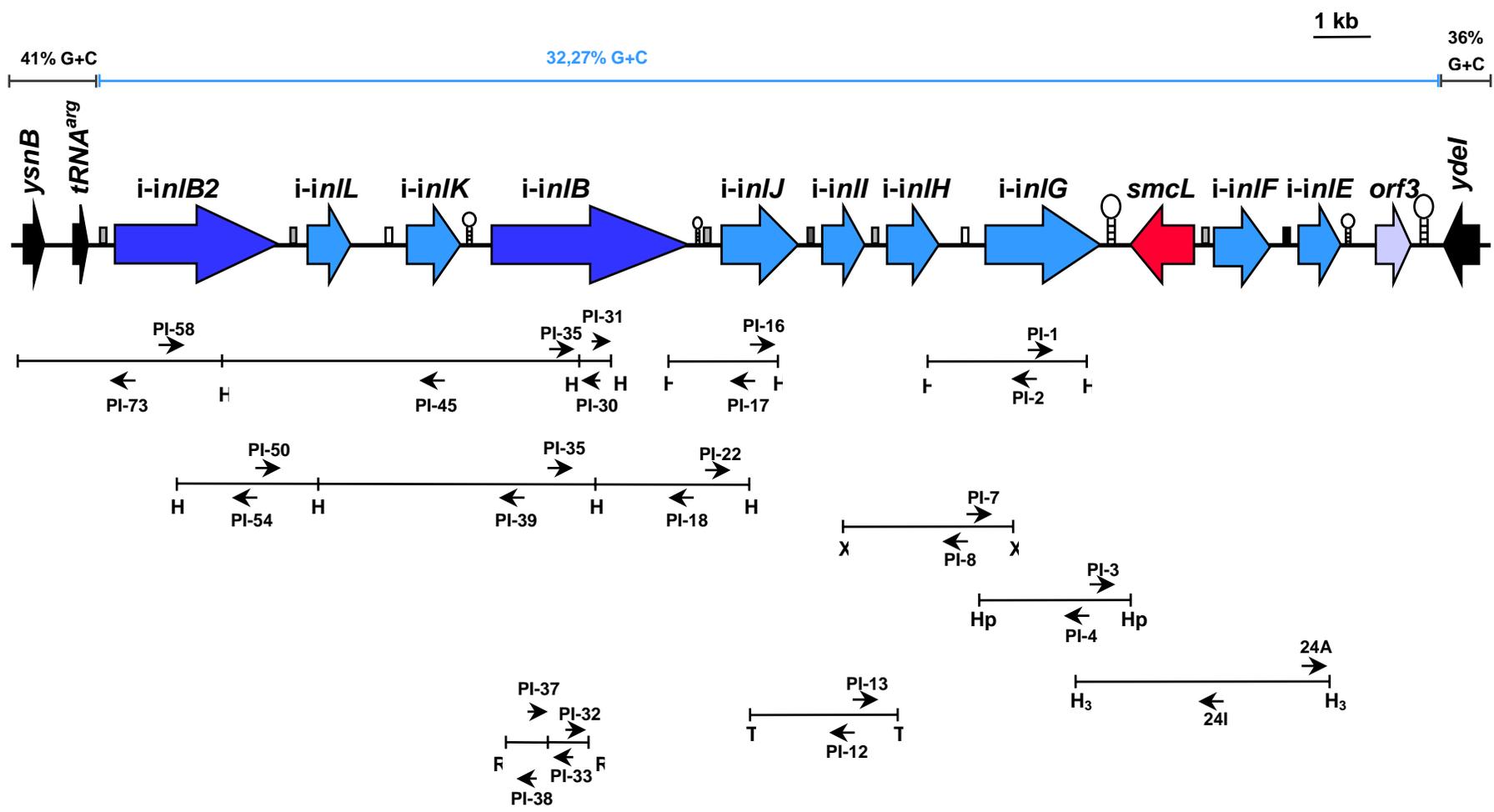


FIGURA 3.3.2



**Figura 3.3.5.** Organización física de LIPI-2 y sus regiones flanqueantes. Los genes están representados a escala por flechas. Las que tienen color negro definen los extremos de LIPI-2. El color rojo representa a *smcL*, en azul claro se señalan las internalinas de pequeño tamaño y secretadas, mientras que en azul oscuro se muestran las internalinas de superficie de gran tamaño. Las posibles cajas PrfA se representan con rectángulos y mantienen la gradación de color descrita en la leyenda de la Figura 3.3.1, así diferenciamos cuatro tipo de cajas PrfA: perfecta de color negro; gris oscuro con una desviación; gris claro con dos desviaciones; y blanca con tres desviaciones. El contenido en G+C de LIPI-2 y de los genes flanqueantes se representa en tres segmentos en la parte superior del esquema. Los colores azul y negro de estos segmentos coinciden con el de las regiones que representan. Por último, los segmentos que se muestran en la parte inferior representan los fragmentos obtenidos por sucesivas PCRs inversas con distintas enzimas de restricción para caracterizar esta región. Los oligonucleótidos utilizados en cada amplificación se representan por flechas pequeñas y se muestran en cada segmento. Asimismo, en los extremos de los segmentos se muestran las enzimas de restricción empleadas: H<sub>3</sub>, *HindIII*; T, *TaqI*; H<sub>2</sub>, *HincII*; R, *RsaI*; H, *HhaI*; X, *XbaI*; Hp, *HphI*.



A.

SP

i-InlB 1 MREKNW LQGVLIITLLTMIVACISMDFKTNVRAASISQ PMPFNKLFDPDGLSEETIAETLS  
i-InlB2 1 MKRNSLKKVLPVLLITIIAMCMNNTLEIKVQAAASISN PMPFNQIFPDTNLAEVKWSLR  
InlB 1 MKEKHNRPRKYCLISGLAIIIFSLWIIIGNGAKVQAETITVSTPIKQIFPDDAFAETIKDN

LRR1

i-InlB 61 KKNITD VVSQQELSSIDELYADESWIKSIKGVQYLSNLRKTFVQKNQIKDISD LASTIKL  
i-InlB2 61 KNSVTD VVSQQELDQVESINAMRKNIKSIKGLQYLSNLRKTFVQKNQIKDISD LASTIKL  
InlB 61 LKKKSVTD AVTQN.....

LRR2 LRR3 LRR4

i-InlB 121 EEVRLN GNQISDISALANLS.....  
i-InlB2 121 EEIYLS GNQIKDIGHLANLNKLEKIFLQGNQLTDINLPAGLSNLKTLVLSNNQIKDICNL  
InlB 74 .....

LRR5 LRR6 LRR7

i-InlB 141 .....KLNVL DLSNNOIKDIDALSNLVKLSLNLDNQLT  
i-InlB2 181 EKSKLENVYLQGNQLTDISIAGLSNLNL DLSNNOIKGIDALSNLVKLSLNLDNQLT  
InlB 74 .....

LRR8 LRR9

i-InlB 176 DISRLESLT.....AKELIFF  
i-InlB2 241 DISVLA GTSNLTLDLNNRIKDIRTLSTLVNLENLMMNNQLININHLSSLKLELISF  
InlB 74 .....

LRR10 LRR11 LRR12

i-InlB 192 TGNQITDIRVLSKLTNLTTEL VFNKNOVDNIAALS KLT.....NLTALGFREN NV  
i-InlB2 301 NGNRVTDIRSSVAKLTNLTTELDCSENOVDNININSLAKLT.....NLTGLTLEGNKV  
InlB 74 .....

LRR13 LRR14

i-InlB 241 KDIAPLVKIVKLTTLAFSQNQRDISVLETLDILVYLAFDGNQVQKDISVLAKLNHLAYLV  
i-InlB2 350 KDLSPLAQHTNLTGLNFRONQINDISVLEKLPNLDLSLAFDKNKVSIVSILAKLPKLTLYLI  
InlB 89 KSVQGIQYHFNVTKLFVFNGLTDLNLTNLLKNGWLFLEBNKIKDLSLAKDLKLTKSL

LRR15 LRR16 LRR17

i-InlB 301 FDDNQVTNIDALAKLPNLIIGVMFNDNRVRNMSPLANLTKLEKIHAEAGNYIQDVKATSSLT  
i-InlB2 410 FNDNQVTNIDS LAKLPHLVGVDFESGNKVSNIKALTNLTKLRFINANNCIODITQALRGLT  
InlB 149 LEHNGISDHLNGLVHLPQLLESVYLGNNKITTITVLSRLTKLDTLSLEDNQISDHTVPLAGLT

LRR18

i-InlB 361 KLKELKLD RNCITVDISPLAGLNLDLELDSNOIFTNSTHGYQENLTIISNIIKDRAGEITV  
i-InlB2 470 QLEELK LARNRIMDISPLIWLNNIDELDLSNOAFINRRPIDEQVNVITIPNIVKDI TGTDLIA  
InlB 209 KLQNLVLSKNIHISDLRALAGLNL DVLLELFSQECLEKNRPINHQSNLVVPNTVKNTDGSILVT

i-InlB 421 PDTHSDNGTYKKNPISWNIP TLKKEVSYDFELYV IHGQAGSYFSGKVIQPLNKLDTIEYN  
i-InlB2 530 PNSSSDKVFYVNPNLTNLPTLKKREVQYTFNQSVMLGQATSQFSGQVIOQPFNKLDTVYKSN  
InlB 269 PEITHSDGCDYKKNVVKWHLPEFTNEVSFIIFYOPVITIGKAKAR EHGRTVTOPLKEVYTVSYD

i-InlB 481 .KAINAYGRVSGVKS A IWSHPYRTKDAKQIGTL. .SVYAGKNLRILQEAKTTS GTYYQI  
i-InlB2 590 .KAITAYGRVSPGKTS TVVWTPQCRTKDTKQVGMV. .SAYTGKNLRILR EAQTTS GTYYQF  
InlB 329 VDGTVIKTRVEAGTRITAPKPP. . .TKQ.GYVFKGWYTEKN. . . .G. .HEW

i-InlB 538 RVGKKTIGWVEAKNIAFFYKPSMEKKANGVRYIAPGKESQH VYKLPVIDAAIDE GTLAKF  
i-InlB2 647 SVGKKTIGWVEAQALGIFYQSSMEKKANGARYTVRGRGQH VYKLPVIDAAIDG GTLAKW  
InlB 371 NFNTDYMSGNDFTLVAVFKAE BTEKRTVNLTRYVKYIRGNAGIYKLPREDNSLKQ GTLASH

i-InlB 598 KGGKLT LQREVTEKEKWM LLOGIGWVKATNLSTEHYDKVLYNKAI TAYARVQIAKGRQV  
i-InlB2 707 KGRRLI LQREVTEKEKWL LLOGIGWVKATNLST. . .VLYNKPM TGYAKVKLAKGRV  
InlB 431 RCKALTVDR EARNGGKLVYRLKNIGWTKAENLSLDRYDKMEYDKGV TAYARVRNAGNSV

i-InlB 762 WSTPYR LAGYKVGSLSRYN GKNLRILREAKTRS GIIYQVRVGGKKTIGWVEAKNITVYK  
i-InlB2 762 WSNPYN LAGYKVAASLSRYT GKNLRILREAO TSNGLIYQVRVGGKKTIGWVEAKNVA VYK  
InlB 491 WTKPYN TAGAKHV NKL SVYQ GKNLRILREAKTPI TTWYQFSTGGKVIGWVDTRALNTFYK

i-InlB 718 PSMEKKANGVRYHAPGKESOHVYKLVVDAADDCGTLAKFKGKLTLOREAITGKEKWL  
i-InlB2 822 PIMEKKYKGRFVVRKKNQAYVSMPVADA AISRGKLRKGRKRVTIDRKATIQQGQWYR  
InlB 551 QSMKPTRLTRYV SANKAGE SYEYV VADNPVKRGT LAKYRNQKLI VDCQATIEGQLWYR

i-InlB 778 LQG. . .VGVKAT NVSALR YDKVFYKNTVTAYARVKTVMVWSNPYRNAGNKAIGSLSRY  
i-InlB2 882 LKG. . .AGWTKAVNLSTRR ~~~~~  
InlB 611 IRTSSTFI GWTKAANLRAQKZ ~~~~~

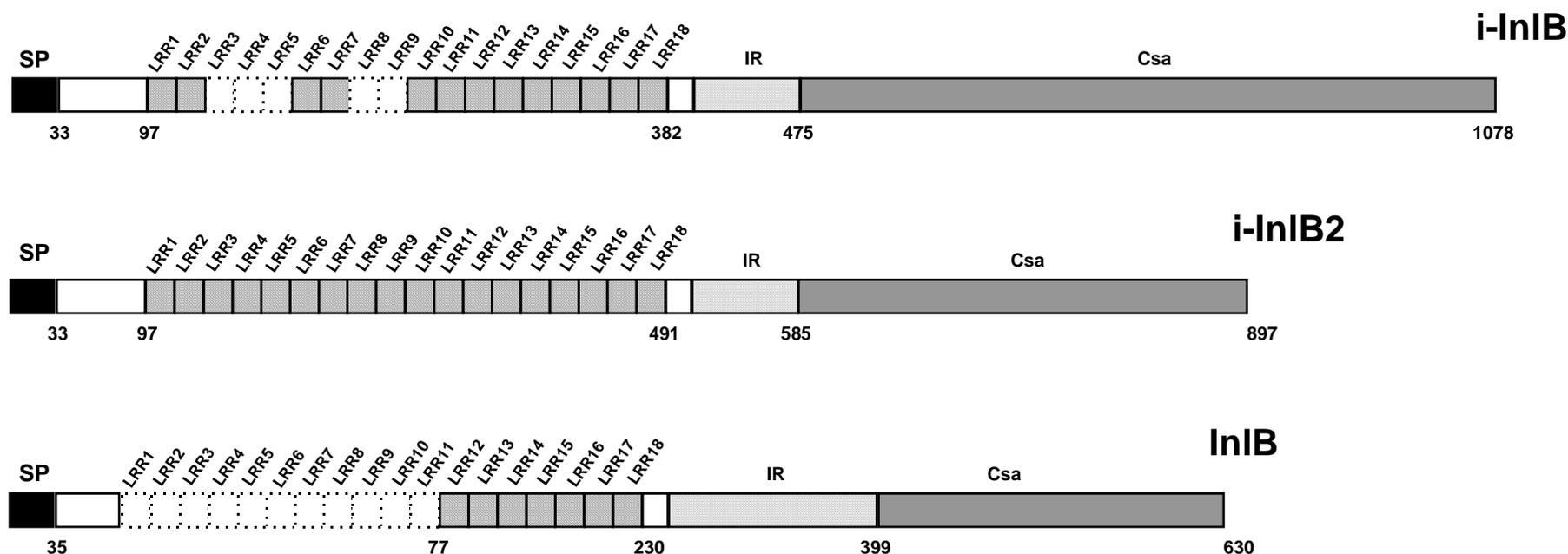
i-InlB 834 TGKNLRILREAKTRSGVYQVRAGKMI GWIEAKNLT V FYKPSMEKKVKGTRYI VPGKEG  
i-InlB2 898 ~~~~~  
InlB 632 ~~~~~

LRR's

IR

Csa

**B.**



**Figura 3.3.7.** Alineamiento y principales características estructurales de las internalinas de superficie de LIPI-2 e InIB de *L. monocytogenes*.

**(A)** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de InIB, i-InIB e i-InIB2. Las tres proteínas han sido alineadas siguiendo la misma estrategia descrita en la leyenda de la figura 3.3.6. En el extremo N-terminal se indica mediante una línea horizontal la secuencia del péptido señal (SP). Asimismo, se señala mediante un triángulo invertido el punto de corte que se prolonga un residuo en InIB con respecto a las internalinas de *L. ivanovii*. En el margen derecho se esquematizan las tres regiones estructurales en que se dividen las I-InIs: la región de repeticiones de leucinas (LRRs), una zona entrerrepeticiones (IR), y un extremo C-terminal (Csa). En la región de LRRs se señalan mediante segmentos las distintas LRRs. Nótese que su número varía entre 18 en i-InIB, 13 en i-InIB2 y 7 en InIB. Las secuencias IR se resaltan mediante un segmento punteado. Por último, el dominio C-terminal Csa se estudia más detenidamente en la figura 3.3.8.

**(B)** Representación esquemática de la estructura de i-InIB, i-InIB2 e InIB, basándonos en los resultados obtenidos con los alineamientos de sus secuencias. Los cuatro elementos estructurales: SP, IR, LRRs y Csa se representan en rectángulos de color negro, con fondo punteado, rallas oblicuas y gris, respectivamente. Los cuadros con líneas discontinuas indican los LRRs ausentes introducidos para optimizar los alineamientos. Véase la figura 3.3.8 para un análisis detallado de la estructura del dominio Csa. Los números en la parte inferior de los esquemas representan las posiciones de los aa.

