

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal I



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y PAPEL EN LA
PATOGENESIS DE SMC_L, UNA ESFINGOMIELINASA C DE
“*LISTERIA IVANOVII*”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Bruno González Zorn

Bajo la dirección del doctor

José Antonio Vázquez - Boland

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2149-4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y PAPEL EN LA
PATOGENESIS DE SmcL, UNA ESFINGOMIELINASA C
DE *Listeria ivanovii***

TESIS DOCTORAL

BRUNO GONZÁLEZ ZORN

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2001

ÍNDICE

Listado de figuras

Listado de tablas

Listado de abreviaturas

[Resumen](#)

[Summary](#)

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El género <i>Listeria</i>, la listeriosis y su importancia	2
1.1.1. Historia y situación actual.....	2
1.1.2. Patogenicidad de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. ivanovii</i>	7
1.2. Patogénesis molecular de la infección por <i>Listeria</i>	10
1.2.1. Parasitismo intracelular y sus mediadores.....	10
1.2.1.1. Internalización.....	11
1.2.1.2. Escape del fagosoma.....	12
1.2.1.3. Multiplicación intracitoplásmica.....	14
1.2.1.4. Movimiento intra e intercelular.....	15
1.2.1.5. Escape del fagosoma de doble membrana.....	16
1.2.2. Organización genética y regulación de los determinantes de virulencia.....	17
1.2.3. Interferencia con las vías de transducción de señales y respuestas de la célula hospedadora.....	22
1.2.3.1. Vías de señalización relacionadas con la invasión celular....	22
1.2.3.2. Vías de señalización celular relacionadas con el compartimento fagosomal.....	23
1.2.3.3. Interferencia con vías de señalización desde el citoplasma celular.....	24
1.2.3.4. Apoptosis.....	26
1.3. Las fosfolipasas bacterianas y su papel en la virulencia	26
1.3.1. Clasificación de la fosfolipasas bacterianas.....	31
1.3.2. Papel en la virulencia de las fosfolipasas bacterianas.....	31
1.3.2.1. PLD de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	31
1.3.2.2. PLC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.3.2.3. α -toxina de <i>Clostridium perfringens</i>	32

1.3.2.4.	β -toxina de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
1.3.2.5.	PlcA y PlcB de <i>L. monocytogenes</i>	34
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	36
3.	RESULTADOS	40
3.1.	Identificación y caracterización de la SMasa C de <i>L. ivanovii</i>	41
3.1.1.	Identificación, caracterización genética y análisis de secuencia de <i>smcL</i>	42
3.1.2.	<i>smcL</i> es un gen específico de <i>L. ivanovii</i>	47
3.1.3.	<i>smcL</i> es una unidad monocistrónica independiente de PrfA.....	47
3.1.4.	Construcción y caracterización de un mutante <i>smcL</i>	49
3.1.5.	SmcL es el único factor responsable de las propiedades hemolíticas específicas de <i>L. ivanovii</i> (hemólisis bizonal y reacción de CAMP).....	51
3.1.6.	SmcL contribuye a la virulencia de <i>L. ivanovii</i>	53
3.2.	Papel de SmcL en el escape de la vacuola fagocítica	54
3.2.1.	SmcL contribuye a la proliferación intracelular de <i>L. ivanovii</i>	55
3.2.2.	SmcL promueve la proliferación de un mutante de <i>L. monocytogenes</i> incapaz de escapar del fagosoma.....	56
3.2.3.	SmcL está implicada en la disrupción de la vacuola fagocítica.....	57
3.3.	Papel de SmcL en la generación de ceramida y apoptosis	60
3.3.1.	<i>L. ivanovii</i> produce una potente inducción de ceramida mediada por SmcL.....	64
3.3.2.	SmcL es homóloga a la SMasa neutra eucariota.....	67
3.3.3.	SmcL es un inductor específico de la CER.....	69
3.3.4.	SmcL incrementa la muerte celular por apoptosis.....	71
4.	DISCUSIÓN	75
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	89
5.1.	Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y métodos de identificación y caracterización.....	90
5.2.	Plásmidos utilizados.....	90

5.3. Medición de actividad SMasa.....	92
5.4. Medición de la actividad hemolítica.....	92
5.5. Medición de la actividad lecitinasa.....	92
5.6. Extracción de DNA cromosómico y Southern blot.....	93
5.7. Extracción de RNA total y análisis de transcripción.....	94
5.8. Sondas de DNA e hibridación de ácidos nucleicos.....	94
5.9. Hibridación de colonias.....	95
5.10. Amplificación de DNA por PCR.....	95
5.11. Paseo cromosómico (Genome walking) mediante PCR inversa.....	96
5.12. Secuenciación de DNA y análisis.....	96
5.13. Análisis Filogenéticos.....	97
5.14. Clonaje directo de productos de PCR.....	97
5.15. Construcción del mutante <i>smcL::ΩKm</i>	97
5.16. Preparación y construcción del plásmido de complementación <i>pHsmcL</i>	99
5.17. Introducción de plásmidos en <i>Listeria</i> por electroporación.....	100
5.18. Otras técnicas genéticas.....	100
5.19. Curvas de crecimiento.....	100
5.20. Ensayos de virulencia en el modelo murino.....	101
5.21. Ensayos de invasión y proliferación en cultivos celulares.....	101
5.22. Microscopía electrónica.....	102
5.23. Medición de los niveles de SM y PC.....	103
5.24. Medición de los niveles de CER y DAG.....	104
5.25. Microscopía de fluorescencia.....	104
5.26. Sandwich ELISA para la cuantificación de apoptosis y necrosis.....	105
5.27. Citometría de flujo.....	105
6. CONCLUSIONES.....	106
7. BIBLIOGRAFÍA.....	109

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo de infección intracelular de las especies patógenas de <i>Listeria</i> spp.....	10
Figura 1.2. Estructura genética de la región cromosómica del <i>locus</i> central de virulencia en <i>Listeria</i> spp.....	18
Figura 1.3. Filogenia del género <i>Listeria</i> y modelo hipotético de la evolución del <i>locus</i> central de virulencia.....	21
Figura 1.4. Centros de actuación de las fosfolipasas A1, A2, C y D.....	28
Figura 3.1.1. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas y relación filogenética de las esfingomielinasas bacterianas..	43
Figura 3.1.2. Mapa físico del <i>locus smcL</i> de <i>L. ivanovii</i>	46
Figura 3.1.3. <i>smcL</i> en el género <i>Listeria</i>	48
Figura 3.1.4. Northern blot de <i>smcL</i>	48
Figura 3.1.5. Actividades hemolíticas de <i>L. ivanovii</i> y <i>L. monocytogenes</i> en agar sangre de oveja y caballo.....	50
Figura 3.1.6. Actividad hemolítica y reacción tipo CAMP de <i>S. aureus</i> y <i>Listeria</i> en agar sangre de oveja.....	52
Figura 3.2.1. Curvas de proliferación intracelular de <i>L. ivanovii</i> y su mutante isogénico <i>smcL::ΩKm</i> en células MDBK y J774.	55
Figura 3.2.2. Efecto de la expresión de <i>smcL</i> en la proliferación intracelular del mutante de <i>L. monocytogenes</i> PKP1 en células MDBK.....	57
Figura 3.2.3. Microfotografías representativas de células MDBK infectadas con PKP1 y PKP1(pH <i>smcL</i>).....	58
Figura 3.3.1. Representación esquemática de la señalización por ceramida y respuestas celulares.....	62
Figura 3.3.2. Niveles de ceramida durante la infección con <i>L. ivanovii</i>	65
Figura 3.3.3. SmcL es una SMasa neutra.....	68
Figura 3.3.4. Actividad enzimática de SmcL.....	69
Figura 3.3.5. Niveles de ceramida durante la infección con <i>L. monocytogenes</i>	70
Figura 3.3.6. <i>L. ivanovii</i> induce apoptosis en células epiteliales MDBK.....	72
Figura 3.3.7. Análisis por FACS de la citotoxicidad de	

<i>L. monocytogenes</i> $\Delta plcAB$ y $\Delta plcAB$ (pHsmcL).....	73
Figura 3.3.8. SmcL media la apoptosis de células MDBK.....	73
Figura 3.3.9. Morfología de células MDBK infectadas infectadas con <i>L. monocytogenes</i> $\Delta plcAB$ y $\Delta plcAB$ (pHsmcL).....	74
Figura 4.1. Proliferación intracelular de PKP1 y PKP1 (pHsmcL) en células MDBK y MDCK 7 horas postinfección.....	81
Figura 5.1. Construcción del plásmido recombinogénico pLsmcL340:: Ω Km.....	98

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.3.1. Clasificación de las fosfolipasas bacterianas genéticamente identificadas.....	29
Tabla 3.1.1. Actividad SMasa y reacción de CAMP con <i>R. equi</i>	44
Tabla 3.2.1. DL ₅₀ en el modelo murino.....	53
Tabla 3.3.1. Eficiencia de escape del compartimento fagosomal y capacidad de incrementar los niveles de ceramida de las cepas de <i>L. ivanovii</i> utilizadas.....	66
Tabla 5.1. Cepas y plásmidos utilizados.....	91

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión de corazón y cerebro
CAMP	Test de Christie, Atkins y Muench-Petersen
CER	Ceramida
Crp	Proteína receptora de cAMP
Da	Dalton
DAG	Diacilglicerol
DE	Desviación estándar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL ₅₀	Dosis letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO _x	Densidad óptica a longitud de onda x
IP	Ioduro de propidio
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MGG	May-Gruenwald Giemsa
MOI	Multiplicidad de infección
ORF	Marco de lectura abierto
PAM	Colección Patogénesis Molecular Bacteriana
pb	Pares de bases
PC	Fosfatidil colina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PLC	Fosfolipasa C
RBS	Punto de unión al ribosoma
RNA	Ácido Ribonucleico
SSC	Solución nitrato sódico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SM	esfingomielina
SMasa	esfingomielinasa C
SmcL	esfingomielinasa C de <i>Listeria</i>
Tn	Transposón

RESUMEN

El patógeno de rumiantes *Listeria ivanovii* se diferencia de *Listeria monocytogenes* en que produce una fuerte hemólisis bizonal y una característica reacción de hemólisis cooperativa (tipo CAMP) en forma de pala con *Rhodococcus equi*. Hemos clonado el gen responsable de las propiedades hemolíticas diferenciales de *L. ivanovii*, *smcL*, que codifica una SMasa C similar (> 50% de identidad) a las esfingomielinasas C de *Staphylococcus aureus* (β -toxina), *Bacillus cereus* y *Leptospira interrogans*. *smcL* se transcribe de forma monocistrónica y su expresión es independiente de PrfA. Southern blots de baja especificidad han demostrado que, dentro del género *Listeria*, *smcL* está presente solamente en *L. ivanovii*. Hemos construido un mutante nulo en *smcL*. Su fenotipo en agar sangre de oveja es idéntico al de *L. monocytogenes* (i.e. débilmente hemolítico y sin reacción tipo CAMP con *R. equi*). Este mutante es menos virulento en el modelo murino, y su capacidad de proliferación intracelular en la células epitelioides bovinas MDBK está disminuida.

Se investigó el papel de SmcL en la supervivencia intracelular utilizando un mutante de *L. monocytogenes* que no poseía los determinantes membranolíticos *hly*, *plcA* y *plcB* que es, por tanto, incapaz de proliferar en el interior de las células. La complementación de este mutante con *smcL* en un plásmido fue suficiente para promover su multiplicación intracelular en las células MDBK. Mediante microscopía electrónica de transmisión demostramos que SmcL contribuye a la disrupción de la vacuola fagocítica y el escape de la bacteria al citoplasma celular. Por tanto, *L. ivanovii* posee una tercera fosfolipasa membranoactiva que, conjuntamente con PlcA y PlcB, podría actuar en concierto con la toxina formadora de poros Hly para facilitar el escape de la bacteria del compartimento vacuolar.

El extremo 5' de *smcL* es contiguo al locus de internalinas *i-inIEF*, que también es específico de *L. ivanovii* y que es requerido para la virulencia completa en el modelo murino. Por tanto, *smcL* forma parte de un nuevo cluster de virulencia en *Listeria* que es específico de especie y que podría jugar un

papel importante en el tropismo patogénico de *L. ivanovii* hacia los rumiantes. Una evidencia de que SmcL podría intervenir en la adaptación hacia los rumiantes es la selectividad lítica que manifiesta hacia los eritrocitos de estos animales, que de entre todos los mamíferos son los que contienen una mayor proporción de esfingomiélinas en sus membranas. Otra evidencia la proporcionan experimentos de infección en la línea celular canina MDCK. En estas células, procedentes de una especie no susceptible a la infección por *L. ivanovii*, y a diferencia de lo que ocurre con células bovinas MDBK, la expresión de *smcL* no promueve la proliferación intracelular del mutante de *L. monocytogenes*.

Además de su papel mecánico en la disrupción del fagosoma, SmcL interfiere en la vía de señalización mediada por la ceramida. Los resultados obtenidos con mutantes isogénicos de *L. ivanovii* y mediante complementación de un mutante $\Delta plcAB$ de *L. monocytogenes* demuestran que SmcL, a través de su actividad esfingomiélinasa, da lugar a la generación de ceramida a partir de la esfingomiélinas presente en la membrana de la célula hospedadora. Estos análisis revelaron igualmente que la generación de ceramida requiere la previa disrupción del fagosoma y el escape de las bacterias hacia el citoplasma, sugiriendo que la actividad de SmcL requiere un pH neutro. En consonancia con esta observación, mediante comparación de secuencias hemos podido determinar que SmcL es un homólogo estructural de las esfingomiélinasas neutras eucariotas. Estas homologías estructurales se correlacionaron a nivel funcional con la demostración de que SmcL tiene un pH óptimo de 7,4 y que, al igual que las esfingomiélinasas neutras eucariotas, su actividad es dependiente de Mg^{2+} . Por tanto, SmcL podría mimetizar, durante la infección intracelular, la función natural de las esfingomiélinasas neutras eucariotas, modulando la respuesta de la célula parasitada a través de la interferencia con la vía de señalización mediada por la ceramida. Uno de las respuestas celulares controladas por la ceramida es la apoptosis. *L. ivanovii* produce una intensa reacción apoptótica en células bovinas MDBK y nuestros resultados en experimentos de infección con el mutante isogénico de *L. ivanovii* afectados en *smcL* y con el mutante $\Delta plcAB$ de *L. monocytogenes* complementado con *smcL*

demuestran que la esfingomielinasa de *Listeria* induce apoptosis durante la infección intracelular.

En conclusión, SmcL es un nuevo factor de virulencia de *Listeria* con un efecto múltiple sobre la patogénesis: facilita por un lado el escape del fagosoma, por otro subvierte la respuesta celular durante la infección, y finalmente juega presumiblemente un papel en el tropismo patogénico hacia los rumiantes.

SUMMARY

The ruminant pathogen *Listeria ivanovii* differs from *Listeria monocytogenes* in that it causes strong, bizonal haemolysis and a characteristic shovel-shaped co-operative haemolytic ('CAMP-like') reaction with *Rhodococcus equi*. We cloned the gene responsible for these differential haemolytic properties of *L. ivanovii*, *smcL*. It encodes a sphingomyelinase C (SMase) highly similar (> 50% identity) to the SMases from *Staphylococcus aureus* (β -toxin), *Bacillus cereus* and *Leptospira interrogans*. The *smcL* gene was found to be transcribed monocistronically and expressed independently of PrfA. Low-stringency Southern blots demonstrated that, within the genus *Listeria*, *smcL* was present only in *L. ivanovii*. We constructed an *smcL* knock-out mutant. Its phenotype on blood agar was identical to that of *L. monocytogenes* (i.e. weak haemolysis and no shovel-shaped CAMP-like reaction with *R. equi*). This mutant was less virulent in mice and displayed impaired intracellular proliferation in the bovine epithelial-like cell line MDBK.

We investigated the role of SmcL in intracellular survival, using an *L. monocytogenes* mutant lacking the membrane-damaging determinants *hly*, *plcA* and *plcB*, which was therefore unable to grow intracellularly. Complementation of this mutant with *smcL* on a plasmid was sufficient to promote bacterial intracellular proliferation in MDBK cells. Transmission electron microscopy showed that SmcL was involved in the disruption of the phagocytic vacuole and the release of bacteria into the cytosol. Therefore, *L. ivanovii* possesses a third phospholipase with membrane damaging activity that, together with PlcA and PlcB, may act in concert with the pore-forming toxin Hly to mediate efficient escape from the vacuolar compartment.

The 5' end of *smcL* is contiguous with the internalin locus *i-inIEF*, which is also specific to *L. ivanovii* and required for full virulence in mice. Thus, *smcL* forms part of a novel, species-specific virulence gene cluster in *Listeria* which may play an important role in the pathogenic tropism of *L. ivanovii* for ruminants. Evidence that SmcL is involved in adaptation to ruminants is

provided by the selective lysis of the erythrocytes of these animals, which have the highest membrane sphingomyelin contents of all mammals. Further evidence is provided by infection experiments with the canine cell-line, MDCK. In these cells originating from a species not naturally susceptible to *L. ivanovii* infection and, in contrast to what was observed in bovine MDBK cells, *smcL* expression did not promote intracellular proliferation of the *L. monocytogenes* mutant.

In addition to the mechanical role in phagosome disruption, SmcL interferes with the ceramide signalling pathway. The results obtained with isogenic *L. ivanovii* mutants and by complementation of a *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ mutant demonstrated that the sphingomyelinase activity of SmcL generates ceramide from the sphingomyelin present in the membrane of the host cell. Furthermore, these analyses revealed that ceramide generation required prior disruption of the phagosome and bacterial escape to the cytoplasm, suggesting that SmcL activity required a neutral pH. Consistent with this, sequence comparison showed that SmcL is a structural homologue of the neutral eukaryotic sphingomyelinases. These structural homologies correlated in terms of function, as SmcL was demonstrated to have a pH optimum of 7.4 and, like the eukaryotic neutral sphingomyelinases, its activity was dependent on Mg^{2+} . Thus, during intracellular infection, SmcL may mimic the natural function of the eukaryotic neutral sphingomyelinases, modulating the response of the infected cell by interfering with the ceramide signalling pathway. One of the cellular responses controlled by ceramide is apoptosis. *L. ivanovii* induces a strong apoptotic reaction in bovine MDBK cells. Our results in experiments involving infection with the isogenic *L. ivanovii* mutant affected in *smcL* and the *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ mutant complemented with *smcL* demonstrate that the sphingomyelinase of *Listeria* induces apoptosis during intracellular infection.

In conclusion, SmcL is a new *Listeria* virulence factor with multiple effects in pathogenesis: it facilitates escape from the phagosome, subverts the cellular response during infection and, finally, plays presumably a role in the pathogenic tropism of *L. ivanovii* for ruminants.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Listeria*, la listeriosis y su importancia

Las bacterias del género *Listeria* se caracterizan por ser bacilos Gram-positivos, regulares y de extremos redondeados, con una longitud de 0,5-2 μm y un diámetro de 0,4-0,5 μm . No forman esporos ni cápsula y son anaerobios facultativos. Son inmóviles a 37°C y móviles a 20-25°C, temperaturas a las que expresan flagelos peritricos (Seeliger *et al.*, 1984; Seeliger y Jones, 1986). Cuando crecen en medios de cultivo sólidos ricos en nutrientes forman colonias redondas de bordes lisos, translúcidas, ligeramente convexas, de 0,5-1,5 mm de diámetro tras 24-48 horas de incubación aerobia a 37°C. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 30 y 37°C, si bien son capaces de crecer en un amplio rango de temperatura que oscila entre 1 y 43°C. Pueden resistir concentraciones de NaCl del 10-20% y ambientes de pH 5 a pH 9. Las bacterias pertenecientes a este género están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, siendo algunas de ellas patógenas para los animales y el hombre. Son bacterias telúricas, que se incorporan a través de la cadena alimentaria al tracto gastrointestinal del hombre y los animales, desde donde vuelve al medio natural por heces y aguas residuales, conformando un ciclo de distribución fecal-oral (Farber *et al.*, 1991; Gray *et al.*, 1966; Rocourt y Cossart, 2000; Schultz *et al.*, 1934; Seeliger *et al.*, 1976; 1986).

1.1.1. Historia y situación actual

En 1926, Murray *et al.* describen por primera vez a *Bacillus monocytogenes* como el agente causal de un brote que afectó a las cobayas y conejos de su laboratorio en la Universidad de Cambridge (Murray *et al.*, 1926). El proceso se caracterizaba por la presencia de lesiones necróticas en hígado, acompañadas de leucocitosis mononuclear (monocitosis). Coincidiendo en el tiempo, Pirie aislaba en 1927 durante sus estudios sobre la Tiger River Disease en África del Sur, una bacteria a partir de focos necróticos del gerbo que denominó *Listerella hepatolytica* (Pirie *et al.*, 1927). No fue hasta 1940 que el propio Pirie designó a este agente con su nombre actual *Listeria monocytogenes* (Pirie *et al.*, 1940).

L. monocytogenes ha sido durante mucho tiempo (1926-1974) la única especie reconocida dentro del género *Listeria*. La octava edición del Manual de Bergey (1974) amplió oficialmente el género a cuatro especies, añadiendo tres no patógenas: *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi* (descritas en 1963, 1966 y 1971, respectivamente). Sin embargo, la especie *L. monocytogenes* seguía definida como *sensu lato* e incluía cepas hemolíticas patógenas y no hemolíticas apatógenas, lo que implicaba la imposibilidad de diferenciar taxonómicamente cepas de origen epidémico de las apatógenas aisladas del medio ambiente. *L. monocytogenes sensu lato* fue dividida en 1982 como consecuencia de un análisis fenotípico y epidemiológico detallado y el desarrollo de técnicas de hibridación DNA-DNA, en 5 especies: *L. monocytogenes sensu stricto*, débilmente hemolítica y patógena, *L. seeligeri* (Ralovich, 1972; Rocourt et al. 1983; Seeliger, 1986), débilmente hemolítica y apatógena; *L. innocua* (Seeliger et al., 1981) y *L. welshimeri* (Rocourt et al., 1986), no hemolíticas y apatógenas; y un grupo que incluía las cepas de *L. monocytogenes* serovar 5, fuertemente hemolíticas y patógenas.

En 1962, el búlgaro Ivan Ivanov había aislado a partir de infecciones perinatales y abortos ovinos, una bacteria que bautizó con el nombre de *Listeria bulgarica* (Ivanov et al., 1962). En 1975 Ivanov sugirió que estas bacterias debían formar oficialmente una nueva especie dentro del género *Listeria* (Ivanov, 1975). Sin embargo, en 1982, pasaron a constituir el serovar 5 de *L. monocytogenes*. El reconocimiento oficial de una nueva especie denominada *L. ivanovii* para estas cepas del serovar 5 se realizó en 1984 bajo propuesta de Seeliger et al. (1982; 1984). En 1992, Boerlin et al. demuestran que *L. ivanovii* contiene dos subespecies: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, ambas patógenas y fuertemente hemolíticas (Boerlin et al., 1992), pero con alguna característica bioquímica diferencial, como la producción de ácido a partir de N-acetil- β -manosamina y la incapacidad de producir ácido a partir de la ribosa por parte de la subsp. *londoniensis*.

Actualmente el género *Listeria* está compuesto por dos especies potencialmente patógenas, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, y cuatro apatógenas, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi* (Jones, 1992; Rocourt *et al.*, 1986a;1986b; 1983). Los análisis de 16S rRNA muestran una relación filogenética de *Listeria* con *Streptococcus* (Collins *et al.*, 1991), mientras que los estudios que utilizaron la secuencia de 23S rRNA agrupan al género junto a los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* (Sallen *et al.*, 1996). En la 2ª edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, cuyo primer volumen se editará a lo largo de 2001 (<http://www.cme.msu.edu/bergeys/>), el género *Listeria* aparece en el Volumen 3, sección 23 de bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C (en *Listeria* oscila entre 36-42%), encuadrado dentro del dominio *Bacteria*, phylum *Firmicutes* phy. nov., clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Listeriaceae*.

Los primeros casos de listeriosis humana fueron descritos por Nyfeldt en 1929 a partir de pacientes con septicemia generalizada, mientras que Schultz *et al.* realizaron el primer aislamiento a partir de lesiones petequiales en rombencéfalo de pacientes con meningoencefalitis (Nyfeldt *et al.*, 1929; Schultz *et al.*, 1934). Burn fue el primero en describir en 1935 la “*granulomatosis infantiseptica*”, la presentación más característica de la infección neonatal por *Listeria* (Burn *et al.*, 1935). Los primeros casos de listeriosis en rumiantes se describieron por Gill en 1933 y 1937, aislando un microorganismo a partir del encéfalo de ganado ovino al que denominó *Listerella ovis* (Gill *et al.*, 1933; 1937). Los animales cursaban con una sintomatología nerviosa caracterizada por incoordinación y torneo, lo que le llevó a denominar a la enfermedad *circling disease*, que es la presentación más característica de la listeriosis en rumiantes.

Durante muchos años, el aislamiento de *Listeria* fue muy infrecuente, y la epidemiología de la enfermedad una auténtica incógnita. Sin embargo, a partir finales de los años setenta, el número de aislamientos comenzó a incrementar, y a partir de los años ochenta la presentación de brotes epidémicos humanos en Europa y los Estados Unidos permitió asociarlos por primera vez directamente con el consumo de alimentos contaminados con *L.*

monocytogenes. (Gray y Killinger, 1966; Piffaretti *et al.*, 1989, Schlech *et al.*, 1986). Los alimentos implicados con mayor frecuencia en los brotes de listeriosis en el hombre son los productos elaborados que no necesitan cocción o recalentamiento antes de su consumo, como patés, pescado ahumado, quesos frescos y ensaladas. En rumiantes, el origen de los brotes de listeriosis es también alimentario, en este caso implicando al ensilado, un alimento elaborado por el hombre, cuya obtención defectuosa hace que alcance un pH próximo al neutro, en lugar del pH ácido necesario para su conservación, permitiendo la rápida proliferación de *Listeria*. Es a partir de las materias primas obtenidas de los animales que consumen estos alimentos, donde se originan la mayoría de las contaminaciones de productos destinados al consumo humano. El agravante es que *Listeria* sobrevive, como hemos señalado anteriormente, al los procesos de elaboración de la industria alimentaria, siendo además capaz de proliferar en condiciones de refrigeración. De esta forma, *Listeria* puede alcanzar en poco tiempo una elevada carga en los alimentos y producir casos de listeriosis en los individuos que los consumen. La mortalidad de la listeriosis da lugar a unos índices que llegan a ser de hasta el 30% en algunos brotes en la población humana. Éstos afectan principalmente a aquellos individuos que presentan inmunodepresión, ya sea fisiológica (por edad muy temprana o avanzada), infecciosa (virus inmunodepresores y patologías sistémicas avanzadas) o yatrogénica (p. ej. inmunodepresión pretransplante o quimioterapia) (Lorber *et al.*, 1997). *Listeria* es, por tanto, origen de gran preocupación por parte de la Industria Alimentaria y las Administraciones de Salud Pública (Rocourt *et al.*, 1984).

Mucho antes del reconocimiento de *Listeria* como contaminante alimentario, esta bacteria era utilizada como modelo de parásito intracelular por los inmunólogos. Desde los trabajos realizados por Mackaness en los años sesenta (Mackaness, 1962; 1969) *Listeria* ha sido esencial para la comprensión de los mecanismos celulares del sistema inmune, y ha servido como base para comprender conceptos básicos de su funcionamiento. Sirva como ejemplo que la utilización de *Listeria* en el modelo de infección murino ha servido para desvelar la importancia de los macrófagos activados para la defensa frente a

parásitos intracelulares o la función del linfocito T en la activación del macrófago y la inmunidad celular (Miki y Mackaness, 1964; North, 1970; 1978).

La aparición de los brotes de listeriosis en los años ochenta y su incidencia en la Sociedad y Autoridades Sanitarias coincidió en el tiempo con la primeras investigaciones acerca de los determinantes moleculares implicados en la patogénesis de *Listeria*. Lo primero que llamó la atención a los investigadores fue que *L. monocytogenes* presentaba actividad hemolítica mientras que las especies no patógenas del género (exceptuando *L. seeligeri*) no eran hemolíticas. Los estudios llevaron al clonaje del gen de la hemolisina, *hly*, el primer factor de virulencia bacteriano al que se le pudo atribuir una función específica en la patogénesis de la infección: la disrupción de la membrana vacuolar tras la entrada de la bacteria en la célula eucariota. Este paso es trascendental para la virulencia de *Listeria*, ya que solamente es capaz de multiplicarse una vez que alcanza el citoplasma de la célula infectada, como veremos más adelante. Por tanto, *Hly* de *Listeria* fue, además, el primer factor al que se le asignó una función crítica en la proliferación de un parásito intracelular en el interior de la célula eucariota.

A partir de entonces, *Listeria* ha sido ampliamente estudiada como modelo de patógeno intracelular hasta el punto de que, hoy día, ocupa un puesto privilegiado dentro de la investigación biomédica que va más allá de la microbiología o las enfermedades infecciosas. *Listeria* ha contribuido de forma determinante a la comprensión de los mecanismos más básicos de la biología fundamental. No olvidemos que el concepto actual del control y la dinámica del citoesqueleto de actina de las células eucariotas, imprescindible para comprender fenómenos como la migración linfocitaria, metastatización tumoral o embriogénesis, se debe en gran medida a los trabajos realizados con ActA de *Listeria* (Alberts *et al.*, 1994; Tilney *et al.*, 1992; 1993).

Como fruto de esta investigación básica, el estudio de este patógeno ha revelado su aplicación biomédica y ha permitido la utilización de *Listeria* como vector vacunal frente a diversas patologías. Así, esta bacteria ya ha mostrado ser efectiva en modelos experimentales frente a otros agentes bacterianos

(*Salmonella*, *Legionella*), víricos (HIV, CDV) e incluso patologías de origen *a priori* no infeccioso como el carcinoma colorectal y carcinoma renal (Dietrich *et al.*, 1998).

1.1.2. Patogenicidad de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*

L. monocytogenes y *L. ivanovii* son patógenos oportunistas y parásitos intracelulares facultativos, aunque poseen características biológicas y patogénicas diferenciales. Mientras que *L. monocytogenes* está ampliamente distribuída en el medio ambiente y afecta al hombre, mamíferos y aves (Seeliger *et al.*, 1986, Rocourt *et al.*, 1986a), *L. ivanovii* se aísla raramente de la naturaleza y, aunque se ha descrito algún caso en humanos, afecta casi exclusivamente a rumiantes, especialmente al ganado ovino (Cummins *et al.*, 1994; Elischerova *et al.*, 1990; Lessing *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1994). En sus hospedadores susceptibles induce abortos, septicemia neonatal o enteritis, pero nunca encefalitis, la manifestación clínica más típica de la listeriosis ovina causada por *L. monocytogenes* (Cooper *et al.*, 1978; Lefford *et al.*, 1979; Hof *et al.*, 1988; Low *et al.*, 1993; Rocourt *et al.*, 1985).

Las presentaciones clínicas más características de la listeriosis son:

a.) **meningoencefalitis** (sólo *L. monocytogenes*): Se trata de la presentación más frecuente de la listeriosis en humanos adultos y ganado ovino. En el hombre se instaura en forma de meningitis o meningoencefalitis, cursando con fiebre, ataxia, depresión y estado mental alterado, y que puede llegar al coma y la muerte si no se instaura tratamiento. En ganado ovino la infección del sistema nervioso central suele afectar primariamente al rombencéfalo con afectación meníngea secundaria a la invasión del tejido nervioso, y cursa con nistagmo, ataxia, y tortícolis. Los animales presentan marcha en círculos que evoluciona a postración y pedaleo, movimiento paroxístico de las extremidades y muerte.

b.) **forma perinatal:** La infección del feto es transplacentaria y se establece durante el último tercio de la gestación, siendo la consecuencia más frecuente el aborto. Cuando la infección se adquiere próxima al término, el feto nace con una septicemia neonatal generalizada, que en el caso de niños se describe como *granulomatosis infantiseptica* y cursa con lesiones granulomatosas diseminadas de forma miliar en la superficie corporal y especialmente en el hígado (Seeliger, 1976). En otros casos de presentación más tardía el recién nacido presenta como única manifestación una meningitis neonatal por *L. monocytogenes*. En vacuno y ovino, la enfermedad se presenta de forma similar, produciéndose generalmente aborto o nacimiento de prematuros no viables.

c.) **septicemia:** Es poco frecuente en rumiantes adultos. En humanos se desarrolla principalmente en individuos adultos inmunodeprimidos, en los que la antibioterapia por vía endovenosa es exitosa, si se establece antes de la afectación irreversible de órganos vitales (Nieman *et al.*, 1980).

d.) **Presentaciones locales:** Se han descrito multitud de presentaciones localizadas con infección circunscrita a un determinado órgano, como mastitis, endocarditis, enteritis, queratoconjuntivitis, miocarditis e iritis (Asahi, 1963; Lefford *et al.*, 1979 Osebold *et al.*, 1954a, 1954b).

Además de la diferencia que presentan *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* en infecciones naturales, también tienen un comportamiento distinto en el modelo experimental murino. *L. ivanovii* posee una DL_{50} mayor que *L. monocytogenes* (10^6 - 10^7 frente a 10^4 - 10^5 en *L. monocytogenes*), y coloniza el hígado, pero no el bazo, mientras que *L. monocytogenes* prolifera de la misma forma en ambos órganos.

L. monocytogenes y *L. ivanovii* también se diferencian en sus características hemolíticas *in vitro*. *L. monocytogenes* presenta una β -hemólisis muy débil, que muchas veces sólo puede llegar a detectarse levantando las colonias del medio. Sin embargo, *L. ivanovii* produce un amplio halo de doble hemólisis en agar sangre de cordero, que la hace inconfundible del resto de las

especies del género. Para evidenciar la actividad hemolítica de *L. monocytogenes* y como criterio de identificación se utiliza comúnmente una reacción de hemólisis sinérgica con *Staphylococcus aureus* β -toxina positivos, también llamada reacción de CAMP (acrónimo de Christie, Atkins y Muench-Petersen, primeros en describir este fenómeno entre *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*) (Christie *et al.*, 1944; Vázquez-Boland *et al.*, 1992b). Esta reacción se basa en el incremento de la actividad β -hemolítica de *L. monocytogenes* cuando crece en la proximidad de *S. aureus*, reacción que no se produce con *L. ivanovii* (Seeliger *et al.* 1986). Paralelamente se ha desarrollado una reacción tipo CAMP en la que se ha sustituido a *S. aureus* por *Rhodococcus equi* como bacteria marcadora. Bajo el efecto de las exosustancias que secreta esta bacteria se obtiene un incremento de la actividad β -hemolítica característica de *L. ivanovii*, en el que el halo externo de hemólisis parcial se lisa completamente, dando lugar a una β -hemólisis en forma de pala que se utiliza como criterio diferenciador de *L. ivanovii* frente al resto de especies del género. *L. monocytogenes* también produce una reacción tipo CAMP con *R. equi*, pero ésta adquiere una forma redondeada, de raqueta o cerilla, en lugar de la característica forma de pala, siendo por tanto claramente distinguible de la de *L. ivanovii* (Ripio *et al.*, 1995). Las propiedades hemolíticas características de *L. ivanovii* se deben, presumiblemente, a que secreta una potente esfingomielinasa C (SMasa), producida exclusivamente por esta especie dentro del género *Listeria* (Vázquez-Boland *et al.*, 1989).

1.2. Patogénesis molecular de la infección por *Listeria*

1.2.1. Parasitismo intracelular y sus mediadores

L. monocytogenes y *L. ivanovii* son capaces de sobrevivir en macrófagos y de invadir una variedad de células normalmente no fagocíticas como hepatocitos, células epiteliales y endoteliales (Cossart *et al.*, 1998; Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991; Greiffenberg *et al.*, 1997; 1998; Lingnau *et al.*, 1995). En todos estos tipos celulares, las listerias patógenas realizan un ciclo de vida intracelular que implica secuencialmente escape de la vacuola fagocítica, multiplicación intracitoplásmica, motilidad por polimerización de actina y paso directo a la célula vecina, en la que reinician el ciclo (Fig. 1.1.). De esta forma, *Listeria* se disemina por los tejidos del hospedador al abrigo de las defensas

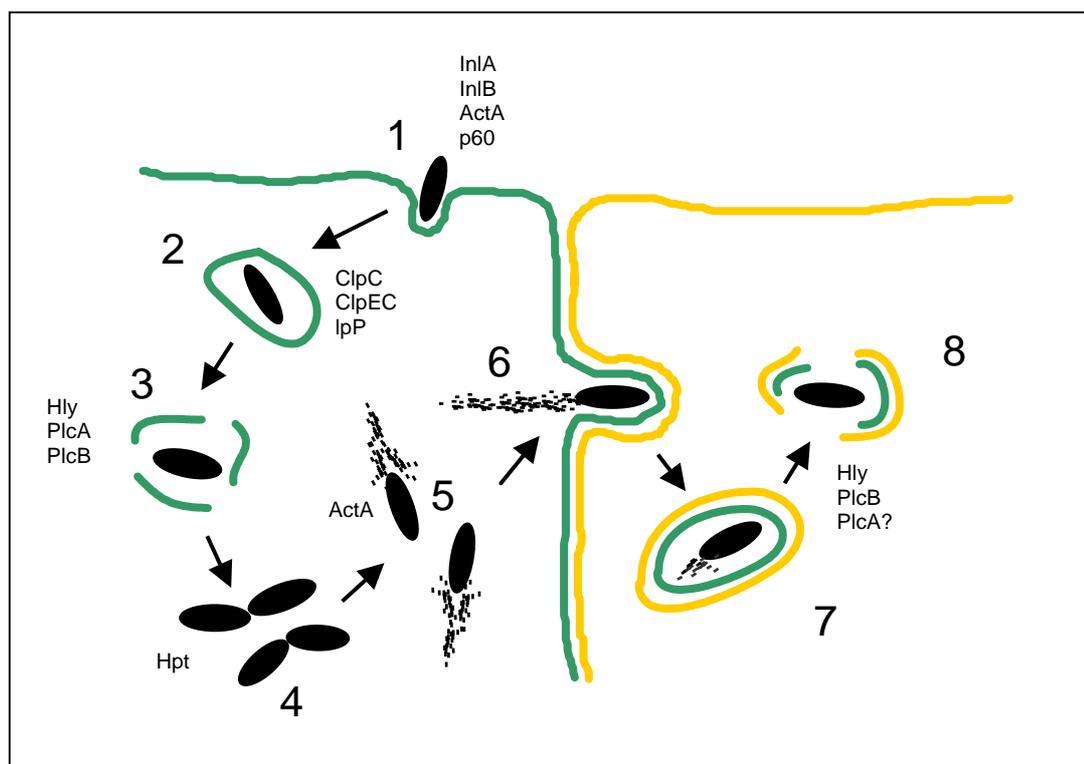


Fig. 1.1. Ciclo de infección intracelular de las especies patógenas de *Listeria* spp. Se indican los factores de virulencia que han sido implicados en cada etapa del proceso. 1, adhesión e invasión de la célula hospedadora. 2, inclusión en un compartimento vacuolar. 3, lisis de la vacuola y escape al compartimento citoplásmico. 4, multiplicación en el citoplasma. 5, movimiento intracelular. 6, protrusión hacia la célula vecina. 7, inclusión en un compartimento vacuolar de doble membrana. 8, lisis de la doble membrana, liberación al citoplasma de la célula vecina y comienzo del ciclo desde 4.

humorales del sistema inmune del hospedador (revisado por Cossart *et al.*, 1998; Ireton *et al.*, 1997; 1998).

Desde 1985, año en que se identificó el primer determinante genético de un factor de virulencia de *Listeria* (Vicente *et al.*, 1985), se han caracterizado diversos factores de virulencia implicados en las distintas etapas de su vida intracelular.

1.2.1.1. Internalización

El ciclo intracelular de *Listeria* comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la consiguiente entrada de la bacteria a la misma. La invasión de células no fagocíticas se realiza por un mecanismo tipo *zipper*, en el que la bacteria se hunde progresivamente en la superficie celular hasta que es finalmente internalizada (Finlay *et al.*, 1991; Ireton *et al.*, 1998). Durante este proceso la membrana de la célula diana envuelve estrechamente a la bacteria, sin que se produzcan mayores desorganizaciones locales del citoesqueleto celular características de la invasión por otros patógenos intracelulares como *Salmonella* o *Shigella* (Ireton *et al.*, 1998; Isberg *et al.*, 1994; Mengaud *et al.*, 1996; Swanson, 1995).

La naturaleza multisistémica de la infección por *Listeria* indica que reconoce una variedad de receptores celulares distintos. Se han descrito la E-caderina como receptor celular de las internalina A (InIA) de *L. monocytogenes* y, como receptores de la internalina B (InIB) el gC1qR y, recientemente, el Met (ver sección 1.2.3.1.) (Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991; Braun *et al.*, 1998; 2000; Parida *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2000, Cossart, 2001). Las internalinas son proteínas de superficie que pertenecen a una superfamilia de proteínas, caracterizada por presentar repeticiones ricas en leucina (LRR), cuya función es la de mediar interacciones proteína-proteína. InIA presenta 800 aminoácidos, entre los que destacan 15 LRR en su extremo N-terminal y un motivo LPXTG en su extremo C-terminal que media el anclaje covalente de la proteína a la pared bacteriana (Fischetti *et al.*, 1990; Dhar *et al.*, 2000, Lebrun *et al.*, 1996; Navarre *et al.*, 1994; 1996; Schneewind *et al.*, 1995). InIB, sin

embargo, tiene 632 aminoácidos y presenta sólo 8 motivos LRR en su extremo N-terminal. Su extremo C-terminal carece de motivos LPXTG, pero contiene 3 repeticiones de 80 aa que comienzan con un motivo GW, y que forman un dominio de anclaje que asocia de forma laxa a InlB con la superficie de la bacteria (Braun *et al.*, 1997; Jonquières *et al.*, 1999, Müller *et al.*, 1998).

Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio demuestran que la proteína polimerizadora de actina, ActA, está también implicada en la invasión por *Listeria*, probablemente vía algún componente de la matriz extracelular, como los proteoglicanos de heparán sulfato (Álvarez-Domínguez *et al.*, 1997, Suárez *et al.*, 2001).

1.2.1.2. Escape del fagosoma

Durante la invasión, *Listeria* es englobada en una vacuola fagocítica, que es acidificada poco después de la internalización (Beauregard *et al.*, 1997). Existen evidencias de que *L. monocytogenes* preserva su viabilidad intravacuolar previniendo la maduración del fagosoma a fagolisosoma (Álvarez-Domínguez *et al.*, 1997). Treinta minutos tras la entrada, las bacterias comienzan a romper la membrana vacuolar, y tras 2 horas, alrededor del 50% de la población bacteriana intracelular se encuentra libre en el citoplasma (Gaillard *et al.*, 1997; Goebel y Kreft, 1997). Para realizar estas funciones, *Listeria* cuenta con tres determinantes membranolíticos: Hly, PlcA y PlcB. Hly es una toxina formadora de poros que se denomina listeriolisina O (LLO) en *L. monocytogenes* e ivanolisina O (ILO) en *L. ivanovii*. Se trata probablemente del factor de virulencia más importante de los descritos hasta el momento en *Listeria*. Mutantes en sus genes codificantes, *llo* o *ilo*, son completamente avirulentos en el modelo murino (Haas *et al.*, 1992; Kreft *et al.*, 1989, Mengaud *et al.*, 1988). LLO e ILO pertenecen a la familia de toxinas colesterol-dependientes (antes conocidas como tiol-activadas), al que pertenecen también la streptolisina (SLO) de *Streptococcus pyogenes* o la perfringolisina (PFO) de *Clostridium perfringens* (Alouf, 1999; Berche *et al.*, 1987; Smyth y Duncan, 1978). De todas ellas, sólo ILO y LLO están producidas por patógenos intracelulares, y existen evidencias de que poseen propiedades particulares

que las diferencian de las demás, entre ellas una serie de adaptaciones evolutivas a su función intracelular. Así, LLO presenta una actividad máxima a pH ácido, lo que evita que sean activas en el compartimento citoplásmico y, por tanto, tóxicas para la célula hospedadora (Kreft *et al.*, 1989; Vázquez-Boland *et al.*, 1989). Asimismo, posee una secuencia tipo PEST (P, Prolina; E, Glutamina; S, Serina; T, Treonina), que le permite ser reconocida por la maquinaria proteolítica del citoplasma eucariota, evitando su actividad sobre las propias membranas de la célula hospedadora (Decatur *et al.*, 2000; Lety *et al.*, 2001). De esta forma, *Listeria* consigue preservar su nicho intracelular, en el que se multiplica para proseguir su ciclo infeccioso.

La función membranolítica de Hly se ve reforzada por la acción de dos fosfolipasas C, PlcA, específica de fosfatidilinositol, y PlcB, una lecitinasa de amplio rango de sustrato. El determinante genético de PlcA, *plcA*, fue el primero en ser identificado y codifica una proteína de peso molecular aproximado de 33 kDa (Leimeister-Wächter *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1991). Ensayos de infección con un mutante de delección en *plcA* realizados en macrófagos murinos derivados de médula ósea determinaron que el mutante permanecía englobado en el fagosoma de membrana simple (aquel que se forma tras la invasión desde el espacio extracelular, ver Fig. 1.1.) en mayor medida que la cepa parental, por lo que se le ha asignado a PlcA una función secundaria en el escape al citoplasma durante la infección intracelular de *Listeria* (Camilli *et al.*, 1993). Por otra parte, la expresión de *plcA* por la especie apatógena *L. innocua* permitió su multiplicación en el interior de la vacuola fagocítica (Schwan *et al.*, 1993), sin que sepamos, hasta el momento, cual es el significado de este resultado en la patogénesis de *Listeria*.

El otro determinante genético que codifica la segunda fosfolipasa C de *Listeria* es *plcB*. Su producto, PlcB o lecitinasa, es activo sobre un amplio rango de fosfolípidos que incluyen la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina y la esfingomielina (SM) (Geoffroy *et al.*, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 1992a). La expresión de *plcB* es estrictamente dependiente de PrfA, y la actividad lecitinasa se evidencia fácilmente por una halo de opacidad alrededor de las colonias bacterianas en placas de agar yema de huevo, por lo

que PlcB se utiliza actualmente en *Listeria* como marcador de la expresión de factores PrfA-dependientes (Ripio *et al.*, 1997a; 1997b; Brehm *et al.*, 1999). PlcB es secretado por la bacteria en forma de un polipéptido inactivo de 33 kDa, proPlcB, que necesita una maduración extracelular (Geoffroy *et al.*, 1993; Niebhur *et al.*, 1993; Raveneau *et al.*, 1992). Ésta está mediada por una metaloproteasa, Mpl, que da lugar a la forma madura de PlcB de 29 a 30 kDa (Poyart *et al.*, 1993). El gen codificante de esta metaloproteasa, *mpl*, es el primero que forma el operón de la lecitinasa seguido por *actA* y *plcB* (Vázquez-Boland *et al.*, 1992a). Sin embargo, experimentos realizados con un mutante Δmpl han mostrado la presencia de PlcB madura durante la infección intracelular, lo que indica que proPlcB también puede ser activada por una vía Mpl-independiente (Marquis *et al.*, 1997).

1.2.1.3. Multiplicación intracitoplásmica

Una vez en el citoplasma, las bacterias se multiplican con un tiempo de generación de aproximadamente 1h (Gaillard *et al.*, 1987; Portnoy, 1998). Poco se sabe acerca de los determinantes de virulencia implicados en esta fase de replicación intracitoplásmica. En *L. monocytogenes*, el crecimiento intracelular no implica la inducción de genes de proteínas de estrés, como ocurre en otros patógenos intracelulares, lo que indica que el compartimento citoplásmico es permisivo para la proliferación de *L. monocytogenes* (Hanawa *et al.*, 1995). Se ha mostrado, que genes metabólicos como *arpJ* o *purD*, *purE* y *purH* se activan en este compartimento, aunque mutantes nulos en estos genes presentan una proliferación intracitoplásmica inalterada (Klarsfeld *et al.*, 1994).

Recientemente hemos identificado y caracterizado en nuestro laboratorio el primer factor de virulencia específicamente implicado en la fase replicativa de un parásito intracelular en el interior de la célula hospedadora (Chico-Calero *et al.*, 2001). Se trata de *hpt* de *L. monocytogenes*, que codifica Hpt, un transportador de hexosas fosfato homólogo a la translocasa eucariota que transporta glucosa-6-fosfato del citoplasma al interior del retículo endoplasmático en la última fase de la gluconeogénesis y glucogenolisis. La pérdida de Hpt se traduce en una deficiente replicación intracitoplásmica de

Listeria y la reducción de su virulencia en el modelo murino. Este es un claro ejemplo cómo los patógenos microbianos se adaptan al parasitismo intracelular mimetizando los mecanismos vitales de sus células hospedadoras.

1.2.1.4. Movimiento intra e intercelular

Las bacterias intracitoplásmicas se ven envueltas, inmediatamente tras su entrada, en una nube de filamentos de actina, que se reorganiza en un polo de la bacteria y da lugar a una larga cola de actina, de hasta 40 μm de longitud. Así, *Listeria* se propulsa a través del citoplasma a una velocidad aproximada de 0,3 $\mu\text{m/s}$. Estas funciones están codificadas en *Listeria* por un solo gen, *actA*, cuya proteína codificante, ActA, es la responsable del movimiento intra e intercelular de *Listeria* (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992; Vázquez-Boland *et al.*, 1992a). Esta proteína bacteriana ha servido como modelo para analizar los complejos sistemas de control del citoesqueleto de actina y la motilidad celular en eucariotas. Su forma madura presenta 3 dominios. Un dominio N-terminal (aa 1-234), rico en residuos catiónicos y esencial para el movimiento intracelular de *Listeria*, que contiene la información necesaria para el ensamblaje de la F-actina. Un dominio central de repeticiones ricas en prolina (aa 235-394), requeridas para el contacto con las proteínas VASP y Mena de la célula eucariota y un dominio C-terminal (aa 395-610), que permite el anclaje de ActA a la superficie bacteriana y presenta similitud con la zixina, una proteína eucariota relacionada con la adherencia y las fibras de estrés, que se podría considerar como el homólogo eucariota de ActA.

El movimiento intracitoplásmico de *Listeria* es aleatorio, y en algún momento la bacteria llega a alcanzar el límite de la periferia celular. Allí contacta con la membrana y la empuja hacia el exterior dando lugar a una protrusión similar a un pseudópodo, que algunos autores han llegado a denominar listeriópodo. Esta estructura penetra en la célula vecina y es englobada por fagocitosis, resultando en la formación de un fagosoma de doble membrana que contiene una *Listeria* (Fig. 1.1.) (Beckerle *et al.*, 1998; Chakraborty, 1996; Cossart, 1995; Dramsi y Cossart, 1998; Lasa *et al.*, 1998; Machesky *et al.*, 1999; Smith y Portnoy, 1997).

1.2.1.5. Escape del fagosoma de doble membrana

El compartimento fagosomal en el que se encuentra la bacteria tras el paso de célula a célula está formado por una membrana interna, que pertenece a la célula de origen, y una membrana externa, de la propia célula infectada *de novo*. Se conoce poco acerca del comportamiento biológico de este fagosoma en lo que se refiere a su reconocimiento como fagosoma por parte de la célula, su maduración y su actividad bactericida. Se sabe que tan solo 5 minutos después de su formación, *Listeria* escapa de este compartimento al citoplasma de la célula, desde donde inicia un nuevo ciclo de proliferación intracelular y paso de célula a célula (Fig. 1.1.) (Dabiri *et al.*, 1990, Mounier *et al.*, 1990, Sechi *et al.*, 1997, Robbins *et al.*, 1999, Theriot *et al.* 1992; 1995; Tilney *et al.*, 1989; 1993). Se ha identificado a la fosfolipasa PlcB como factor mediador de la disrupción de este fagosoma, ya que mutantes nulos en su gen codificante, *plcB*, permanecían preferentemente englobados en fagosomas de doble membrana (Vázquez-Boland *et al.*, 1992a).

Aunque la efectividad de *Listeria* para escapar de este compartimento haga pensar que Hly también debe estar implicada en este proceso, la presentación de evidencias experimentales que lo demuestren ha sido muy compleja, debido a que mutantes nulos en *hly* quedan englobados en el fagosoma de membrana simple tras la invasión, y no dan lugar a la formación de fagosomas de doble membrana durante la infección. Recientemente y utilizando una aproximación muy elegante, el grupo de Portnoy ha demostrado la implicación de Hly en la ruptura del fagosoma de doble membrana. Para ello han incubado mutantes de *L. monocytogenes* nulos en *hly* con níquel y posteriormente con la proteína purificada Hly marcada con colas de histidina. Las bacterias escapan de la vacuola primaria, pero al salir al citoplasma Hly resulta degradada y no pueden escapar del fagosoma de doble membrana (Gedde *et al.*, 2000). El escape de este compartimento está por tanto mediado por la acción primaria de Hly en cooperación con la fosfolipasa PlcB, lo que muestra la importancia de Hly como factor membranolítico central en la patogénesis de *Listeria*, y la acción de las fosfolipasas como potenciadores de

la acción Hly en el escape de la bacteria del fagosoma del compartimento vacuolar.

1.2.2. Organización genética y regulación de los determinantes de virulencia

Las funciones de virulencia necesarias para el parasitismo intracelular de *Listeria* están codificadas en un locus de 9 kb denominado región central de virulencia. Ésta se encuentra en idéntica posición, entre los genes metabólicos *prs* (fosforibosil pirofosfato sintasa) y *ldh* (lactato deshidrogenasa) en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Fig. 1.2.) (Gouin *et al.*, 1994; Vázquez-Boland *et al.*, 1992a). Este cluster está organizado alrededor del monocistrón *hly*, que codifica a la hemolisina, Hly. El gen *hly* está rodeado por dos operones asociados a la virulencia que también portan genes codificantes de factores membranolíticos. El operón de la lecitinasa, que se encuentra en posición 3' respecto de *hly* contiene los genes *mpl*, *actA* y *plcB*, que codifican, respectivamente, una metaloproteasa requerida para la maduración de PlcB, ActA, y la fosfolipasa PlcB que, como hemos señalado anteriormente, contribuye a la disrupción del fagosoma. Al otro extremo de *hly* está el operón *plcA-prfA*, que codifica la fosfolipasa específica de fosfatidilinositol PlcA y el factor de transcripción PrfA (Vázquez-Boland *et al.*, 1992; Kreft *et al.*, 1999; Lampidis *et al.*, 1994; Portnoy *et al.*, 1991). PrfA es el regulador central de la virulencia de *Listeria*, y activa la expresión de los genes del locus de virulencia *hly* y la de otros genes de virulencia ubicados en otros *loci*, incluyendo algunos miembros de la familia multigénica de las internalinas. Los promotores de los genes regulados por PrfA presentan unas secuencias palindrómicas de 14pb, denominadas cajas PrfA, ubicadas 41pb corriente arriba del lugar de inicio de la transcripción, que son las dianas de PrfA en el DNA. PrfA está estructural y funcionalmente relacionado con Crp de las enterobacterias y es el único regulador de la virulencia descrito hasta el momento en *Listeria*.

En *L. monocytogenes*, una variedad de señales dependientes de la fase de crecimiento y el medio ambiente modulan la expresión del regulón de

virulencia por medio de PrfA. Estas señales activadoras incluyen elevada temperatura (37°C), condiciones de estrés, secuestro de componentes químicos del medio extracelular, contacto con células eucariotas y el ambiente citoplásmico de la célula hospedadora. El modelo actual del mecanismo de regulación por PrfA implica un cambio alostérico de PrfA mediado por un cofactor de bajo peso molecular todavía no identificado y cuyos niveles dependerían de las condiciones ambientales. La activación de PrfA da lugar a la síntesis de más proteína PrfA a través de un circuito de retroalimentación positiva mediado por un promotor PrfA-dependiente que gobierna la síntesis del RNAm del operón *plcA-prfA*. (Kreft *et al.*, 1995; Brehm *et al.*, 1996; Ripio *et al.*, 1997a; Vega *et al.*, 1998; Engelbrecht *et al.*, 1998a).

Curiosamente, los niveles basales de expresión de *prfA* y, por tanto, de los factores PrfA-dependientes difieren entre la dos especies patógenas del género *Listeria*. *L. monocytogenes* presenta, en condiciones de crecimiento estándar a 37°C, unos niveles de expresión de *prfA* bajos, mientras que *L. ivanovii*, en las mismas condiciones de crecimiento, sobreexpresa constitutivamente *prfA* y todos los genes que dependen de PrfA. Este podría ser el motivo por el que *L. ivanovii* es más hemolítica que *L. monocytogenes*, ya que sobreexpresa los genes codificantes de los factores membranoactivos PrfA-dependientes *hly*, *plcA* y *plcB*. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos descrito un mutante desregulado de *L. monocytogenes*, P-14A, que, debido a una mutación puntual en *prfA*, sobreexpresa constitutivamente todos los factores dependientes de PrfA. P-14A presenta una β -hemólisis y una reacción tipo CAMP con *R. equi* muy potentes. Sin embargo, su fenotipo hemolítico no es el de *L. ivanovii*, ya que carece del halo externo de hemólisis incompleta y presenta una reacción tipo CAMP en forma de cerilla, y no de pala como es característico de *L. ivanovii* (Ripio *et al.*, 1996; 1997b, Vázquez-Boland *et al.*, 1989). Estas observaciones indican que las propiedades hemolíticas de *L. ivanovii* no se deben simplemente a la sobreexpresión de *hly*, *plcA* y *plcB*, sino a la secreción de algún otro factor membranoactivo propio de *L. ivanovii*. Este factor es, presumiblemente, una esfingomielinasa C, que ya se ha purificado a partir del sobrenadante de cultivo de *L. ivanovii* y parece estar implicada en la

reacción de CAMP en forma de pala con *R. equi* (Vázquez-Boland *et al.*, 1989).

A pesar de la idéntica estructura genética y organización transcripcional del locus central de virulencia en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, los homólogos genéticos que lo forman presentan, sin embargo, un nivel de divergencia significativo, entre el 73% y el 78% a nivel de DNA, lo que es compatible con la distancia genética que separa a las dos especies patógenas del género (Lampidis *et al.* 1994; Haas *et al.*, 1992). Esta divergencia es más pronunciada en el caso de los genes *actA*, que solamente presentan un 34% de identidad entre las dos especies, aunque su función biológica sea la misma (Gerstel *et al.*, 1996; Gouin *et al.*, 1995, Kreft *et al.*, 1995). Por otra parte, el cromosoma de una tercera especie del género, *L. seeligeri*, también tiene el locus central de virulencia (Fig. 1.2.). Sin embargo, en esta especie se encuentran ORFs adicionales, cuya presencia podría indicar la estructura genética de un ancestro común en fase de depuración, o bien la degeneración por inserción de un cluster de virulencia optimizado en las especies patógenas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Gouin *et al.*, 1994; Kreft *et al.*, 1999; Vázquez-Boland *et al.*, 2001a). Estos datos sugieren que el locus central de virulencia ya estaba presente en un ancestro común a las especies actuales de *Listeria*. En estas tres especies el locus está insertado de forma estable, y no se encuentran trazas de genes de movilidad, secuencias de inserción (IS), repeticiones directas o secuencias diana utilizadas para la integración de elementos genéticos móviles. Además, el contenido en G+C, la utilización de codones y la frecuencia relativa de dinucleótidos no difiere significativamente de las del resto del cromosoma en las especies correspondientes. Todas estas evidencias hacen que sea poco probable que el locus haya sido adquirido por estas especies en eventos independientes de transferencia horizontal de genes que hubiera ocurrido después del proceso de especiación del género, y son compatibles con la idea antes señalada de que dicho locus ya estaba presente en un ancestro común de *Listeria*. La presión selectiva habría hecho evolucionar al locus hacia su mantenimiento funcional, como ocurre en las especies patógenas intracelulares *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, o hacia su degeneración/conservación original como en *L. seeligeri*.

Análisis detallados de las regiones de inserción que circundan el cluster *hly* de virulencia realizados recientemente en nuestro laboratorio (Vázquez-Boland *et al.*, 2001a; 2001b), han evidenciado la presencia de más ORFs pequeños, *orfL*, *orfX* y *orfZ*, cuyos productos presentan homología con proteínas de bacteriófagos. La presencia de algunos de estos ORFs en especies que actualmente no presentan el locus central de virulencia, *orfZ* en *L. innocua* y *orfL* en *L. welshimeri*, hace pensar que estas especies han surgido tras excisión de dicho elemento genético. Además, *orfZ* de *L. innocua* está presente en *L. monocytogenes*, mientras que *orfL* de *L. welshimeri* lo está en *L. ivanovii* (Fig. 1.2.), de lo que deducimos que *L. innocua* ha surgido de la

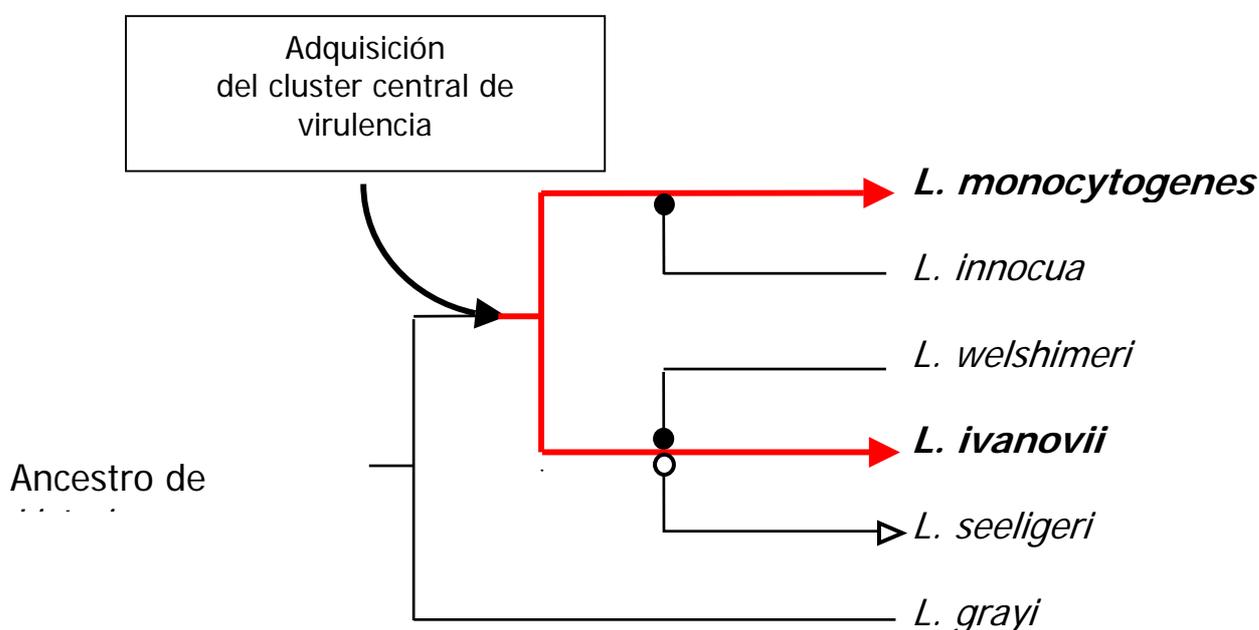


Fig. 1.3. Filogenia del género *Listeria* y modelo hipotético de la evolución del locus central de virulencia. El camino seguido por el cluster tras su adquisición por una línea de un ancestro común se indica con flechas. Las líneas rojas indican conservación de la función del locus de virulencia. Los círculos negros indican pérdida del cluster, dando lugar a las especies apatógenas *L. innocua* y *L. welshimeri*. El círculo blanco indica corrupción del cluster, dando lugar a una versión no funcional en la especie apatógena *L. seeligeri*. Las longitudes de las ramas no representan distancias genéticas (Vázquez-Boland *et al.*, 2001a).

pérdida del locus de *L. monocytogenes*, mientras que *L. welshimeri* lo ha hecho a partir de *L. ivanovii*. Esta explicación es compatible con la estructura filogenética del género *Listeria*, en el que la sexta especie del género, *L. grayi*, es la especie más diferenciada a juzgar por los análisis de su RNAr 16S y 23S. Los ORFs *orfL*, *orfX* y *orfZ* están ausentes en esta especie, con lo que correspondería a la especie evolucionada más similar al ancestro común del género *Listeria* (Collins *et al.*, 1991; Sallen *et al.*, 1996). El modelo actual de

evolución de las especies que conforman el género *Listeria* está representado en la figura 1.3.

1.2.3. Interferencia con las vías de transducción de señales y respuestas de la célula hospedadora

Como consecuencia de la caracterización de los factores de virulencia de las bacterias patógenas, en estos últimos dos años se ha desarrollado una nueva disciplina en la interfase de la Microbiología y la Biología Celular, la Microbiología Celular, que estudia la interacción entre la bacteria y la célula hospedadora. La utilización de bacterias patógenas para abordar cuestiones de fisiología celular está empezando a mostrar aplicaciones prometedoras y resultados sorprendentes.

L. monocytogenes es capaz de activar cascadas de señalización durante la infección y, aunque su estudio sea aun muy reciente, ha resultado ser uno de los pilares de la investigación en Microbiología Celular, desvelando cuestiones importantes que han contribuido enormemente a la comprensión de la relación bacteria-hospedador (Galán, 2000; Falkow, 1999; Kuhn *et al.*, 1999; Cossart y Lecuit, 1998; Cossart *et al.*, 1996). La implicación de complejas redes de señalización eucariotas en esta relación hace que su investigación se compartimentalice en función de la fase del ciclo infectivo en la que se estudia la interacción.

1.2.3.1. Vías de señalización relacionadas con la invasión celular

La primera evidencia de que la célula eucariota mediaba activamente la internalización de *Listeria* surgió a partir de la utilización de la citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de la actina del citoesqueleto celular, que bloqueó la entrada de *L. monocytogenes* al interior de células Caco-2 (Gaillard *et al.*, 1987). Desde entonces se está intentando desentramar cómo *Listeria* modula desde el espacio extracelular la dinámica del citoesqueleto de la célula eucariota. Uno de los mediadores de este proceso parece ser la internalina B

(InIB), que ha mostrado estar directamente implicada en la activación de cascadas de señalización mediadas por la inositol fosfato 3-kinasa (IP3 kinasa) (Ireton *et al.*, 1996; 1999). Este enzima regula distintas funciones celulares, entre las que se encuentra la del citoesqueleto de actina cortical implicado en la fagocitosis. Su activación es necesaria para la invasión de *Listeria*, ya que su inhibición específica impide la entrada de bolitas de látex tapizadas con InIB o la entrada InIB-dependiente. Sin embargo, el primer receptor identificado de InIB es gC1qR, una proteína de superficie que no presenta ninguna característica de anclaje glicosil inositol fosfato o dominios transmembrana, lo que sugiere que InIB activa la IP3 kinasa por medio de algún receptor (Braun *et al.*, 1998; 1999; 2000). Éste ha sido recientemente identificado por el grupo de Ireton (Shen *et al.*, 2001). Se trata de Met, el receptor del HGF-SF (factor de crecimiento de hepatocitos y factor de dispersión, hepatocyte growth factor and scatter factor) que sí posee un dominio transmembrana con actividad tirosin-kinasa, y que ha estado clásicamente implicado en la cascada de fosforilación de la IP3 kinasa.

Por otra parte se ha mostrado que en la señalización de la IP3 kinasa durante la invasión interviene la fosfolipasa PLC- γ 1 (Bierne *et al.*, 2000), subrayando la importancia de los fosfolípidos como mensajeros secundarios en la patogénesis de la infección por *Listeria*.

1.2.3.2. Vías de señalización celular relacionadas con el compartimento fagosomal

En su ciclo intracelular, *L. monocytogenes* debe escapar del compartimento vacuolar para proseguir su ciclo infeccioso. Estudios realizados con mutantes *hly*, incapaces de escapar del fagosoma, y bacterias muertas por calor, han mostrado que los fagosomas que contienen éstas últimas acumulan marcadores endosomales tardíos y contenido lisosomal, mientras que los fagosomas que contienen el mutante *hly* no maduran y acumulan la GTPasa *rab5* (Álvarez-Domínguez *et al.*, 1997). Se ha especulado con que la prevención de la maduración permitiría a la bacteria prolongar su viabilidad intravacuolar y facilitaría sus posibilidades de escapar al citoplasma celular.

Cómo *L. monocytogenes* modula estas funciones celulares es aún una incógnita, aunque no depende, evidentemente, de Hly. Se ha sugerido la acción de otras proteínas implicadas en la interacción con la membrana vacuolar, como PlcA y PlcB aunque actualmente no existe ninguna evidencia experimental que apoye esta hipótesis.

1.2.3.3. Interferencia con vías de señalización desde el citoplasma celular

L. monocytogenes es, junto a *Shigella flexneri* y *Rickettsia* spp., uno de los pocos patógenos intracelulares que escapa del compartimento vacuolar para proseguir su ciclo a partir del citoplasma de la célula infectada. La primera evidencia de que *Listeria* secreta proteínas activas en el citoplasma celular se debe al trabajo de Smith *et al.* (1995), en el que se mostraba que los posibles productos de la actividad de las fosfolipasas PlcA y PlcB, ceramida (CER) y diacilglicerol (DAG), experimentaban una elevación en macrófagos J774 tras la infección con *L. monocytogenes*. Este hecho también se puso de manifiesto en la infección de células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) (Sibelius *et al.*, 1996). El DAG es un potente mensajero secundario multifuncional, que puede activar la protein kinasa C (PKC) y, por tanto, la vía Raf-MEK-MAP, que regula una gran variedad de funciones celulares (Weiglein *et al.*, 1997, Tang *et al.*, 1998). CER es el producto de la acción de una SMasa sobre la esfingomielina (SM), y su papel como mensajero secundario se ha asentado en estos últimos años (Okazaki *et al.*, 1989; Hannun, 1996; Levade *et al.*, 1999). Está presente en todas las células eucariotas, y el aumento de sus niveles se ha relacionado con procesos tan diversos como la muerte celular, apoptosis o diferenciación celular. El aumento de los niveles de CER mediados por PlcA y PlcB durante la infección intracelular de *L. monocytogenes* se puede explicar de dos formas no mutuamente excluyentes: a.) de forma indirecta por la activación de una SMasa eucariota o b.) de forma directa por poseer capacidad para desdoblar SM, como se ha demostrado para PlcB, que tiene una actividad SMasa residual (Geoffroy *et al.*, 1991). En cualquiera de los casos, *Listeria* puede potencialmente interferir por medio de sus fosfolipasas con las vías de señalización lipídicas, aunque hoy por hoy no se conocen las

consecuencias directas que estos incrementos en DAG o CER tiene para el desarrollo de la infección por *Listeria*, ni el mecanismo por el que se producen.

Paralelamente, otros autores han mostrado que PlcA y PlcB median, tras el escape de *L. monocytogenes* al citoplasma de macrófagos P388D1, una activación persistente de NF- κ B a través de la degradación de la proteína inhibidora I κ B β (Hauf *et al.*, 1997; 1999). Asimismo, las fosfolipasas de *Listeria* dan lugar a un incremento en los niveles celulares de las moléculas de adhesión E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (Schwarzer *et al.*, 1998; Drevets, 1997; 1998), así como de la expresión de IL-6 e IL-8 durante la infección intracelular de células HUVEC (Greiffenberg *et al.*, 1997). Estos datos muestran que las fosfolipasas de *Listeria* son factores de virulencia importantes en la patogénesis intracelular, y que su papel no sólo se restringe a ser adyuvantes de Hly en el escape del fagosoma, sino que juegan un papel más sutil en la interferencia con las vías de señalización celulares que regulan la respuesta inmune, expresión génica y la muerte celular.

Como hemos mencionado anteriormente, ActA media el movimiento intracelular de *Listeria*. Las cascadas de señalización implicadas en este control de la dinámica del citoesqueleto de actina de la célula hospedadora han sido detalladamente estudiadas en estos últimos años (Cossart, 2000; Pantaloni *et al.*, 2001). Las aproximaciones reduccionistas de este proceso han llevado a desentramar los componentes protéicos del citoplasma de la célula eucariota necesarios para reproducir *ex vivo* el movimiento de *L. monocytogenes* y han permitido el movimiento de bolitas de poliestireno asimétricamente tapizadas con ActA en extractos celulares (Loisel *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 1999). ActA realiza una función homóloga a la de la proteína eucariota WASP, que está regulada por Cdc42 y Scar1. De esta forma, ActA recluta y activa directamente al complejo Arp2/3, el efector final de la polimerización de actina. ActA mimetiza así la función de WASP en un precioso ejemplo de subversión de la maquinaria celular por parte de un parásito intracelular.

1.2.3.4. Apoptosis

L. monocytogenes induce apoptosis en hepatocitos, células epiteliales y células dendríticas mediada por Hly (Rogers *et al.*, 1996; Guzmán *et al.*, 1996; Valenti *et al.*, 1999). Hepatocitos infectados con *L. monocytogenes* mueren por apoptosis *in vitro* e *in vivo* en el modelo murino, estando ligada esta respuesta celular al reclutamiento de neutrófilos al foco de infección hepático (Miura *et al.*, 2000). Por tanto, la apoptosis impediría el paso de *Listeria* a células vecinas pero, simultáneamente, permitiría su acceso a células fagocíticas, a partir de las que podría dispersarse a otros órganos siguiendo la estrategia del “Caballo de Troya”. *Listeria* no induce la muerte por apoptosis en macrófagos que, infectados *in vitro* e inoculados en ratones, han mostrado permitir el paso de *Listeria* a través de la barrera hematoencefálica y el establecimiento de una infección en el SNC (Barsig *et al.*, 1997; Drevets, 1999; 2001). *Listeria*, por tanto, induce la muerte por apoptosis sólo en ciertos tipos celulares. Queda por desvelar si esto es un mecanismo específicamente inducido por la bacteria para establecerse en el hospedador, o si representa un mecanismo del huésped enfocado a limitar la infección por *Listeria*.

1.3. Las fosfolipasas bacterianas y su papel en la virulencia

Las fosfolipasas son un grupo heterogéneo de proteínas producidas por multitud de bacterias y células eucariotas. Su papel en eucariotas ha sido tradicionalmente el control de los niveles de fosfolípidos de las membranas, regulando la estructura de las barreras con el medio extracelular y entre los compartimentos intracelulares. Recientemente, se ha visto que las fosfolipasas juegan además un importante papel en las vías de transducción de señales relacionadas con el metabolismo, diferenciación y muerte celular a través de la liberación de segundos mensajeros lipídicos, productos de su acción degradativa sobre los fosfolípidos de membrana (Pelech y Vance, 1990; Exton, 1990). En procariontes la función de las fosfolipasas como reguladores en la estructura de membranas no ha sido aún determinada, aunque su papel como

factores de virulencia en especies patógenas ha sido ampliamente estudiado a partir del descubrimiento de la α -toxina (fosfolipasa C) de *Clostridium perfringens* por MacFarlane y Knight en 1941, que resultó ser la primera toxina bacteriana con actividad enzimática (McFarlane y Knight, 1941). Desde entonces se han realizado un gran número de experimentos con fosfolipasas purificadas a partir de patógenos humanos y animales. Los resultados obtenidos deben ser interpretados con cautela debido, principalmente, a dos motivos: i) no se puede descartar la presencia de posibles contaminantes activos en los purificados que puedan haber interferido en los experimentos y ii) la adición exógena de fosfolipasas no reproduce ni en cantidad ni en lugar de acción lo que podría hacer una fosfolipasa bacteriana durante la infección. No ha sido hasta el desarrollo de técnicas de ingeniería genética que se han podido construir mutantes nulos en los genes codificantes de las fosfolipasas bacterianas, y así poder asignarles una función específica en la patogénesis de la infección tanto *in vitro* como durante la infección del huésped *in vivo*. Las evidencias experimentales que se están obteniendo muestran que las fosfolipasas bacterianas, además de una función mecánica en la desorganización de la arquitectura de las membranas eucariotas, parecen jugar un papel fundamental en la interferencia de las vías de transducción de señales de las células del hospedador, subvirtiendo la maquinaria celular para favorecer el establecimiento de la infección bacteriana (Schmiel y Miller 1999; Songer, 1997; Titball, 1993).

1.3.1. Clasificación de las fosfolipasas bacterianas

La estructura general de los fosfolípidos consta de un grupo polar unido a una cadena hidrocarbonada apolar por medio de un grupo fosfato y un esqueleto de glicerol. La naturaleza del grupo polar se utiliza para clasificar a los distintos fosfolípidos. De esta forma, la serina está presente en la fosfatidilserina, la colina en la fosfatidilcolina y en la SM, o el inositol en el fosfatidilinositol. La cola hidrocarbonada presenta en los fosfolípidos generalmente 16-18 átomos de carbono y puede estar insaturada. La SM es el único fosfolípido cuyo esqueleto no es el glicerol, sino la esfingosina y su grupo amino está ligado por

un enlace amida a un ácido graso saturado de cadena larga o a un monoinsaturado de 18 a 26 átomos de carbono. La cola apolar de la SM está constituida por CER. Las fosfolipasas hidrolizan los fosfolípidos, y el lugar donde actúan se utiliza para clasificar las fosfolipasas en A1, A2, C o D (Fig. 1.4.). Además, las fosfolipasas se pueden agrupar en función del

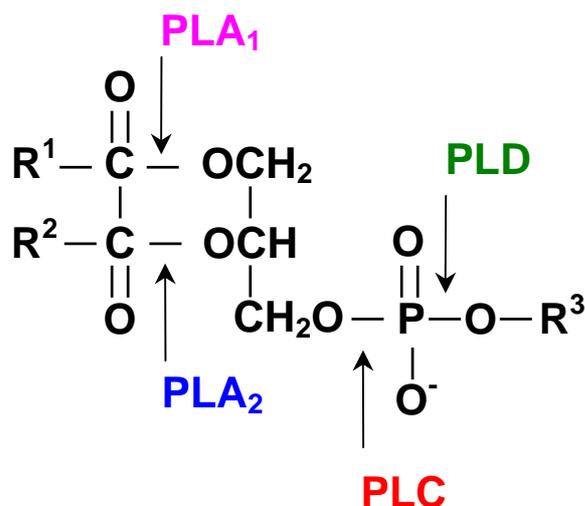


Fig. 1.4. Centros de actuación de las fosfolipasas A1 (PLA1), A2 (PLA2), C (PLC) y D (PLD).

sustrato por el que tienen preferencia, lo cual ha servido para determinar grupos que tienen una afinidad de sustrato muy específica, como pueden ser las fosfatidilinositol fosfolipasas o las esfingomielinasas. Sin embargo, la mayoría de las fosfolipasas bacterianas no tienen afinidad por un solo sustrato, sino que han evolucionado para hidrolizar en mayor o menor medida distintos fosfolípidos en función, probablemente, de las particularidades biológicas del microorganismo que las sintetiza. Por tanto, la clasificación de las fosfolipasas en virtud de sus propiedades exclusivamente enzimáticas ha resultado ser extraordinariamente compleja e ineficaz, por lo que en estos últimos años se está tendiendo a agruparlas en función de sus homologías estructurales (Titball, 1999). La estrecha correlación que existe, en la mayoría de los casos, entre la estructura protéica primaria y la función de las fosfolipasas bacterianas, ha permitido objetivizar y simplificar su clasificación, como mostramos en la tabla 1.3.1., en la que hemos incluido todas las fosfolipasas bacterianas identificadas genéticamente hasta el momento.

1.3.2. Papel en la virulencia de las fosfolipasas bacterianas

Debido al importante papel que se le está asignando a las fosfolipasas procariotas en la patogenia de las infecciones bacterianas, en estos últimos años se están clonando y secuenciando multitud de genes de fosfolipasas de bacterias patógenas. A algunas de ellas, y mediante una aproximación genética, se les ha podido asignar una función clara en la patogénesis de los respectivos procesos infecciosos, y son aquellas en las que vamos a profundizar a continuación.

1.3.2.1. PLD de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis, el agente causal de la linfadenitis caseosa en ovino y caprino, secreta una fosfolipasa D (PLD) que actúa sobre la SM y lisofosfatidilcolina. Inoculaciones experimentales realizadas en el hospedador natural, la oveja, con un mutante nulo en PLD han mostrado la ausencia de lesiones macroscópicas en los animales, aún cuando fueron inoculados con una dosis 100 veces mayor que aquellos que fueron ensayados con la cepa silvestre y presentaron los clásicos abscesos pseudotuberculosos (Hodgson *et al.*, 1992). Por tanto, PLD parece ser un factor de virulencia esencial en la patogénesis de *C. pseudotuberculosis*. Su mecanismo de acción podría estar relacionado con el hecho de que PLD afecta a la permeabilidad vascular, lo que facilitaría la diseminación de la bacteria de los vasos sanguíneos a la vía linfática (Yozwiak *et al.*, 1993; Muckle *et al.*, 1983). Además se ha mostrado que una cepa detoxificada PLD⁻ es efectiva como agente vacunal frente a la infección experimental con *C. pseudotuberculosis* en ganado ovino (Burrell, 1983).

1.3.2.2. PLC de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de humanos y animales. Puede producir infecciones letales cuando infecta heridas o quemaduras, cuando prolifera en individuos inmunocomprometidos o cuando se establece en

el sistema pulmonar de pacientes con fibrosis quística. Posee dos genes que codifican fosfolipasas C: *plcS* codifica PlcH, una fosfolipasa hemolítica sobre eritrocitos humanos y ovinos con actividad sobre la fosfatidilcolina y SM, y *plcN*, cuyo producto, PlcN, es activo sobre la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina y no presenta actividad hemolítica. Hasta el momento sólo se ha implicado a PlcH en virulencia, ya que en experimentos realizados en el modelo murino, la DL₅₀ del mutante $\Delta plcS$ fue 2.4 veces mayor que la de la cepa silvestre correspondiente, lo que hace pensar que podría jugar un importante papel en la colonización tisular durante la infección (Saiman *et al.*, 1992; Ostroff *et al.*, 1989; 1996).

1.3.2.3. α -toxina de *Clostridium perfringens*

La α -toxina de *Clostridium perfringens* es la fosfolipasa más letal caracterizada hasta el momento. Es una PLC activa sobre fosfatidilcolina y SM. En un modelo murino de gangrena caseosa, enfermedad que produce la bacteria en una gran variedad de mamíferos incluido el hombre, la α -toxina es esencial para el establecimiento de la infección (Awad *et al.*, 1995, Stevens y Bryant, 1997). Aunque aún se desconoce su implicación exacta en la patogénesis de *C. perfringens*, las lesiones producidas por un mutante nulo en la α -toxina presentan infiltración leucocitaria, cosa que no ocurre en los focos mionecróticos causados por la cepa parental productora de α -toxina. Estos experimentos sugieren que la α -toxina no sería sólo un factor citotóxico sino que podría modular la respuesta inmunitaria local y la liberación de linfoquinas (Stevens *et al.*, 1997).

En su primeros 250 aa, la α -toxina presenta un elevado (30-60%) porcentaje de similitud con las fosfolipasas PlcB de *Listeria* o CerA de *B. cereus*. Sin embargo, su extensión C-terminal de 120 aa es única entre las fosfolipasas bacterianas. Presenta un 30% de identidad con el extremo N-terminal de HA51, la lipooxigenasa 5 del ácido araquidónico humana, que reconoce su sustrato gracias a este dominio. La sustitución de la extensión de la α -toxina de *C. perfringens* por la de la α -toxina de *C. bifermentans*, que no

presenta similitud con HA51, aumenta su ratio actividad hemolítica vs. actividad fosfolipasa C. Esto sugiere que la extensión C-terminal de la α -toxina de *C. perfringens* está implicada en el reconocimiento del ácido araquidónico, componente clave en la reacción inflamatoria como mediador de la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas.

Los estudios realizados en relación a la estructura-función de la α -toxina han permitido el desarrollo de vacunas recombinantes efectivas en el modelo murino, basadas una molécula de α -toxina con sustituciones en aminoácidos críticos para su actividad tóxica (Guillouard *et al.*, 1996). Recientemente se ha cristalizado la α -toxina, que ha resultado tener dos dominios catalíticos, uno de los cuales presenta una topología similar a la de la lipasa pancreática y las lipooxigenasas eucariotas (Derewenda y Martin, 1998).

1.3.2.4. β -toxina de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es el agente causal de multitud de infecciones nosocomiales en humanos, y de mastitis en rumiantes. Produce una potente SMasa o β -toxina, que está implicada en las propiedades hemolíticas de la bacteria en agar sangre. Hay una ingente cantidad de información disponible acerca de los efectos de la β -toxina purificada *in vitro* e *in vivo*, que le confieren propiedades citotóxicas frente a monocitos y células epiteliales humanas así como capacidad inflamatoria en el modelo de queratitis cunícola (O'Callaghan *et al.*, 1997; Walev *et al.*, 1996). Estos resultados son, como hemos señalado anteriormente, difícilmente interpretables, debido a que la utilización de proteínas purificadas no reproduce el modo natural de la exposición a la toxina ni permite descartar la presencia de contaminantes en el purificado. Por tanto, en la actualidad no existen pruebas concluyentes acerca de si la β -toxina está o no implicada en la patogénesis de la infección por *S. aureus*.

Sin embargo, la evidencia de que la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes son β -toxina positivos, hace pensar que realmente esta toxina juega algún papel en la virulencia (Hummel *et al.*, 1976). Las únicas

aproximaciones genéticas que se han realizado para determinar su papel *in vivo* se han basado en la utilización de cepas β -toxina negativas, como resultado de la inserción del fago $\phi 13$ en su gen codificante, *h1b*. Esta cepa es menos virulenta en el modelo de glándula mamaria murina, aunque, sorprendentemente, parece estimular el flujo de neutrófilos al lugar de infección en mayor medida que la cepa β -toxina positiva (Bramley *et al.*, 1989). Sin embargo, no se puede descartar en estos experimentos que exista un efecto pleiotrópico del fago $\phi 13$ sobre la expresión de otros factores de *S. aureus*, con lo que habrá que esperar a la realización de ensayos de virulencia con mutantes *h1b*⁻ genéticamente definidos para establecer si la β -toxina está implicada en la virulencia de *S. aureus*.

1.3.2.5. PlcA y PlcB de *Listeria*

Como hemos comentado en la sección 1.2.1. *Listeria* posee dos fosfolipasas C cuyos genes, *plcA* y *plcB*, están ubicados en el cluster *hly* de virulencia, *plcA* y *plcB*. Mutantes por transposición en *plcA* dieron lugar a un incremento en la DL₅₀ respecto a la cepa parental de *L. monocytogenes* de 3 logaritmos (Camilli *et al.*, 1991). Sin embargo, posteriormente se observó que ese incremento se debía principalmente al efecto polar que el transposón ejercía sobre la transcripción de *prfA*, que se encuentra corriente abajo de *plcA* y con el que se cotranscribe mayoritariamente en forma de bicistrón (Fig. 1.2.). Mutantes de delección en *plcA* mostraron un aumento en la DL₅₀ de sólo 2 veces, minimizando la función de PlcA en la virulencia de *Listeria* respecto a lo que se había vaticinado inicialmente.

La actividad de PlcB es importante para la virulencia de *Listeria in vivo*, ya que mutantes $\Delta plcB$ poseen una DL₅₀ 20 veces mayor que *L. monocytogenes* silvestre. Mutantes dobles $\Delta plcAB$ presentan una pérdida de virulencia de 500 veces, lo que indica que ambas fosfolipasas actúan de forma sinérgica en la patogénesis de *Listeria* (Marquis *et al.*, 1995). Además del papel mecánico de PlcA y PlcB como factores membranoactivos en el escape de la bacteria al citoplasma de la célula infectada, en el que actúan como adyuvantes

de Hly (ver secciones 1.2.1.2. y 1.2.1.5.), estas fosfolipasas constituyen el modelo actual más extendido para el estudio de la interferencia bacteriana en las vías de transducción de señales de las células eucariotas (ver sección 1.2.3.).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La identificación de los agentes causales de la mayoría de las enfermedades transmisibles desde finales del siglo XIX a principios del siglo XX, permitió un rápido desarrollo de antibióticos y vacunas hasta tal punto efectivos contra los agentes microbianos, que en los años 50 y 60 se vaticinaba el fin de las enfermedades transmisibles.

Nada más lejos de la realidad. Hoy, a principios del siglo XXI, vemos cómo la aparición de enfermedades emergentes como la pandemia del VIH o la EEB-Enfermedad de Creutzfeld-Jakob, la reemergencia de agentes como *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus*, *Neisseria meningitidis*, así como el desarrollo de resistencias y multiresistencias a los antibióticos como consecuencia de su abuso, ha puesto en evidencia que las enfermedades transmisibles están muy lejos de estar controladas.

El reconocimiento de esta situación ha puesto en estado de alerta a la Sociedad y a las Autoridades Sanitarias, que han solicitado de la comunidad científica una reorientación hacia la resolución de este nuevo reto. El abordaje que se ha planteado ha sido multifocal. Por un lado, la industria farmacéutica, consciente del potencial económico que supondría encontrar un nuevo agente antimicrobiano, está buscando sistemáticamente nuevas moléculas con actividad contra virus, parásitos, bacterias y hongos. Por otra parte y a partir de los estamentos fundamentalmente públicos, se ha llegado a la conclusión de que el estudio detallado de la fisiología y los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos a través de la investigación básica, nos permitirá conocer las estrategias que han desarrollado estos agentes para eludir el sistema inmune y establecerse en el hospedador. De esta forma se podrán diseñar nuevos fármacos y vacunas de forma racional, que actúen donde se pueda bloquear el desarrollo de las infecciones microbianas.

Desde esta perspectiva nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos de patogenicidad de un género bacteriano, el género *Listeria*, en el que se encuentra el agente causal de la listeriosis, hoy por hoy la enfermedad de transmisión alimentaria con mayor índice de mortalidad. Los trabajos realizados hasta el momento en *Listeria* han propiciado un enorme

avance del conocimiento en el campo de la Patogénesis Microbiana y la Microbiología Molecular, al conseguir, por primera vez, identificar y caracterizar toda una serie de factores de virulencia que capacitan a un microorganismo patógenos para llevar a cabo su ciclo infectivo en el interior de las células del hospedador. La aparición de la Microbiología Celular, como nueva disciplina en la interfase de la Microbiología y la Biología Celular, ha consolidado a *Listeria* como modelo del estudio de la interacción parásito-hospedador, que está permitiendo desentramar las complejas redes de intercomunicación que han desarrollado las bacterias y las células del hospedador a lo largo de la evolución.

El género *Listeria* engloba seis especies, de las cuales dos son patógenas: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Ambas desarrollan un idéntico ciclo intracelular, para cuya realización poseen determinantes genéticos comunes ubicados en el mismo orden y en la misma localización cromosómica en sus respectivos genomas. Sin embargo, a pesar de sus similitudes, el comportamiento de estas dos especies es, respecto a su patogenicidad natural y rango de hospedadores susceptibles, completamente distinto. Mientras que *L. monocytogenes* infecta a multitud de especies animales incluídas las aves y al hombre, *L. ivanovii* afecta principalmente a rumiantes y no es capaz de producir meningoencefalitis, la manifestación más común de la listeriosis producida por *L. monocytogenes*.

En el laboratorio, *L. ivanovii* produce una intensa β -hemólisis bizonal en agar sangre de oveja y una reacción de hemólisis sinérgica (tipo CAMP) con *Rhodococcus equi* en forma de pala. Por el contrario, *L. monocytogenes* es débilmente hemolítica y no produce una reacción tipo CAMP en forma de pala con *R. equi*. Estas propiedades hemolíticas diferenciales se deben, presumiblemente, a la producción de una esfingomielinasa C exclusivamente por parte de *L. ivanovii*. Esta proteína ya ha sido parcialmente purificada a partir del sobrenadante de cultivo de *L. ivanovii*, y ha mostrado poseer propiedades membractivas. La capacidad de secretar moléculas activas contra las membranas biológicas es clave para la virulencia de *Listeria*, que durante su ciclo intracelular está obligada a lisar la membrana del fagosoma para

multiplicarse en el citoplasma celular y proseguir su ciclo infeccioso en el hospedador. Ya en 1989 se describió que *L. ivanovii*, pero no *L. monocytogenes*, secretaba una proteína de peso molecular aproximado de 27 kDa con actividad enzimática sobre la SM, fosfolípido presente en la bicapa lipídica de las membranas biológicas.

En este estudio nos propusimos abordar desde un punto de vista genético la implicación de esta SMasa en las particulares características hemolíticas y patogénicas de *L. ivanovii*. Así, hemos identificado, clonado y secuenciado el gen codificante de la SMasa C de *L. ivanovii*, al que hemos denominado *smcL* (por SMasa C de *Listeria*). La construcción de un mutante de *L. ivanovii* nulo en *smcL*, así como la complementación de una batería de mutantes de *L. monocytogenes* con *smcL*, nos ha permitido asignarle múltiples funciones en la patogénesis de la infección. Mostramos que SmcL es el factor membranolítico responsable de las propiedades hemolíticas que permiten diferenciar a *L. ivanovii* de *L. monocytogenes*. Asimismo, SmcL está implicada en el escape de *L. ivanovii* al citoplasma de la célula infectada. Cuando *Listeria* se encuentra en el citoplasma, SmcL media un incremento en los niveles del mensajero secundario CER de la célula hospedadora y la muerte de ésta por muerte celular programada o apoptosis. Esta es la primera vez que se demuestra la implicación de una SMasa bacteriana en la patogénesis de un microorganismo.

3. RESULTADOS

3.1. Identificación y caracterización de *smcL*, el gen de la SMasa C de *L. ivanovii*

Como hemos señalado anteriormente, *L. ivanovii* produce un halo de doble hemólisis en placas de agar sangre de cordero. Cuando crece en proximidad de *R. equi*, *L. ivanovii* da lugar a una reacción de hemólisis sinérgica en forma de pala o reacción de CAMP (Seeliger y Jones, 1986; Vázquez-Boland *et al.*, 1992b). Esta característica es utilizada por los microbiólogos clínicos para diferenciar a *L. ivanovii* de *L. monocytogenes*, que no da lugar a una reacción de CAMP en forma de pala. Las peculiares características hemolíticas de *L. ivanovii* se deben, presumiblemente, a que produce una potente SMasa C, que solamente es producida por esta especie dentro del género *Listeria* (Mencikova, 1989; Vázquez-Boland *et al.*, 1989; Ripio *et al.*, 1995). En este capítulo describimos el abordaje genético que hemos seguido para identificar el determinante genético de esta SMasa responsable de las características hemolíticas diferenciales de *L. ivanovii*.

3.1.1. Identificación, caracterización genética y análisis de secuencia de *smcL*

Cuando comenzamos este trabajo, habíamos observado que la reacción de CAMP de *L. ivanovii* con *R. equi* presentaba una apariencia en forma de pala muy similar a la inducida por cepas de *S. aureus* β -toxina positivas con *R. equi* (Fig. 3.1.6). Partimos de la base de que la homología funcional de la SMasa de *L. ivanovii* y la β -toxina en la reacción de CAMP bien podría reflejar una homología estructural de los determinantes implicados en ella. En aquellos momentos estaba disponible en las bases de datos la secuencia nucleotídica de *hly*, el gen de la β -toxina de *S. aureus* (Projan *et al.*, 1989), así como el de las esfingomielinasas de *Leptospira interrogans* (Segers *et al.*, 1990) y *Bacillus cereus* (Johansen *et al.*, 1988). Basándonos en la predicción de su secuencia aminoacídica, realizamos una serie de alineamientos con la ayuda del paquete informático GCG (Fig. 3.1.1.A) (ver Materiales y Métodos). Esto nos permitió desvelar la existencia de unos dominios estructurales altamente conservados entre las tres esfingomielinasas bacterianas. A partir de estos dominios

diseñamos unos oligonucleótidos degenerados, SMC-1 y SMC-2, que se utilizaron en reacciones de PCR con DNA cromosómico de *L. ivanovii* ATCC 19119 (Fig. 3.1.1.A). Realizando diversas modificaciones en las condiciones de PCR, afectando a la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos, amplificamos una banda de 340pb, que fue insertada en el vector T pMOSBlue y secuenciada. El fragmento formaba parte de un ORF que codificaba una proteína cuya secuencia aminoacídica deducida era muy similar a la de las otras SMasas conocidas. Clonamos por PCR inversa el gen completo de la SMasa de *L. ivanovii*, y lo denominamos *smcL*, por SMasa C de *Listeria*. Posee 1008 pb y su codón ATG está precedido a una distancia apropiada por la secuencia consenso de unión al ribosoma, GGAGG. Su codón stop precede a una secuencia palindrómica con un tronco de 18 pb y una ΔG (25°) de 27,8 kcal, que podría funcionar como una señal de terminación de la transcripción y que esta localizada a 62 pb corriente abajo de su codón de terminación TAA. *smcL* confirió actividad SMasa y una débil hemólisis sinérgica con *R. equi* al vector de clonaje *Escherichia coli* DH5 α (Tabla 3.1.1.).

Tabla 3.1.1. Actividad SMasa y reacción de CAMP con *R. equi*

cepa	actividad SMasa	reacción de CAMP (pa la)
ATCC19119	33.0	++++
<i>smcL</i> :: Ω Km	3.9 ^a	-
<i>smcL</i> :: Ω Km(pH <i>smcL</i>)	13.0	++
DH5 α	0.0	-
DH5 α (pH <i>smcL</i>)	6.1	±
Δ i-prfA	27.0	+++
PKP1	0.3	-
PKP1 (pH <i>smcL</i>)	10.0	++
P14	0.2	-

Las regiones de DNA adyacentes a *smcL* fueron amplificadas por PCR inversa, clonadas y secuenciadas. Encontramos que 383 pb corriente arriba de *smcL*, y transcrita en sentido opuesto a ésta, se encontraba una ORF de 945 pb, que codificaba un miembro de la familia de las internalinas, *i-inIF*. Este gen estaba seguido, en la misma orientación, por el gen de otra internalina, *i-inIE*,

que había sido clonado independientemente mediante oligonucleótidos degenerados basados en péptidos secuenciados de una proteína de 27 kDa secretada mayoritariamente por *L. ivanovii* (Engelbrecht *et al.*, 1998a). Los productos de *i-inIE* e *i-inIF* pertenecen a un grupo de internalinas pequeñas secretadas, que incluye a InIC (IrpA) de *L. monocytogenes* (Engelbrecht *et al.*, 1996; Domann *et al.*, 1997). La secuenciación parcial de la región corriente abajo de *smcL* nos permitió detectar otra ORF transcrita en el sentido opuesto, *i-inIG*, que codificaba también un homólogo a las internalinas, indicando que *smcL* se encuentra insertado en un locus de internalinas. Flanqueando a *smcL* se encontró una repetición invertida (IR) de 14 pb sin desapareamiento de secuencia 5'-GAATAATAAATGAC-3'. Por tanto, *smcL* está integrada en un cluster de genes de internalinas (Fig. 3.1.2.), el cual ha sido caracterizado en el trabajo de Tesis Doctoral de G. Domínguez-Bernal.

La proteína deducida de la secuencia de *smcL*, SmcL, posee 335 aminoácidos, incluyendo una posible secuencia señal de 37 residuos. La masa molecular de las correspondientes proteínas nativa y madura es de 38,4 kDa y 34,1 kDa respectivamente. SmcL es muy similar a las SMasas de *S. aureus* (β -toxina) (55,9% identidad, 63,2% similitud), *B. cereus* (55,9% identidad, 63,2% similitud) y, en menor grado, a la de *L. interrogans* (50,3% identidad, 5,8% similitud). El enzima de *L. interrogans* posee una extensión en su extremo C-terminal de 180 aminoácidos siendo el miembro filogenéticamente más divergente de las ahora cuatro SMasas bacterianas conocidas. SmcL y las proteínas de las otras dos bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C están localizadas en la misma rama del árbol filogenético. Sin embargo, el dendrograma sugiere que, dentro de este grupo, la SMasa de *L. ivanovii* ha seguido un patrón evolutivo diferente. Curiosamente, en comparaciones cruzadas utilizando BESTFIT, la SMasa de *L. ivanovii* presentó, de entre los enzimas de las bacterias Gram-positivas, el mayor índice de similitud con la de *L. interrogans* (Fig. 3.1.1.B).

3.1.2. *smcL* es un gen específico de *L. ivanovii*

Proseguimos nuestro estudio analizando la posible presencia y distribución de secuencias homólogas a *smcL* en las 6 especies que forman el género *Listeria*. Para ello realizamos Southern blots de DNA cromosómico de distintas especies del género digeridas con el enzima de restricción *HindIII* e hibridado en condiciones de alta y baja especificidad (Fig. 3.1.3.). Las tres cepas de *L. ivanovii* utilizadas, incluyendo la de la subespecie *londoniensis*, contenían el gen, mientras que no se observó ninguna señal en las otras especies del género. Además, análisis por PCR nos han confirmado la presencia de *smcL* en todas las cepas de *L. ivanovii* disponibles en nuestra colección PAM. La detección de una sola banda de hibridación en los análisis por Southern blot indican que *L. ivanovii* presenta una sola copia de *smcL* en su genoma.

3.1.3. *smcL* es una unidad monocistrónica independiente de PrfA

Se extrajo RNA total de *L. ivanovii* ATCC 19119 cultivada en BHI (extracto corazón-cerebro) a 37°C y en fase de crecimiento exponencial tardía. Se realizó un análisis por Northern blot utilizando *smcL* como sonda, detectándose una sola banda de RNA mensajero de un tamaño aproximado de 1 kb, que corresponde al tamaño de *smcL*. Estos resultados indican que, como sugiere su estructura genética, *smcL* se transcribe de forma monocistrónica (Fig. 3.1.4.). Bajo estas condiciones de cultivo, la transcripción de *smcL* parece ser elevada, tal y como se deduce de la fuerte señal que aparece en la autoradiografía y el corto tiempo de exposición requerido para su detección.

Como ya hemos señalado anteriormente, la mayoría de los factores de virulencia identificados hasta ahora en *Listeria* están positivamente regulados por el factor de transcripción PrfA, y esta proteína se une específicamente a secuencias de 14 pb centradas 41,5 pb corriente arriba del inicio de transcripción de los promotores PrfA dependientes (Kreft *et al.*, 1995; Ripio *et al.*, 1997a; Vega *et al.*, 1998). Los genes *i-inIE* e *i-inIF* ubicados corriente arriba

de *smcL* están controlados por PrfA, y cada uno de ellos está precedido por una caja PrfA (Engelbrecht *et al.*, 1998). No se encontró ninguna de estas estructuras en la región promotora de *smcL*, lo que sugiere que este gen no está regulado por PrfA. Confirmamos esto utilizando el mutante de $\Delta i\text{-}prfA$ de *L. ivanovii* ATCC 19119. La actividad SMasa y la reacción de CAMP de este mutante resultaron ser idénticas a la de la cepa parental (Tabla 3.1.1., Fig. 3.1.5.). Por tanto y a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los genes de virulencia de *Listeria*, *smcL* se expresa de forma independiente de PrfA.

3.1.4. Construcción y caracterización de un mutante *smcL*

Construimos un mutante de *L. ivanovii* ATCC 19119 nulo en *smcL* introduciendo el interposón Ω -Km2 en *smcL* por recombinación homóloga (ver Materiales y Métodos). El elemento Ω -Km2 contiene el gen de resistencia a kanamicina *aphA-3* del Tn1545, flanqueado por secuencias de DNA que, en los tres marcos de lectura, aportan señales de terminación de la transcripción y la traducción (Pérez-Casal *et al.*, 1991). Elegimos esta estrategia por ser más simple y rápida que la que utilizamos normalmente en nuestro laboratorio para construir mutantes knock-out por generación de una deleción en fase. En este caso la deleción en fase no es necesaria porque el gen *smcL* se transcribe de forma monocistrónica y está rodeado de genes transcritos en la orientación opuesta, por lo que no se espera la generación de ningún efecto polar. Además, el cassette de resistencia antibiótica albergado en el interposón facilita la mutagénesis, ya que permite la selección positiva del evento de recombinación.

El mutante *smcL* nulo resultante, *smcL:: Ω Km*, presentaba un fenotipo compatible con la pérdida de actividad SMasa. *smcL:: Ω Km* era débilmente hemolítico en agar sangre de cordero y no producía el halo externo de hemólisis incompleta característico de los aislados de *L. ivanovii* (Fig. 3.1.5.). Además, no daba lugar a la clásica reacción tipo CAMP en forma de pala con *R. equi*, sino una reacción débil similar a la producida por *L. monocytogenes* (Ripio *et al.*, 1995, Vázquez-Boland *et al.*, 1992b). De hecho, en agar sangre, el

mutante *smcL::ΩKm* era prácticamente indistinguible de *L. monocytogenes*, lo que corroboraba observaciones previas que postulaban que la SMasa era el factor citolítico responsable de las características hemolíticas particulares de *L. ivanovii* (Vázquez-Boland *et al.*, 1989; Ripio *et al.*, 1995). Aparte de esas diferencias, el mutante *smcL::ΩKm* era fenotípicamente idéntico a la cepa silvestre, y no se detectó diferencia alguna en la producción de marcadores de expresión del regulón de virulencia (producción de Hly y PlcB y utilización de glucosa-1-fosfato), crecimiento y patrón de fermentación de azúcares.

3.1.5. SmcL es el único factor responsable de las propiedades hemolíticas específicas de *L. ivanovii* (hemólisis bizonal y reacción de CAMP)

Aunque el fenotipo del mutante *smcL::ΩKm* en agar sangre de cordero indica claramente que *smcL* es el factor responsable de la hemólisis sinérgica de *L. ivanovii* con *R. equi*, esta evidencia no es suficiente para demostrar de forma inequívoca que SmcL es el único factor implicado en la reacción tipo CAMP, ya que no descarta la posibilidad de que las fosfolipasas PlcA y PlcB producidas por *smcL::ΩKm*, o que incluso otros factores desconocidos con capacidad alterante de las membranas, estén involucrados, junto con la SMasa, en la reacción de CAMP en forma de pala. Para proporcionar una evidencia más directa de que SmcL es el único factor responsable de esta reacción, expresamos *smcL* en *L. innocua*, una cepa apatógena que carece de todos los factores de virulencia descritos hasta ahora en *Listeria* (Schwan *et al.*, 1994; Kreft *et al.*, 1999). Se transformó la cepa *L. innocua* ATCC 33090 con el plásmido pH*smcL*. La presencia del plásmido se confirmó con los oligonucleótidos SMCL-1 y SMCL-2. Se creó también una cepa control transformando únicamente con el vector pHPS9 sin inserto. La complementación con pH*smcL*, pero no con pHPS9, dio lugar a actividad SMasa en medio de cultivo, demostrando que *smcL* se expresaba correctamente en *L. innocua*. En agar sangre de cordero, *L. innocua* (pH*smcL*) aparecía rodeada por un amplio halo de hemólisis incompleta similar al de *L. ivanovii*. En la reacción tipo CAMP con *R. equi*, *L. innocua* (pH*smcL*), pero no

L. innocua (pHPS9), produjo una hemólisis sinérgica en forma de pala indistinguible de la producida por *L. ivanovii* (Fig. 3.1.6.). Este efecto no fue debido a diferencias en las curvas de crecimiento ni patrones bioquímicos entre *L. innocua* (pHPS9) y *L. innocua* (pHsmcL). Por tanto, estos resultados demuestran que la SMasa es el único factor membranolítico requerido por *L. ivanovii* para la inducción característica reacción en forma de pala tipo CAMP con *R. equi*.

3.1.6. SmcL contribuye a la virulencia de *L. ivanovii*

Se infectaron ratones por vía endovenosa con la cepa silvestre ATCC 19119 y el mutante *smcL::ΩKm* para determinar su DL₅₀ (Tabla 3.2.1.). La media de las DL₅₀ de la cepa silvestre fue equiparable a las anteriormente descritas para *L. ivanovii* (Rocourt *et al.*, 1983, Engelbrecht *et al.*, 1998a); la de *smcL::ΩKm* fue

Tabla 3.2.1. DL₅₀ en el modelo murino

Experimento	Cepa bacteriana	
	ATCC 19119	<i>smcL::ΩKm</i>
1	7.9×10 ⁶	3.4×10 ⁷
2	9.1×10 ⁶	2.1×10 ⁷
3	7.4×10 ⁶	4.4×10 ⁷
Media±DE	8.1±0.9×10 ⁶	3.3±1.1×10 ⁷ (P<0.01)

cuatro veces más elevada que la de la cepa silvestre. El mutante fue menos virulento en los tres experimentos independientes realizados, y las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas (P< 0.01).

3.2. Papel de SmcL en el escape de la vacuola fagocítica

Los tres factores de virulencia membranoactivos descritos en *Listeria*, la toxina formadora de poros, Hly, y las dos fosfolipasas C, PlcA y PlcB, comparten una función mecánica en la patogénesis: provocan la disrupción de la vacuola fagocítica, permitiendo la replicación de la bacteria en el citoplasma de la célula infectada (Marquis *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). La SM es un fosfolípido mayoritario en las membranas de las células eucariotas, y SmcL posee actividad membranolítica sobre la membrana eritrocitaria, como hemos mostrado en la sección anterior. Por tanto, nos propusimos investigar si este enzima juega un papel en la virulencia de *L. ivanovii*, y si éste es similar al que juegan Hly, PlcA y PlcB como mediadores de la proliferación intracelular en *Listeria*.

3.2.1. SmcL contribuye a la proliferación intracelular de *L. ivanovii*

En primer lugar ensayamos el mutante *smcL::ΩKm* y su cepa silvestre parental de *L. ivanovii* en la línea celular J774 de macrófagos murinos. Ambas cepas

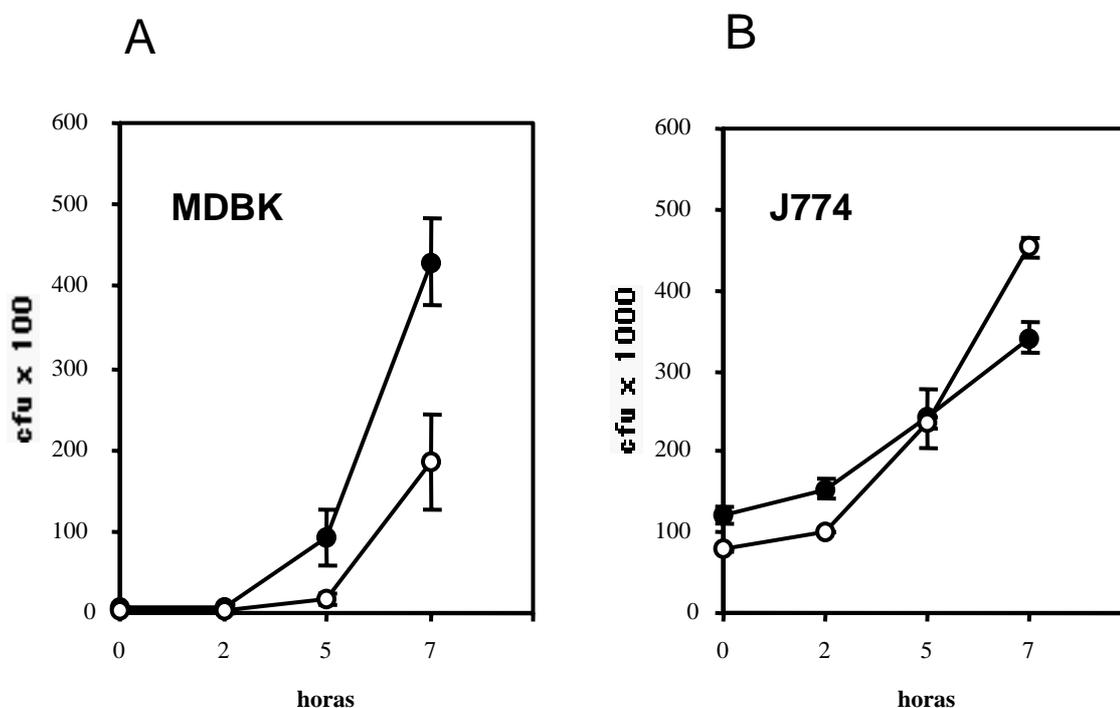


Fig. 3.2.1. Curvas de proliferación intracelular de *L. ivanovii* (ATCC 19119) (símbolos negros) y su mutante isogénico *smcL::ΩKm* (símbolos blancos) en células MDBK (A) y J774 (B). Los gráficos representan la media de tres experimentos independientes \pm DE.

proliferaron en el interior de las células con cinéticas similares, indicando que, en J774, la mutación en *smcL* aparentemente no afectaba de forma significativa a las funciones de escape del fagosoma de *L. ivanovii* (Fig. 3.2.1.B). Esta falta de efecto de la mutación era en cierto modo esperable, ya que *smcL::ΩKm* todavía produce niveles silvestres de los factores membranolíticos Hly, PlcA y PlcB.

Sin embargo, al repetir los experimentos de proliferación en la línea epitelioide de origen bovino, MDBK, sí fuimos capaces de observar un comportamiento distinto del mutante. En estas células, *smcL::ΩKm* fue también capaz de proliferar, pero con una menor eficacia que la cepa silvestre (Fig. 3.2.1.A). Estos resultados indican que, al menos en MDBK, SmcL contribuye a la proliferación intracelular de *L. ivanovii*.

3.2.2. SmcL promueve la proliferación de un mutante de *L. monocytogenes* incapaz de escapar del fagosoma

El efecto de la mutación de *smcL* podría verse enmascarado por la producción de Hly, PlcA y PlcB en el mutante *smcL::ΩKm* de *L. ivanovii*. Para aislar el papel específicamente jugado por SmcL en la proliferación intracelular, expresamos su gen codificante en un mutante de *L. monocytogenes* libre de los determinantes membranolíticos Hly, PlcA y PlcB. Para ello introdujimos el plásmido pH*smcL* por electroporación en PKP1, un mutante de *L. monocytogenes* EGD en el que la mayor parte del cluster central de virulencia, incluyendo *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB* había sido deletado y sustituido por un cassette de resistencia a kanamicina. Comprobamos que la cepa complementada, PKP1(pH*smcL*) expresaba *smcL* y presentaba una reacción tipo CAMP con *R. equi* similar a la de *L. ivanovii* (Fig. 3.1.5.). PKP1 y PKP1(pH*smcL*) fueron utilizadas en ensayos de proliferación intracelular en células MDBK, y las bacterias intracelulares viables fueron determinadas 2 h, 5 h y 7 h tras la infección.

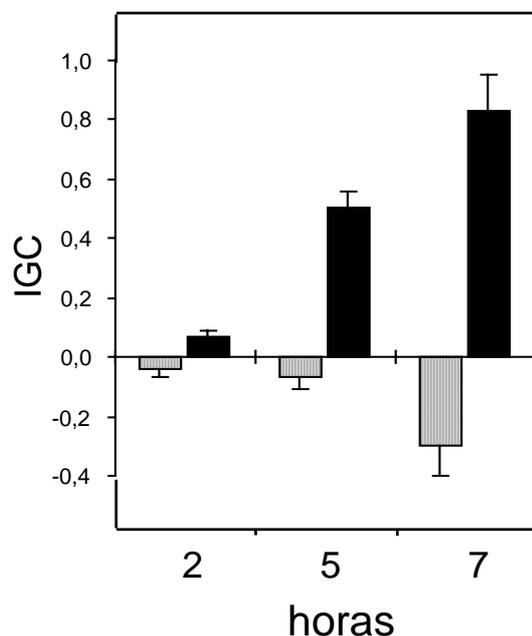


Fig. 3.2.2. Efecto de la expresión de *smcL* en la proliferación intracelular del mutante de *L. monocytogenes* PKP1 en células MDBK. Barras grises, PKP1 no complementado; barras negras, PKP1 (pH*smcL*). IGC, coeficiente de crecimiento intracelular (ver Materiales y Métodos). Media de tres experimentos \pm DE.

Como era de esperar, la población intracelular de PKP1 decreció con el paso del tiempo, reflejando la incapacidad de este mutante de proliferar en el interior de las células infectadas. En cambio, la complementación de PKP1 con pH*smcL* permitió al mutante proliferar en el interior de las células (Fig. 3.2.2.). Estos resultados demuestran que *SmcL* es suficiente para conferir por sí sola la capacidad de proliferación intracelular en un mutante de *L. monocytogenes* deficiente en las funciones de escape del fagosoma.

3.2.3. *SmcL* está implicada en la disrupción de la vacuola fagocítica

Los anteriores resultados sugieren que *SmcL* podría estar implicada en la disrupción del fagosoma. Para comprobar de forma directa esta hipótesis, examinamos mediante microscopía electrónica de transmisión la proliferación intracelular de PKP1 y PKP1(pH*smcL*) en células MDBK infectadas.

Puesto que el índice de invasión de PKP1 era muy bajo (0,004%) y la proliferación intracelular de PKP1(pHsmcL) lenta, examinamos las células tras un período de infección prolongado de 7 h. Tras este tiempo, la mayoría de las bacterias PKP1 se encontraban en el interior de vacuolas fagocíticas. Estas vacuolas eran generalmente de mayor tamaño que las observadas con PKP1(pHsmcL) y contenían una, en algún caso dos bacterias, de las cuales la mayoría estaba en proceso de degradación (Fig. 3.2.3.). Sin embargo, el 34,6% y el 57,9% de PKP1(pHsmcL) se encontraron libres en el citoplasma en los cuatro experimentos independientes realizados. Algunas de estas bacterias aparecían dividiéndose, lo que es compatible con la observada capacidad de proliferación intracelular de PKP1(pHsmcL) (Fig. 3.2.2.). Por tanto, SmcL promueve la proliferación intracelular a través de su capacidad de producir la disrupción de la vacuola fagocítica, facilitando el escape de la bacteria a su nicho citoplásmico de multiplicación.

Como se observa en la figura 3.2.3., ninguna de la bacterias presentes en el citoplasma presentaba colas de actina. Esto es debido a que el mutante PKP1 no posee el gen *actA* y es por tanto incapaz de polimerizar la actina, pasar de célula a célula y formar un fagosoma secundario de doble membrana en la célula vecina. La infección con PKP1 da pues lugar exclusivamente a fagosomas de membrana simple. En consecuencia, nuestros resultados demuestran que SmcL está implicada en la disrupción del fagosoma primario, permitiendo el escape de la bacteria al citoplasma de la célula infectada tras la invasión desde el espacio extracelular.

3.3. Papel de SmcL en la generación de ceramida y apoptosis

Durante la última década se han acumulado suficientes evidencias como para pensar que los esfingolípidos desempeñan no solamente un papel estructural en biomembranas, sino que además forman parte de las redes de transducción de señales en las células eucariotas. Aunque existe una gran controversia sobre la naturaleza y el lugar de acción de las moléculas implicadas en estas redes, la mayoría de los autores coinciden en que una SMasa (fosfodiesterasa de CER-fosforilcolina, EC 3.1.4.12) actúa sobre su sustrato SM dando lugar a fosforilcolina y al segundo mensajero CER (Okazaki *et al.*, 1989), en lo que se ha venido a llamar la vía SM-CER. La propia CER, o alguno de sus metabolitos, como la esfingosina o la esfingosina-1-fosfato (Spiegel *et al.*, 1996), parece estar implicada en procesos tales como la diferenciación y proliferación celular, la regulación del ciclo celular o la muerte por apoptosis (Hannun, 1996) (Fig. 3.3.1.). Dado que los efectos biológicos asociados a la CER son tan diversos, se considera que esta molécula está asociada a una gran variedad de cascadas de señalización, de entre las cuales las más extensamente estudiadas son las que derivan en la inducción de la apoptosis. Se ha demostrado que en diversos tipos celulares la CER es un mediador de la muerte por apoptosis activada por agentes como el TNF- α , la radiación UV, las drogas anticancerígenas, el choque térmico, la ausencia de suero o la exposición a peróxido de hidrógeno (Kolesnick y Krönke, 1998). Estos agonistas activan una SMasa endógena de la que existen principalmente dos tipos, la SMasa neutra y la SMasa ácida, que generan CER en distintos compartimentos celulares. Algunos autores sostienen que la SMasa ácida, que actúa en el compartimento lisosómico, desencadena la activación de la vía SM-CER (Kolesnick y Krönke, 1998), mientras que otros apoyan la hipótesis de que es la SMasa neutra, que actúa a nivel de la membrana citoplasmática, la que es la responsable de modular esta vía (Levade y Jaffrézou, 1999) (Fig. 3.3.1.). En cualquiera de los casos, la CER parece estar implicada en la modulación de la respuesta apoptótica mediante la activación de diversas vías de señalización relacionadas con la protein-quinasa activada por CER (CAPK), la protein-fosfatasa activada por CER (CAPP), las protein-quinasas activadas por estrés (SAPK), así como el factor de transcripción NF- κ B (Fig. 3.3.1.).

Además, existen evidencias crecientes que implican a la CER como mensajero secundario en la respuesta celular frente a patógenos bacterianos. Así, se ha demostrado que los niveles de CER median la invasión de *Neisseria gonorrhoeae* en células epiteliales vía la activación de una SMasa celular ácida (Grassmé *et al.*, 1997). Igualmente, la producción de citoquinas, como la de IL-8 en la infección por *Helicobacter pylori* (Masamune *et al.*, 1999) o de IL-6 durante la adherencia de *Escherichia coli* P-fimbriado a células epiteliales, también han sido asociadas a los niveles de CER (Hedlund *et al.*, 1996). Estos datos muestran que la vía SM-CER juega un papel importante en el desarrollo de las infecciones bacterianas. Apoyando esta idea, un estudio en el que se transfirió el gen *cerB* de *B. cereus*, que codifica una SMasa, en células Molt-4 mostraba que la expresión de dicho gen bacteriano en el interior de las células dio lugar a la generación de CER y a la muerte celular por apoptosis (Zhang *et al.*, 1997). Aunque estos resultados indican que las SMasas procariotas pueden interferir en la vía SM-CER de las células eucariotas, hasta ahora no hay ninguna evidencia que demuestre que esta interferencia pueda ocurrir durante la infección de la célula hospedadora, en particular durante el parasitismo intracelular.

Por tanto, aquí nos hemos propuesto investigar este aspecto utilizando SmcL como modelo. Para ello hemos realizado experimentos con una batería de mutantes genéticamente definidos de *L. ivanovii* y hemos expresado de forma heteróloga su gen codificante, *smcL*, en un doble mutante $\Delta plcAB$ de *L. monocytogenes*, en un intento de aislar el efecto de SmcL y comprender el mecanismo por el que interfiere con la vía SM-CER. Los resultados muestran que SmcL mimetiza el papel de las esfingomielinasas endógenas, induciendo un incremento en los niveles de CER durante la infección intracelular. Para ello, el acceso de la bacteria al citoplasma de la célula hospedadora es un requisito indispensable. El incremento en los niveles de CER se correlacionó con un incremento en los niveles de muerte celular por apoptosis.

3.3.1. *L. ivanovii* produce una potente inducción de CER mediada por SmcL

En primer lugar determinamos los niveles de CER en células epiteliales MDBK durante la infección con *L. ivanovii*. Se infectaron cultivos de células MDBK con *L. ivanovii* por el método de supervivencia a gentamicina (ver Materiales y Métodos), y se cuantificaron los niveles de los segundos mensajeros CER y DAG a lo largo de las primeras 8 horas de infección. Los niveles de DAG fueron 5 veces más elevados que los de las células no infectadas inmediatamente después de la invasión bacteriana, disminuyendo en el transcurso de la infección. Los niveles de CER fueron incrementándose progresivamente hasta alcanzar a las 6 horas un nivel 5 veces superior al del control negativo (Fig 3.3.2.A.). Para saber si SmcL estaba involucrada en la producción de alguno de estos mensajeros secundarios realizamos infecciones con el mutante *smcL::ΩKm*. Los niveles de DAG a lo largo de la infección con esta bacteria fueron los mismos que los obtenidos con su cepa parental. Por lo contrario, los niveles de CER se redujeron hasta tres veces comparado con los niveles de CER alcanzados por la cepa silvestre (Fig 3.3.2.A.). El aumento de los niveles de CER se correlacionó en ambos casos con una bajada proporcional en los niveles de SM, lo que muestra que la CER no proviene de la activación de la síntesis de CER *de novo*, sino de la degradación de SM (Fig. 3.3.2.B.). Esto indica que, en este contexto, SmcL modula los niveles de CER pero no interviene en la respuesta mediada por DAG de la célula infectada. La no disminución a niveles basales de CER con el mutante *smcL*, unido al incremento de DAG y concomitante reducción de PC, indica que la CER generada durante la infección por *L. ivanovii* proviene en parte de la actividad de SmcL, pero también de la fosfolipasa de amplio rango de sustrato, PlcB que, como antes hemos señalado, posee cierta actividad sobre la SM.

Todos los factores de virulencia descritos en *L. ivanovii*, a excepción de SmcL, están regulados positivamente por PrfA. Por tanto, un mutante *prfA* no expresa los principales factores membranolíticos de *Listeria* codificados por los genes PrfA dependientes *hly*, *plcA* y *plcB*, y quedará preferentemente

englobado en el compartimento vacuolar de la célula hospedadora. Infecciones realizadas con un mutante *prfA* de *L. ivanovii* mostraron que los niveles de DAG y de CER se mantuvieron en los mismos niveles que los del control no infectado (Fig 3.3.2.C.). Por tanto, ni la propia invasión bacteriana ni la secreción de SmcL desde el compartimento fagosomal son suficientes para inducir la liberación de CER o DAG en las células infectadas.

Para profundizar en la importancia del compartimento en el que *Listeria* debe expresar *smcL* para afectar los niveles de CER de la célula hospedadora, realizamos infecciones con un mutante *hly* de *L. ivanovii* obtenido por interrupción del gen estructural *hly*. Estudios anteriores han demostrado que mutantes *hly* todavía pueden escapar, aunque de forma poco eficiente, del fagosoma (Portnoy *et al.*, 1988). En infecciones realizadas con esta bacteria se determinó un aumento débil y progresivo de los niveles de DAG y de CER a lo largo de la infección (Fig 3.3.2.C.), compatible con una salida retrasada pero sostenida de las bacterias intravacuolares al citoplasma de la célula infectada. Estos resultados confirman que SmcL induce la producción de CER una vez que la bacteria ha producido la interrupción de la vacuola fagocítica (Tabla 3.3.1.).

Tabla 3.3.1. Eficiencia de escape del compartimento fagosomal y capacidad de incrementar los niveles de CER de las cepas de *L. ivanovii* utilizadas. La eficiencia de escape (metanálisis a partir de datos publicados (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b)) se correlaciona con la capacidad de inducir un aumento en los niveles de CER en las células infectadas. Nótese que SmcL solamente interfiere en los niveles de CER cuando la bacteria es capaz de escapar al citoplasma de la célula hospedadora. El mutante *smcL* posee una capacidad menor de escape e inducción de los niveles de CER que su cepa parental (WT), pero mayor que la de los mutantes *hly* y *prfA*, ya que produce aún niveles silvestres de los factores de escape Hly, PlcA y PlcB, así como de las fosfolipasas que pueden intervenir en la vía SM-CER, PlcA y PlcB (ver Discusión).

	Factores membranolíticos				Eficiencia de escape	Inducción de CER
WT	Hly	PlcA	PlcB	SmcL	++++	↑↑↑↑↑
<i>smcL</i>	Hly	PlcA	PlcB	-	+++	↑↑↑
<i>hly</i>	-	PlcA	PlcB	SmcL	++	↑↑
<i>prfA</i>	-	-	-	SmcL	+	0

3.3.2. SmcL es homóloga a la SMasa neutra eucariota

Nuestros resultados permiten desechar la idea de que SmcL sea una SMasa ácida con actividad preferencial en el compartimento fagosómico. Por el contrario, son compatibles con una SMasa con actividad a pH neutro, es decir, el pH del compartimento citoplasmático. Para comprobar esta hipótesis, alineamos primeramente la secuencia aminoacídica de SmcL con las esfingomielinasas eucariotas descritas hasta el momento. SmcL no presentó ninguna similitud significativa con las SMasas ácidas descritas en el hombre, ratón, *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, mostró más de un 27% de identidad con las dos esfingomielinasas neutras descritas recientemente en el hombre, nSMasa1 y nSMasa2, respectivamente (Tomiuk *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 2000) (Fig 3.3.3.A.). El análisis del dendrograma realizado con las SMasas, tanto procariotas como eucariotas, muestra claramente que, a nivel de secuencia aminoacídica, la familia de las SMasas está formada por dos subfamilias, las SMasas ácidas y las SMasas neutras, y que SmcL se agrupa dentro de esta última (Fig. 3.3.3.B). Estas homologías estructurales sugieren que SmcL podría compartir funciones análogas a las de las SMasas neutras de mamífero.

Para comprobar esta hipótesis, realizamos un análisis enzimático de la actividad de SmcL a diferentes pH. Los resultados obtenidos indican claramente que SmcL es una SMasa con actividad óptima a pH neutro (7,4). Para analizar si SmcL podría actuar como las SMasas neutras eucariotas, ensayamos otra propiedad característica de esta subfamilia, como es la dependencia de cationes Mg^{2+} . La actividad de SmcL fue máxima en presencia de $MgCl_2$, mientras que fue completamente anulada con la adición de EDTA (Fig. 3.3.4.). Por tanto, SmcL posee, además de una estructura similar, características bioquímicas propias de las SMasas neutras.

En definitiva, estos resultados demuestran que SmcL es un homólogo funcional de las SMasas neutras eucariotas, lo que abre la posibilidad de que exista un mimetismo funcional durante la infección bacteriana.

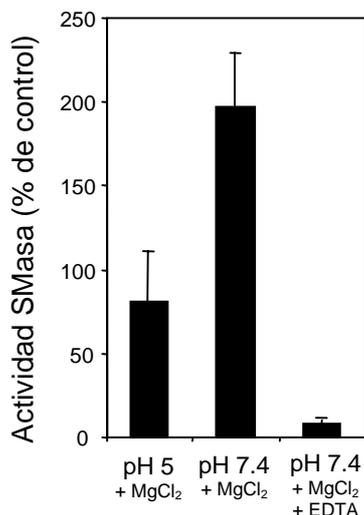


Fig. 3.3.4. Actividad enzimática de SmcL. La actividad de SmcL es máxima a pH 7,4 + 50 mM MgCl₂ y se inhibe completamente con la adición de 50 mM de EDTA. Los resultados mostrados son la media de dos experimentos ± DE.

3.3.3. SmcL es un inductor específico de la CER

Como hemos señalado anteriormente, los resultados con el mutante *hly* de *L. ivanovii* demuestran que las fosfolipasas PlcA y PlcB también están implicadas en la generación de CER. Para aislar el efecto de SmcL y determinar la contribución que tiene por sí misma en la inducción de este 2º mensajero lipídico, expresamos su gen codificante en un sistema heterólogo carente de fosfolipasas. Para ello utilizamos el mutante de *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$, en el que *plcA* y *plcB* han sido delecionados por manipulación genética. Esta cepa conserva *hly*, y es por tanto capaz de escapar eficientemente del compartimento vacuolar y realizar su ciclo intracelular completo. Las células infectadas con este mutante no presentaron ningún incremento en los niveles de CER durante la infección (Fig 3.3.5.A.), mientras que las que fueron

ensayadas con su cepa parental como control, *L. monocytogenes* WT, sufrieron una elevación en el nivel de CER comparable al descrito anteriormente para esta bacteria (Fig. 3.3.5.B.) (Schwarzer *et al.*, 1998). Estos resultados demuestran que PlcB y/o PlcA son los responsables del incremento en los niveles de CER en la infección con *L. monocytogenes*. Cuando se realizaron infecciones con el mutante $\Delta plcAB$ complementado con el gen *smcL* en un plásmido, pH*smcL*, los niveles de CER se elevaron durante la infección hasta dos veces los del control negativo (Fig. 3.3.5.A.). Estos resultados demuestran que la expresión de *smcL* por una bacteria que escapa al citoplasma es suficiente para inducir un incremento en los niveles de CER en la célula infectada.

3.3.4. SmcL incrementa la muerte celular por apoptosis

Existe abundante evidencia experimental de que el incremento en los niveles de CER da lugar, en un amplio rango de células, a la muerte celular por apoptosis. Como se puede observar en la Figura 3.3.6., *L. ivanovii* produce una potente respuesta apoptótica en células MDBK. Para investigar si SmcL estaba implicada en este fenómeno, determinamos la capacidad de inducción de apoptosis en estas células por parte del mutante *smcL::ΩKm*. Los niveles de apoptosis fueron significativamente inferiores a los inducidos por su cepa isogénica silvestre (Fig. 3.3.5.C.), lo que indica que SmcL media, efectivamente, la inducción de apoptosis por parte de *L. ivanovii*.

Con el fin de disecar más finamente este fenómeno, aislamos el efecto de SmcL sobre la muerte celular infectando células MDBK con $\Delta plcAB$ y $\Delta plcAB$ (pH*smcL*). Las células fueron teñidas con el marcador vital fluorescente yoduro de propidio (IP) 8 h después de la infección y analizadas por FACS. La cepa $\Delta plcAB$ (pH*smcL*) resultó tener mayor capacidad citotóxica (12,8% células muertas) que su cepa parental $\Delta plcAB$ (5,7% células muertas) (Fig 3.3.7.), lo que demuestra que SmcL está implicada por sí sola en la muerte celular.

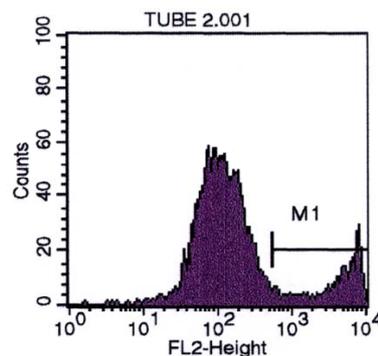


Fig. 3.3.7. Análisis por FACS de la citotoxicidad de *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ (izquierda) y $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$) (derecha). M1 delimita el umbral de células positivas a IP, que son más numerosas cuando el mutante expresa *smcL*. Se muestra un resultado representativo de los tres experimentos independientes realizados.

Para determinar el mecanismo por el que *SmcL* induce la muerte de la célula hospedadora, cultivos en monocapa de células MDBK fueron infectados con las dos cepas, y teñidos con IP y Hoechst 33348 8 h después de la infección. Esta tinción doble permite diferenciar la muerte celular por necrosis de la apoptosis en función de la morfología nuclear (ver Materiales y Métodos).

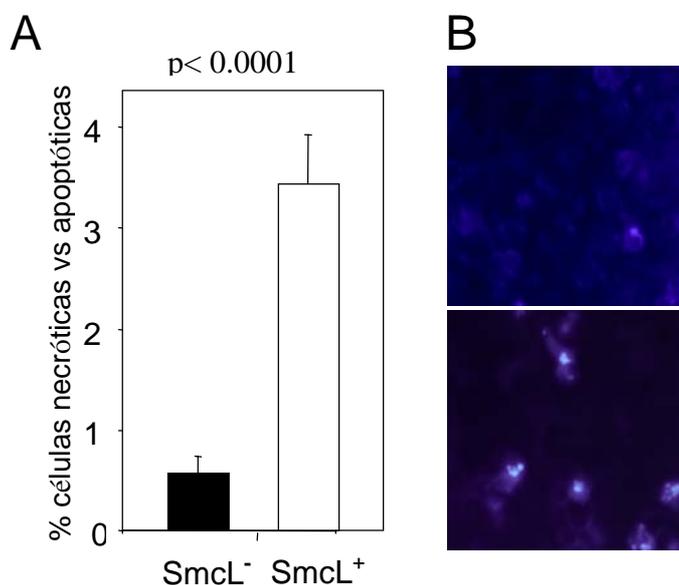


Fig. 3.3.8. *SmcL* media la apoptosis de células MDBK.

A. Porcentaje de células MDBK necróticas tras la infección con *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ y $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$), $SmcL^-$ y $SmcL^+$, respectivamente. Se muestra el resultado del recuento de 3000 células de tres experimentos independientes \pm DE.

B. Fotografías de fluorescencia representativas de células MDBK infectadas y marcadas con Hoechst 33348. Obsérvese la condensación y fragmentación nuclear característica de apoptosis en la monocapa infectada con $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$) (panel inferior) frente a la monocapa infectada con $\Delta plcAB$ (panel superior).

Recuentos celulares mostraron que las células infectadas con $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$) presentaban un número de células apoptóticas 6 veces mayor que el de las infectadas con $\Delta plcAB$ (Fig 3.3.8.).

Teñimos las células MDBK infectadas con $\Delta plcAB$ y $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$) por la técnica de May-Gruenwald-Giemsa (MGG), que permite observar la colocación de las bacterias intracelulares y la morfología de célula hospedadora. El examen de numerosos campos microscópicos mostró que la presencia de $\Delta plcAB$ en el interior de las células MDBK, incluso en número elevado, no alteraba la morfología celular típicamente epitelióide (Fig. 3.3.9.). Sin embargo, las células infectadas con $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$) mostraron frecuentemente fragmentación nuclear típicamente apoptótica, incluso cuando el número de bacterias intracelulares observado fue reducido (Fig.3.3.9.). En todos los casos, las células apoptóticas presentaron bacterias en su interior, lo que muestra que la inducción de apoptosis no se realiza mediante la activación de una cascada proapoptótica desde el espacio extracelular, sino que requiere la previa internalización de la bacteria. En definitiva, nuestros resultados indican que la expresión intracelular de *smcL* desencadena la muerte de la célula hospedadora por apoptosis.

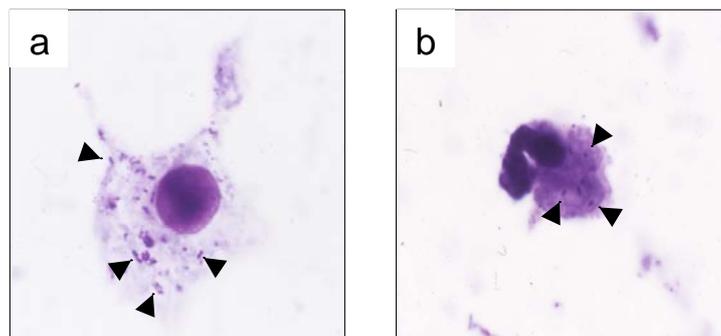


Fig. 3.3.9. Morfología de células MDBK infectadas con *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ y $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$). Las células fueron teñidas por la técnica de May-Gruenwald Giemsa 8 horas después de la infección. Las puntas de flecha indican bacterias intracelulares.
a. Infección con *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$. Se observa un gran número de bacterias intracelulares pero una morfología celular y nuclear inalteradas.
b. Infección con *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ ($pHsmcL$). Las células presentan una morfología típicamente apoptótica, aún cuando el número de bacterias intracelulares es muy reducido.

4. DISCUSIÓN

L. ivanovii se distingue de *L. monocytogenes* en que presenta, en agar sangre de cordero, un halo de hemólisis doble que se completa en la proximidad de *R. equi*, dando lugar a una reacción tipo CAMP en forma de pala. En este trabajo hemos identificado el factor responsable de estas características hemolíticas diferenciales de *L. ivanovii*. Se trata de *smcL*, que codifica una SMasa específicamente secretada por el patógeno animal *L. ivanovii* (Kreft *et al.*, 1989; Vázquez-Boland *et al.*, 1989). La estructura primaria de SmcL es muy similar (más del 50% de indentidad) a la de las SMasas de las bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C como *S. aureus* (β -toxina) y *B. cereus*. Es también muy similar a la de la espiroqueta *L. interrogans*, una especie bacteriana filogenéticamente más distante. Esta elevada similitud estructural parece correlacionarse con la función, a juzgar por las propiedades hemolíticas de *L. ivanovii*, *S. aureus* y *B. cereus* en placas agar sangre. Estas bacterias están rodeadas de una similar zona de hemólisis parcial, que se completa en presencia de un factor secretado por *R. equi* (una colesterol oxidasa), dando lugar a una reacción de hemólisis tipo CAMP en forma de pala (Ripio *et al.*, 1995). El fenotipo del mutante de *L. ivanovii* nulo en *smcL*, *smcL:: Ω Km*, es prácticamente idéntico al de *L. monocytogenes*: presenta una débil β -hemólisis simple y una reacción de CAMP con *R. equi* en forma de cerilla. La expresión de *smcL* a partir de *L. innocua* le ha conferido a esta bacteria no patógena y no hemolítica un halo de hemólisis incompleta y una reacción tipo CAMP con *R. equi* en forma de pala indistinguible de la producida por *L. ivanovii*. Esto demuestra, además, que SmcL por sí sola es la responsable de las características hemolíticas particulares de *L. ivanovii*.

Las bacterias patógenas producen una variedad de distintas especies moleculares de fosfolipasas, de las que un gran número parece haber evolucionado de forma convergente hacia la hidrólisis de SM, un fosfolípido mayoritario en las membranas de células eucariotas. Esto sugiere que la capacidad de degradar SM juega un importante papel en la virulencia bacteriana. Algunos de estos enzimas no degradan solamente SM, sino también otros fosfolípidos. Es el caso de las fosfolipasas dependientes de zinc de bacterias de bajo contenido en G+C, como la α -toxina de *Clostridium*

perfringens y PlcB de *L. monocytogenes*, así como de la familia a la que pertenece PlcS de *Pseudomonas aeruginosa*. SmcL y sus SMasas homólogas se diferencian de estas enzimas en que son absolutamente específicos del sustrato SM. Existe una gran cantidad de información acerca de las propiedades bioquímicas y tóxicas del prototipo de las SMasas bacterianas, la β -toxina de *S. aureus*. Sin embargo, el significado de muchos de esos estudios es oscuro, debido a la posible presencia de elementos contaminantes en las preparaciones de toxina purificada, y han sido muy escasos los intentos de utilizar una estrategia genética para descifrar el papel de la β -toxina en la virulencia (Cifrian *et al.*, 1996; O' Callaghan *et al.*, 1997). Estos intentos, sin embargo, han empleado una metodología deficiente que no permite establecer de forma inequívoca una relación entre la β -toxina y las observaciones realizadas. La estrategia genética que hemos utilizado aquí con SmcL nos ha permitido por primera vez demostrar sin ambigüedad y de forma definitiva la implicación de una SMasa bacteriana en la virulencia y en el proceso patogénico.

Hemos utilizado un mutante isogénico no polar del gen estructural SmcL para demostrar que este enzima es requerido por *L. ivanovii* para su virulencia completa en ratones. Mostramos por complementación genética que SmcL es suficiente para promover el crecimiento intracelular de un mutante de *L. monocytogenes* libre de los determinantes membranolíticos requeridos para el escape del fagosoma, PKP1. *L. monocytogenes* crece intracelularmente sólo si es capaz de alcanzar el citoplasma de la célula infectada, lo que implica la previa disrupción de la membrana de la vacuola fagocítica por la secreción de proteínas citolíticas bacterianas (Portnoy, 1994; Sheehan *et al.*, 1994; Goebel y Kreft, 1997). Por tanto, nuestros resultados indican que SmcL media el escape de la bacteria desde el compartimento vacuolar por medio de una función membranolítica. Presentamos evidencias de esta actividad por microscopía electrónica de transmisión, que muestra que una cantidad significativa del mutante de *L. monocytogenes* complementado con *smcL* fue liberada al citoplasma celular.

Es interesante destacar que aproximadamente el 10-15% de mutantes PKP1 parecían estar en contacto con el citoplasma celular. Este hecho es difícil de compatibilizar con el comportamiento de *L. monocytogenes* exenta de *hly*, *plcA* y *plcB*, que debería permanecer en el compartimento fagosomal. Estas observaciones pueden ser un artefacto resultante de la disrupción espontánea de fagosomas de la línea MDBK que contienen *L. monocytogenes* durante un período prolongado de tiempo. Una interpretación alternativa más excitante sería que algún factor desconocido pudiera mediar el escape a largo plazo de la bacteria al citoplasma celular. Estos datos indican que SmcL promueve la proliferación bacteriana intracelular lesionando la membrana del fagosoma y dando lugar a una liberación de la bacteria al citoplasma de la célula infectada.

Además de SmcL, *L. ivanovii* secreta otras tres proteínas membranoactivas (Hly, PlcA y PlcB) que han sido implicadas en el escape del fagosoma en *L. monocytogenes* (Marquis *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996). Hly juega un papel determinante en la lisis de la membrana vacuolar y la inactivación de su gen codificante, por tanto, conlleva una anulación de su capacidad de supervivencia intracelular y pérdida total de virulencia (Portnoy, 1994; Sheehan *et al.*, 1994). Las fosfolipasas C, PlcA y PlcB, tienen una función secundaria y son funcionalmente redundantes en la potenciación de el efecto de Hly en la disrupción del fagosoma. Por tanto, la inactivación de sus genes codificantes en *L. monocytogenes* da lugar a un descenso en su capacidad de multiplicación intracelular y a una atenuación de su virulencia, que eleva su DL₅₀ en un factor de 2 (*plcA*) o 20 (*plcB*) (Marquis *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). La consecuencia de la mutación en *smcL* para *L. ivanovii* en términos de virulencia en el modelo murino (un incremento de cuatro veces la DL₅₀) y supervivencia intracelular fue similar a la de la mutación simple en *plcA* o *plcB* de *L. monocytogenes*. Por tanto, SmcL parece tener una función accesoria como factor de virulencia membranolítico, similar a la de las fosfolipasas PlcA y PlcB. Estudios con la SMasa y la fosfolipasa C de *B. cereus* de amplio espectro (homólogos a SmcL y PlcB, respectivamente) han mostrado que estos enzimas no son líticos por sí mismos, pero que juntos muestran una capacidad hemolítica significativa (Gilmore *et al.*, 1989). Por tanto, SmcL podría actuar sinérgicamente con las otras fosfolipasas, especialmente con PlcB, para

potenciar la capacidad membranolítica inducida por Hly. SmcL parece tener este efecto sinérgico, al menos *in vitro* (Fig. 3.1.5.).

¿Por qué posee *L. ivanovii* este factor de virulencia adicional? *L. ivanovii* afecta principalmente a rumiantes y posee *smcL*, mientras que *L. monocytogenes* es capaz de producir listeriosis en un rango muy amplio de hospedadores y no posee esta tercera fosfolipasa membranolítica. Es muy tentador especular que SmcL pudiera estar involucrado en el tropismo de hospedador. Esta idea está sugerida por el hecho de que SmcL causa la lisis de eritrocitos ovinos, pero no de los de origen equino. Una actividad lítica selectiva similar se ha observado también con la SMasa de *S. aureus* y se correlaciona con la relación PC-SM de las membranas de los eritrocitos. Así, solamente los eritrocitos de rumiantes, cuyas membranas poseen el contenido en SM más elevado de entre los mamíferos (51% en ovinos y 46% en bovinos frente a, por ejemplo, 13,5% en equinos, 11% en caninos y 11-13% en pequeños roedores), son susceptibles a esta β -toxina (Nelson, 1967; Fehrenbach y Jürgens, 1991; Titball, 1993). Esta correlación podría ser meramente casual, y depender de otros factores desconocidos que afecten a la sensibilidad de las membranas eritrocitarias a la SMasa. Sin embargo, resulta atractivo plantear que SmcL haya podido evolucionar selectivamente en *L. ivanovii* porque algunos tipos celulares o compartimentos subcelulares implicados en su patogenia pudieran contener elevadas cantidades de SM en sus membranas. Apoyando esta idea, las bacterias en las que se ha identificado una SMasa presentan un marcado tropismo patogénico por los rumiantes: la cepa de *L. interrogans* de la que ha clonado la SMasa pertenece a la serovariedad *hardjo*, que está específicamente adaptada a los rumiantes, en los que induce procesos como septicemia, aborto y meningitis, mientras que *B. cereus* y *S. aureus* producen frecuentemente mastitis en ganado bovino y ovino.

En línea con un posible papel de SmcL en el tropismo de hospedador, *smcL* está solamente presente en *L. ivanovii* dentro del género *Listeria*, y está rodeado por el locus *i-inIEF* e *i-inIGH* que codifican para internalinas, una familia de proteínas con una función clara en el tropismo celular tanto *in vitro*

como *in vivo* (Lecuit *et al.*, 2001; Engelbrecht *et al.*, 1998a). De hecho, *smcL* está integrado dentro de una isla de patogenicidad inestable de 22 kb específica de *L. ivanovii* a la que hemos denominado LIPI-2 (por Listeria Pathogenicity Island 2), y cuyo estudio ha sido objeto de la tesis doctoral de Gustavo Domínguez-Bernal. Además, dentro de LIPI-2, *smcL* es una unidad monocistrónica y se transcribe en sentido opuesto a los genes que la circundan, estando flanqueada por dos repeticiones invertidas perfectas de 14 pb (IR). Esto hace pensar que, desde un punto de vista evolutivo, *smcL* se haya integrado en un *locus* de internalinas preexistente y se ha conservado porque constituya alguna ventaja selectiva para la biología de *L. ivanovii*. Consistente con esta idea, *smcL* es el único factor independiente de PrfA del *locus* y su porcentaje de G+C (36%) es más elevado que el del *locus* de internalinas que la rodean (32%). *smcL* parece ser un islote de patogenicidad formado por un solo gen, que ha sido adquirido por *L. ivanovii* mediante transferencia horizontal y que permanece integrado de forma estable en su cromosoma. Por tanto, *smcL* y las internalinas comprenden un cluster genético que podría estar implicado en la determinación de la especificidad de hospedador.

Merece la pena destacar el paralelismo entre este nuevo cluster genético y el que posee *hly*. Ambos contienen un determinante citolítico monocistrónico que puede ser independiente (*smcL*) o dependiente (*hly*) (Domann *et al.*, 1993) del regulador central de la virulencia en *Listeria*, PrfA. Esto enfatiza que la lisis de membranas es un paso clave en la patogénesis de *Listeria* y sugiere que *hly* y *smcL* tienen un papel crucial en la virulencia bacteriana, y han evolucionado consecuentemente como unidades transcripcionales independientes.

La secreción de Hly, PlcA y PlcB es suficiente para la disrupción vacuolar en la patogénesis de *L. monocytogenes*. Queda por tanto pendiente la cuestión, de por qué *L. ivanovii* posee un factor membranolítico adicional implicado en el escape del compartimento vacuolar. Hly de *L. ivanovii*, ivanolisina O (ILO), tiene un pH óptimo de 6,5, y no de 5,5 como la toxina correspondiente de *L. monocytogenes* (Jones *et al.*, 1996; Vázquez-Boland *et al.*, 1989). Por tanto, el ambiente ácido de la vacuola primaria (resultante de la

fagocitosis de bacterias extracelulares) podría requerir la actuación conjunta de ILO y SmcL para lesionar la membrana vacuolar de forma eficiente. Apoyando esta idea, la SM está localizada en la cara externa de la membrana celular, y sería por tanto accesible a proteínas bacterianas secretadas en el lumen de la

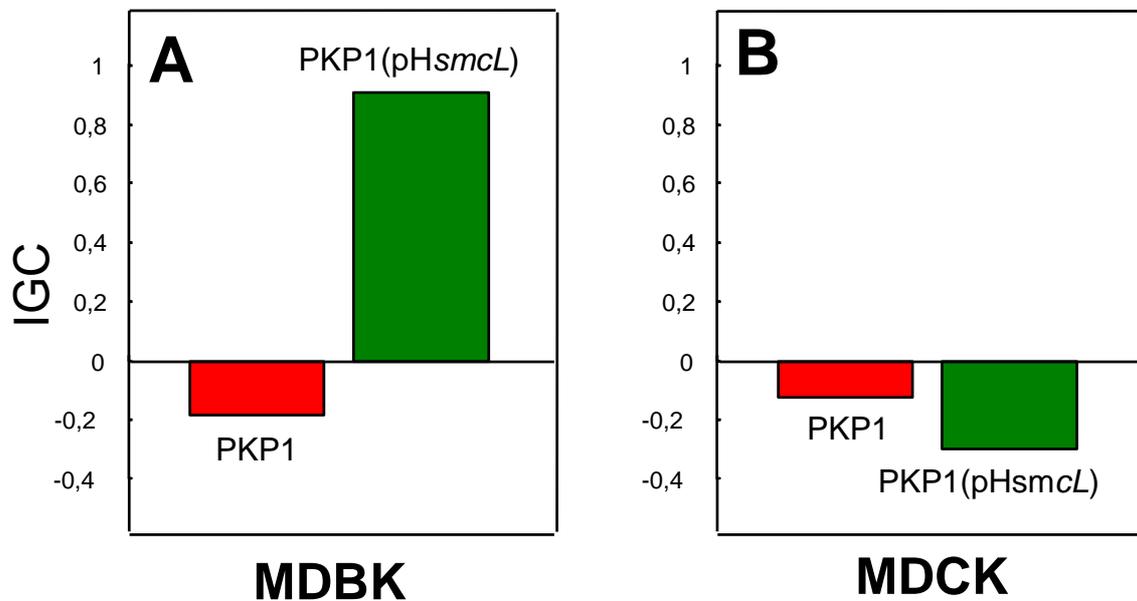


Fig. 4.1. Proliferación intracelular de PKP1 y PKP1 (pHsmcL) en células MDBK (A) y MDCK (B) 7 horas postinfección.

vacuola fagocítica primaria (Fehrenbach y Jürgens, 1991; Allan, 1996). La complementación con *smcL* fue suficiente para permitir el acceso de *L. monocytogenes* PKP1 al citoplasma de la célula infectada. Esto demuestra que SmcL es activa frente a la membrana del fagosoma primario. Además, SmcL podría estar implicada en el tropismo de hospedador, como sugiere el análisis del locus y la propiedad lítica selectiva de SmcL *in vitro* frente a membranas de origen ovino. Esta hipótesis está además apoyada por la observación de que la supervivencia intracelular de *smcL::ΔKm* estaba significativamente impedida en células de origen bovino MDBK, mientras que la mutación no tuvo ningún efecto en los macrófagos murinos J774. Igualmente, resultados preliminares muestran que PKP1 (pHsmcL) no fue capaz de proliferar en la línea celular epitelioide de origen canino MDCK, similar a MDBK, pero de una especie no naturalmente susceptible a la infección por *L. ivanovii* (Fig. 4.1.). El estudio de la implicación SmcL en el tropismo de hospedador de *L. ivanovii* es un tema

extraordinariamente interesante que ya hemos empezado a abordar en nuestro laboratorio.

Un aspecto que está siendo tratado de forma profusa en relación a los mecanismos de patogenicidad de bacterias es la activación de cascadas de señales en las células del hospedador (Cossart *et al.*, 1996). Nuestros resultados establecen por primera vez un vínculo entre una SMasa procariota, la generación de CER y la muerte celular programada durante la infección bacteriana. De esta forma, demostramos por primera vez una nueva función de las fosfolipasas bacterianas en la patogenia de las infecciones.

El producto de la acción de una SMasa sobre la SM es la CER. Utilizando SmcL como modelo, hemos investigado si durante la infección intracelular, esta SMasa bacteriana da lugar a CER. Para ello infectamos células epiteliales MDBK con *L. ivanovii*, y observamos un incremento en los niveles de CER de hasta 5 veces los de células no infectadas. La infección con el mutante isogénico *smcL::ΩKm* demostró que este fuerte incremento se debe a SmcL, ya que los niveles de CER inducidos por este mutante fueron 3 veces menores que los alcanzados por su cepa parental. Sin embargo, estos niveles no se redujeron hasta niveles basales, lo que indica que existen otros factores adicionales que median esta elevación. Para reconocerlos, utilizamos dos mutantes de *L. ivanovii* genéticamente definidos y afectados en factores de virulencia caracterizados anteriormente.

Por una parte utilizamos el mutante *prfA* de *L. ivanovii*, que produce niveles silvestres de SmcL, pero ningún factor de virulencia PrfA-dependiente, como puedan ser Hly, PlcA o PlcB, los principales factores responsables de la ruptura del fagosoma y el escape de la bacteria al citoplasma de la célula hospedadora. Los resultados de las infecciones realizadas con este mutante, mostraron que SmcL no es suficiente para incrementar los niveles de CER durante la infección, ya que estos niveles se mantuvieron al mismo nivel que lo de las células no infectadas. Este resultado podría indicar que, como ocurre con *L. monocytogenes*, la mutación de *prfA* anula completamente la capacidad invasiva de esta bacteria y no se podría esperar que hubiera expresión

intravacuolar de *smcL*. Sin embargo, los recuentos bacterianos que realizamos en todo momento para controlar la infección, nos han mostrado que el mutante *prfA* de *L. ivanovii* invade a los mismos niveles que la cepa silvestre. Esto indica que *smcL* se expresó a niveles silvestres en el compartimento vacuolar, y que, desde el interior de los mismos, *SmcL* no puede dar lugar a la producción de CER. Además, demostramos una nueva diferencia patogénica entre *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*, como es la independencia/dependencia, respectivamente, del regulador central de la virulencia, *PrfA*, para la invasión celular, y abre la posibilidad de que estas bacterias utilicen mecanismos distintos para penetrar en las células eucariotas.

Por otra parte realizamos infecciones con un mutante *hly* de *L. ivanovii*. Este mutante aún produce, a niveles silvestres, las dos fosfolipasas con actividad sobre la SM: *PlcB*, para la que se demostró actividad sobre la SM por Geoffroy *et al.* (1991) y *SmcL*. Sin embargo, su capacidad de escape al citoplasma celular se ve afectada, al ser *Hly* el principal factor membranolítico, aunque no anulada, ya que la acción conjunta de *PlcA*, *PlcB* y *SmcL* le permitirá aún romper la membrana vacuolar y escapar al citoplasma de la célula hospedadora. Esta bacteria induce un incremento progresivo de los niveles de CER durante la infección, e indican que este incremento podría reflejar una salida progresiva de las bacterias al citoplasma celular. Este resultado, unido a los anteriores, nos permite concluir que *SmcL* afecta directamente a los niveles de CER de la célula hospedadora, aunque su efecto solo puede llevarse a cabo cuando la bacteria es capaz de escapar del compartimento vacuolar de la célula infectada.

Se ha demostrado con anterioridad que *L. monocytogenes* es capaz de inducir un incremento en los niveles de CER cuando infecta células endoteliales (Schwarzer *et al.*, 1998) y macrófagos (Smith *et al.*, 1995). En nuestros experimentos hemos observado el mismo efecto durante la infección de las células epiteliales MDBK con *L. monocytogenes*. Por otra parte, el mutante deficiente en los genes codificantes para las dos fosfolipasas, *plcA* y *plcB*, no induce ningún incremento en los niveles de CER durante la infección. De estas dos fosfolipasas, *PlcB* es una lecitinasa que posee una actividad

enzimática residual sobre la SM (Geoffroy *et al.*, 1991), lo que podría explicar su implicación directa en la generación de CER. PlcA, sin embargo, es una fosfolipasa específica de fosfatidilinositol, y su posible participación en este proceso podría llevarse a cabo de forma indirecta mediante la generación de DAG y la activación de una SMasa endógena. Estudios anteriores ya han demostrado una función diferencial de PlcA y PlcB en los mecanismos de transducción de señales conocidos por estar ligados a la vía SM-CER. En infecciones de la línea celular J774, PlcA media el incremento de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se produce durante los primeros momentos de la infección por *L. monocytogenes* (Wadsworth *et al.*, 1999), y ambas fosfolipasas intervienen por separado en el mantenimiento de la activación de NF- κ B durante la infección de macrófagos P388D1 (Hauf *et al.*, 1997). Experimentos con mutantes en *plcA* o en *plcB* están actualmente en curso para determinar la contribución de cada una de las fosfolipasas a la generación de CER y su relación con las vía de señalización por $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la activación de NF- κ B.

Las células eucariotas poseen principalmente dos subtipos de SMasas implicadas en la vía SM-CER, que se diferencian en la sublocalización celular en la que ejercen su función y sus propiedades bioquímicas. La SMasa ácida se localiza en la membrana del lisosoma y posee una actividad máxima a pH 5. Por otra parte, la SMasa neutra se encuentra en la membrana plasmática y actúa preferentemente a pH 7,4 y en presencia de Mg^{2+} . Nuestros resultados con SmcL y *L. ivanovii* nos hicieron pensar que esta SMasa bien podría ser una SMasa neutra, ya que no observamos generación de CER cuando la bacteria expresaba SmcL en el compartimento ácido intravacuolar. Nuestros análisis revelaron que, efectivamente, la actividad de SmcL es máxima a pH 7,4, y que requiere cationes Mg^{2+} para su actividad catalítica, con lo que las características de SmcL coinciden plenamente con las de las SMasas neutras eucariotas. Sin embargo, las SMasas neutras eucariotas presentan una extensión C-terminal a través de la cual están ancladas a la membrana plasmática, donde generan CER a partir de la SM de la membrana. SmcL, sin embargo, no posee ninguna extensión de anclaje a membrana. Así, se trata de una molécula hidrosoluble que puede generar CER allí donde encuentra su sustrato y las condiciones de pH e iónicas necesarias para su actividad

catalítica. El modelo que proponemos para SmcL y la infección por *Listeria* es el siguiente: cuando la bacteria es capaz de inducir la disrupción de la membrana vacuolar, el pH ácido del fagolisosoma se equilibra al neutro del citoplasma. Esto permite la acción de SmcL tanto en la membrana de la propia vacuola lisada, así como su difusión a través del citoplasma celular a otros orgánulos intracelulares, incluyendo la membrana plasmática. Por tanto, SmcL daría lugar a CER en diversas ubicaciones intracelulares, y su acción no estaría limitada, como la de las SMasas eucariotas, a un compartimento concreto. En línea con esta hipótesis, nosotros hemos observado en las microfotografías de MET una gotas lipídicas intracelulares asociadas a diversas membranas, que bien podrían ser acúmulos de CER, cuando el mutante PKP1 expresaba *smcL* y había producido la disrupción de la vacuola fagocítica (Fig. 3.2.3.).

En el presente estado del conocimiento, resulta difícil ignorar que la(s) SMasa(s) participan en la señalización celular (Levade *et al.*, 1999), aunque la definición de cual o cuales son la(s) SMasa(s) eucariotas implicadas está actualmente en discusión. En nuestro trabajo hemos utilizado SmcL, una SMasa procariota homóloga a las otras esfingomielinasas bacterianas y que se encuadra dentro de la subfamilia de las esfingomielinasas neutras conjuntamente con las SMasas eucariotas nSMase1 (Tomiuk *et al.*, 1998) y nSMase2 (Hofmann *et al.*, 2000) recientemente identificadas. Las esfingomielinasas bacterianas, especialmente la SMasa de *B. cereus*, que también es una SMasa neutra, ha sido ampliamente utilizada para mimetizar los efectos biológicos de la activación de esfingomielinasas endógenas. La aplicación externa en cultivos celulares induce la generación de CER en la membranas celulares, que da lugar a multitud de efectos biológicos, entre los que se encuentra la inducción, en ciertos tipos celulares, de apoptosis. Nosotros no hemos observado apoptosis cuando añadimos la SMasa de *B. cereus* a las células MDBK, pero sí cuando expresamos *smcL* desde el citoplasma celular. Esto coincide con observaciones previas en las que la SMasa de *B.cereus* sólo fue capaz de inducir apoptosis cuando se expresó desde el interior de células Molt-4 por transfección, y no cuando se añadió a las células desde el exterior (Zhang *et al.*, 1998). Estos resultados muestran que

SmcL accede a un pool intracelular de SM, y mimetiza la acción de las SMasas endógenas neutras durante la infección bacteriana, y sugieren que *smcL* y las SMasas neutras eucariotas podrían tener un origen evolutivo común que se refleja hoy día en la realización de una idéntica función reguladora de la vía SM-CER que desemboca en la muerte celular por apoptosis.

La apoptosis, en contrapunto a la necrosis, permite la eliminación de células individuales sin inducir una respuesta inflamatoria. La activación o prevención de apoptosis es crucial para la evolución de las infecciones bacterianas (Weinrauch *et al.*, 1999). Nosotros mostramos por primera vez la implicación de una fosfolipasa bacteriana en la inducción de apoptosis durante la infección celular. Para ello, SmcL debe acceder al citoplasma de la célula infectada, al igual que SipB de *Salmonella typhimurium* (Hersh *et al.*, 1999) e IpaB de *Shigella flexneri*, siendo la microinyección intracitoplásmica de IpaB suficiente para la inducción de apoptosis en macrófagos (Chen *et al.*, 1996). En nuestros experimentos hemos utilizado un mutante de *L. monocytogenes* que expresa *hly* para permitir el escape eficiente de la bacteria al citoplasma de la célula infectada. Hly, al igual que otras proteínas formadoras de poros, como la α -toxina de *S. aureus*, ha sido implicada en la inducción de apoptosis (Guzmán *et al.*, 1996). Se ha sugerido que estas toxinas se insertan en la membrana mitocondrial, permitiendo la salida de citocromo c al citoplasma celular y la consecuente activación de la caspasa-9, mediador clave en la muerte celular programada (Gao *et al.*, 2000). Siguiendo este modelo, las esfingomielinasas SmcL y la β -toxina podrían potenciar el efecto membranolítico de las toxinas formadoras de poros sobre la membrana mitocondrial, permitiendo una salida masiva de citocromo c, y un aumento de la capacidad de inducción de apoptosis por Hly de *Listeria* y la α -toxina de *S.aureus*. Esto está apoyado por nuestras observaciones, en las que el mutante de *L. monocytogenes* Δ *plcAB*, que expresa niveles silvestres de Hly, todavía conserva cierta capacidad de inducción de apoptosis. Esta acción se ve reforzada por SmcL, que actúa interfiriendo en la vía SM-CER, y podría, además, actuar a nivel de la membrana mitocondrial como coadyuvante de Hly. Se requerirán investigaciones complementarias para disecar la interferencia de las

fosfolipasas bacterianas y las proteínas membranoactivas en las vías de transducción de señales de la célula del hospedador y su contribución a la modulación del proceso de apoptosis.

En estos últimos años, una gran parte de las investigaciones en Patogénesis Bacteriana se han centrado en la apoptosis y los mecanismos por los cuales los microorganismos inducen o inhiben la apoptosis en las células del hospedador (Gao y Kwaik, 2000). Estas investigaciones están permitiendo desentrañar las estrechas relaciones que se han desarrollado en la interacción bacteria-hospedador, que están resultando ser más complejas y sutiles de lo que nunca se había podido imaginar. Igualmente, están contribuyendo de forma muy relevante al conocimiento de la fisiología celular más básica. Sirvan como ejemplos la descripción reciente de que macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* pueden morir por necrosis a través de un mecanismo dependiente de la caspasa 1, que hasta ahora se había relacionado exclusivamente con la muerte celular por apoptosis (Brennan y Cookson, 2000), o que la vía SM-CER está realmente implicada en la apoptosis, como mostramos aquí. Sin embargo, estas investigaciones han relegado a un segundo plano la cuestión inicial más fundamental: ¿Cuál es el significado de la apoptosis en la infección bacteriana? Son muy pocos los estudios que se han centrado en intentar resolver esta pregunta. Lo que parece claro, es que la respuesta apoptótica es específica de tejido, ya que bacterias como *Shigella* o *Salmonella* inducen apoptosis en macrófagos, pero no en células epiteliales, mientras que *Listeria* produce necrosis en macrófagos, pero apoptosis en hepatocitos y células dendríticas. Esto muestra que la apoptosis se induce específicamente en función de las particularidades patogénicas de cada bacteria, e indica que los microorganismos han desarrollado esta propiedad para promover su persistencia en el hospedador. En línea con esta idea, la DL₅₀ oral de *S. typhimurium* en ratones deficientes en la caspasa-1, en los que la capacidad apoptótica está muy reducida, es 1000 veces mayor que en ratones de tipo silvestre, lo que indica que la inducción de apoptosis es un "factor de virulencia" para *Salmonella* (Monack *et al.*, 2000). Por otra parte, otros modelos experimentales apuntan hacia la hipótesis de que la apoptosis es una respuesta celular dirigida a limitar la infección bacteriana. Es el caso de

la infección por *Mycobacterium*, en el que la apoptosis del macrófago hospedador inhibe la replicación intracelular de la bacteria (Fratuzzi *et al.*, 1997). En un estudio reciente, ratones deficientes en CD95, el ligando necesario para la apoptosis inducida por *Pseudomonas aeruginosa*, desarrollaron tras la inoculación intranasal de la bacteria una septicemia generalizada letal, mientras que los ratones silvestres sólo presentaron una neumonía local transitoria (Grassmé *et al.*, 2000). Por tanto, en este caso la apoptosis evita la diseminación de la bacteria por el organismo y permite el control de la infección por parte del hospedador. En el caso *Listeria*, hemos realizado experimentos preliminares que indican que SmcL también media la inducción de apoptosis *in vivo*, por lo que nuestros resultados parecen tener también relevancia durante la infección del hospedador. Actualmente estamos diseñando los experimentos que nos puedan indicar cuáles son las consecuencias de la inducción de apoptosis mediada por SmcL para el desarrollo de la infección natural por *Listeria*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y métodos de identificación y caracterización

Las cepas de *Listeria* utilizadas en este trabajo están recogidas en la tabla 5.1. El medio de cultivo utilizado para *Listeria* fue infusión de corazón cerebro (BHI BioMerieux o BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI), al que se añadió agar (BioMerieux) al 1,7% cuando se requirió medio sólido. Los medios se suplementaron con eritromicina (5 µg/ml) cuando las cepas de *Listeria* portaban los plásmidos pHPS9 o derivados y kanamicina (25 µg/ml) cuando presentaban el interposón ΩKm2.

Las cepas de *Escherichia coli* DH5α y MOSBlue (Amersham) se utilizaron para técnicas de clonaje molecular. El medio de cultivo empleado fue Luria-Bertani (LB, Biomerieux), suplementado con ampicilina (50 µg/ml) cuando contenían el plásmido pMOSBlue o eritromicina (300 µg/ml) si presentaban el plásmido pLSV1 o pHPS9. Para facilitar la selección de clones con inserto mediante α-complementación de la actividad β-galactosidasa se añadió al medio sólido IPTG (isopropil-β-D-galactopiranosido; Sigma) y X-Gal (5-bromo-4 cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido, Sigma), según las recomendaciones habituales (Ausubel *et al.*, 1987). Los antibióticos fueron suministrados por Sigma y se prepararon siguiendo las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989). Las incubaciones se llevaron a cabo en aerobiosis a 37°C y con agitación a 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 o mediante el sistema multisustrato API *Listeria* (BioMerieux).

5.2. Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados aparecen en la tabla 5.1.

5.3. Medición de la actividad SMasa

La actividad SMasa se determinó por dos métodos.

A.) Método no radiactivo: La actividad SMasa se determinó al inicio de la fase estacionaria de crecimiento a partir de sobrenadante de cultivo utilizando como sustrato el análogo cromogénico de la SM N- ω -trinitrofenilaminolaurilesfingosilfosforil colina (TNPAL-SM; Sigma), como fue descrito por Gatt *et al.* (1978).

La unidad de actividad SMasa se definió arbitrariamente como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento en la DO₃₃₀ en 0,01 tras 2h de incubación a 37°C.

B.) Método radiactivo: 10 μ l del sobrenadante de 5×10^7 u.f.c. de *L. monocytogenes* Δ plcAB(pHsmcL) incubadas 1h a 37°C y 5% CO₂ en RPMI (condiciones a las que se realizaron las infecciones de células MDBK) fueron sonicados y diluidos en 215 μ l de tampón a pH 5,0 (tampón acetato 10 mM+Triton X-100, 0,1%+ MgCl₂ 50mM) o pH 7,4 (PBS 10 mM+Triton X-100, 0,1%+MgCl₂ 50mM) con SM-[metil-colina-¹⁴C] a 100.000 dpm y aproximadamente 1 nmol/ensayo. Tras 2 horas de incubación en agitación a 37°C la reacción se paró 775 μ l de agua y 2,5 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Tras agitación y centrifugación a 1000 g, 750 ml de la fase superior acuosa con la [¹⁴C]-fosforilcolina fue colectada y analizada en un contador de centelleo.

5.4. Medición de la actividad hemolítica

La determinación semicuantitativa de la actividad hemolítica se realizó macroscópicamente por observación del halo de hemólisis alrededor del crecimiento bacteriano en placas de agar sangre de oveja al 5% (BioMerieux) cuando no se especifica lo contrario.

5.5. Medición de la actividad lecitinasas

Se realizó de forma semicuantitativa en función del halo de opacidad generado alrededor de las colonias en placas agar yema de huevo, que se prepararon añadiendo el 10% (v/v) de una yema de huevo en 100 ml de solución salina estéril a BHI agar estéril a 50°C.

5.6. Extracción de DNA cromosómico y Southern blot

La extracción de DNA cromosómico de *Listeria* se realizó por el método del CTAB (Ausubel *et al.*, 1987). Las bacterias fueron incubadas 18 h en BHI, diluidas 1:2 en medio fresco con glicina (Sigma) 5% (p/v) e incubadas durante 1h a 37°C. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación y lavadas con 1:5 del volumen de partida en tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8). Posteriormente se resuspendieron en el mismo volumen de TE sacarosa 7% (Panreac) y lisozima (3,5 mg/ml concentración final (c.f.), (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 1,5 horas. Tras la incubación se añadió EDTA (40 mM c.f.), SDS (1% c.f.) y proteinasa K (0,1 mg/ml c.f., Sigma) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación se añadieron NaCl (0,7 M c.f.) y solución CTAB (CTAB al 10% en 0,7 M NaCl) en una proporción 1:9 (v/v) y se incubó la mezcla durante 20 minutos a 65°C, tras lo cual se realizaron dos extracciones de fenol-cloroformo. EL DNA cromosómico se recuperó de la fase acuosa por precipitación con 0,7 volúmenes de isopropanol (Sigma) y se lavó con etanol 70% (Panreac) para resuspenderlo en H₂O bidestilada, conservándose finalmente a 4°C hasta su utilización.

Southern blots se realizaron con DNA digerido con los enzimas de restricción requeridos, tras lo que se sometió a electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 0,8% durante 18 horas. El DNA fue transferido a una membrana de Nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) por generación de vacío con un Vacuum Blotter (BioRad) bajo una presión negativa de 5 mm Hg. Para ello se utilizaron consecutivamente, y retirando la solución anterior con la ayuda de papel secante, una solución de fragmentación (0,25 M HCl) durante 10 minutos, una solución de desnaturalización (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) durante

15 minutos, una solución de neutralización (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris HCl (pH 7,2), 1 mM EDTA) durante 10 minutos y SSC 20× (NaCl 3M, C₆H₅O₇ 0,3 M, pH 7,0) durante 90 minutos. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente y el DNA se fijó a ella por radiación ultravioleta con un Crosslinker (Spectronics Corporation) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.7. Extracción de RNA total y Northern blot

RNA ($\approx 10 \mu\text{g}$) suspendido en H₂O bidestilada tratada con DEPC se añadió a 19,4 μl de tampón (2,5 μg de 10× MOPS, 4,37 μl de formaldehído al 37%, 12,5 μl formamida), se desnaturalizó por calentamiento a 65°C durante 10 minutos y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% que contenía 1,1% formaldehído en el tampón de migración (0,1 M MOPS, pH 7,0, AcNa 40 mM, EDTA (pH, 8) 5 mM y 2,2 M formamida) diluido 1:5 (v/v) (Ausubel *et al.*, 1987). El RNA se transfirió a membranas y se hibridó como se describió anteriormente (Ripio *et al.*, 1998).

5.8. Sondas de DNA e hibridación de ácidos nucleicos

Las sondas utilizadas fueron fragmentos de DNA amplificados por PCR y purificados a partir de geles de agarosa al 0,8% con Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Las sondas se marcaron con α -³²P-dCTP (Amersham) con el sistema comercial Nick Translation (Boehringer Mannheim).

Para la hibridación DNA-DNA se emplearon condiciones de alta y baja especificidad (estas últimas presentadas entre paréntesis y en cursiva). Las membranas se saturaron durante toda la noche a 42°C (37°C) en una solución de prehibridación (formamida desionizada al 50% (30%), SSC 5×, solución Denhardt 5×, tampón sodio-fosfato 20 mM, pH 6,8, 0,1 % SDS y 20 mg de esperma de salmón sonificado desnaturalizado por calor). La hibridación se llevó a cabo en una solución que contenía tampón de hibridación (formamida desionizada al 50% (30%), SSC 5×, solución Denhardt 2×, tampón sodio-fosfato 20 mM, pH 6,8, 0,1 % SDS y 20 mg de esperma de salmón sonificado

desnaturalizado por calor) y la sonda marcada y desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente (30 minutos a 37°C) con una solución de SSC 2×, SDS 0,1% y dos lavados a 65°C (un lavado a 42°C) durante 30 minutos con una solución de SSC 0,1×, SDS 0,1% (SSC 1×, SDS 0,1%). Finalmente, las membranas fueron brevemente lavadas con SSC 2× a temperatura ambiente para su posterior revelado.

5.9. Hibridación en colonias

Las colonias bacterianas fueron transferidas a una membrana de Nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) y sometidas a lisis alcalina y desnaturalización del DNA, como se ha descrito previamente (Ripio *et al.*, 1996). El DNA fijado a la membrana por radiación ultravioleta se hibridó con sondas de DNA marcadas con digoxigenina 11-dUTP (DIG) utilizando DIG-High Prime Kit (Boehringer Mannheim) a alta especificidad. Los lavados y el revelado colorimétrico se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.10. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

Las DNA polimerasas utilizadas para las reacciones de PCR fueron BioTaq (Ecogen), DyNa (Biolabs, New England) y BioTaq (Biotools). En los casos en los que se requería un bajo número de errores durante la fase de elongación (e.g. secuenciación, complementación) se utilizó la DNA polimerasa Expand High Fidelity PCR (Boehringer Mannheim) siguiendo en todos los casos las instrucciones del fabricante.

Los termocicladores MiniCycler, PTC-100 (ambos M.J. Research, Inc.) y Mastercycler Gradient (Eppendorf) fueron utilizados para las reacciones con los siguientes parámetros generales. Desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de amplificación consistentes en i) desnaturalización durante 30-60 segundos a 94°C, ii) hibridación de oligonucleótidos durante 30-60 segundos a la temperatura adecuada, calculada de acuerdo con la fórmula general

$T=[2 \times (A+T)+3 \times (G+C)]-5$, y iii) elongación a 72°C (excepto en la amplificación de fragmentos de tamaño superior a 2 kb) durante 30-240 segundos en función del tamaño del fragmento a amplificar. Finalmente se procedió a una elongación final de 10 minutos a 72°C, 68°C para fragmentos de tamaño superior a 2 kb.

5.11. Paseo cromosómico (Genome walking) mediante PCR inversa

El paseo cromosómico o genome walking permite, mediante PCR, amplificar fragmentos de DNA cuya secuencia se desconoce pero que flanquean regiones de DNA de secuencia conocida. Aproximadamente 10 µg de DNA cromosómico fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Posteriormente se realizó una extracción con fenol-cloroformo y precipitación. El pellet de DNA digerido fue resuspendiendo en 30 unidades de T4 DNA ligasa (Amersham) en 100 µl de tampón 1× v.f. e incubado a 16°C durante 24-48 horas. La mezcla fue finalmente precipitada y el DNA resuspendido en 30 µl de H₂O destilada estéril. Para las reacciones de PCR se utilizaron 2 µl de esta suspensión, mientras que el volumen restante se congeló a -20°C para una posterior utilización.

5.12. Secuenciación de DNA y análisis

Las reacciones de secuenciación se realizaron en las dos hebras de la cadenas de DNA a partir de productos de PCR o plásmidos purificados con el secuenciador automático de Applied Biosystems 377 (Perkin-Elmer) en el Servicio de Secuenciación Automatizada de DNA de la Universidad Complutense de Madrid. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software DNA Strider 1.0. y Wisconsin package, versión 9.0 software para UNIX (GCG) del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid. Las búsquedas de homología se realizaron con FASTA, los alineamientos con PILEUP y el grado de identidad/similitud con BESTFIT.

5.13. Análisis Filogenéticos

Los análisis filogenéticos se generaron con dos programas. El programa PAUP vs. beta 4d59 a la 4d64, gentilmente cedido por David Swofford y vs. 4, permitió el análisis de las SMasas bacterianas. Las primeras versiones de PAUP sólo trabajaban bajo modelos de parsimonia, pero PAUP v4 ofrece ya la posibilidad de seguir criterios de parsimonia, distancias, o verosimilitud a la hora de realizar las reconstrucciones filogenéticas. Para la realización este trabajo se utilizaron las tres opciones. Todas las hipótesis filogenéticas generadas con PAUP se obtuvieron después de búsqueda heurística, por sucesivas reconstrucciones de los árboles mediante bisección y reconexión (TBR), de las hipótesis parciales generadas. El programa ClustalW fue utilizado para analizar la superfamilia de las SMasas. El método utilizado fue el NJ (Neighbour Joining) de Saitou y Nei. Primero se calcularon las distancias (porcentaje de divergencia) entre todas las parejas que forman el alineamiento, aplicando posteriormente el método NJ a la matriz de distancias. Los cálculos estadísticos de soporte por *bootstrap* de las topologías obtenidas no dieron lugar en ninguno de los casos a valores superiores a 500.

5.14. Clonaje directo de productos de PCR

El clonaje directo de productos de PCR se realizó con pMOS*Blue* T-vector kit (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante. La selección de los clones con el fragmento deseado se llevó a cabo mediante amplificación a partir de colonias lisadas en H₂O bidestilada estéril durante 5 minutos a 100°C o minipreparaciones de DNA plasmídico.

5.15. Construcción del mutante *smcL::ΩKm*

La construcción del plásmido recombinogénico se ilustra en la figura 5.1. Primeramente, el plásmido pM*smcL*340 (ver Tabla 5.1.) se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos ESMC-1 (5'-TAACTGATATCTCCCAATTACGGGT-3') y ESMC-2 (5'-GTTGGGATATCAAACGGAAGGAAA-3'), que contienen una diana de corte

para el enzima de restricción *EcoRV* en su extremo 5'. El fragmento resultante se digirió con *EcoRV*, y el fragmento Ω Km2 se extrajo del pBR322 utilizando *SmaI*. Los dos fragmentos se purificaron y ligaron, dando lugar a pMsmcL340::Km. El inserto de este plásmido se transfirió a pLSV1 utilizando las zonas de corte *BamHI* y *EcoRI* para dar lugar al vector de mutagénesis pLsmcL340::Km. Este plásmido se introdujo en *L. ivanovii* ATCC 19119 como se describe posteriormente. Los electrotransformantes se seleccionaron en BHI agar conteniendo kanamicina. Se seleccionó uno de los clones y se creció en BHI a 37°C hasta la mitad de la fase exponencial, e incubado a partir de ahí a 42°C toda la noche para enriquecer el número de clones en los que se había insertado el plásmido por recombinación homóloga. Alícuotas del cultivo se incubaron en BHI agar a 42°C durante 48 horas. Las colonias se chequearon por PCR para identificar aquellas en las que pLsmcL:: Ω Km se había integrado por recombinación simple en el gen *smcL*. Se seleccionó un clon, que fue sometido a subcultivos en BHI con kanamicina dos veces diarias durante una semana a 37°C. Después se analizaron los clones resultantes por resistencia a kanamicina y sensibilidad a eritromicina, PCR y Southern blot, para confirmar la presencia única del interposón Ω Km2 en *smcL* y la ausencia del plásmido pLSV1, dando lugar al clon que fue denominado *smcL*:: Ω Km.

5.16. Preparación y construcción del plásmido de complementación pHsmcL

El gen *smcL* incluyendo las regiones intergénicas 5' y 3' fue amplificado a partir de DNA cromosómico de la cepa ATCC 19119 por PCR con los oligonucleótidos SMCL-1 (5'-CTTTGTTTCCAAACTCCATGT-3') y SMCL-2 (5'-CAACCTCAATAGCCAAGTA-3'). El fragmento resultante de 1,4 kb contenía todas las posibles señales de transcripción y traducción de *smcL* de *L. ivanovii*. El fragmento fue insertado en el plásmido bifuncional pHPS9 bajo el control de P59, un promotor constitutivo de la bacteria gram-positiva *Lactococcus cremoris* (Haima *et al.*, 1990), dando lugar a pHsmcL.

5.17. Introducción de plásmidos en *Listeria* por electroporación

La transformación de *Listeria* con plásmidos se realizó básicamente como se ha descrito anteriormente (Ripio *et al.*, 1996). Brevemente, las bacterias electrocompetentes se prepararon a partir de un cultivo en BHI con sacarosa (Panreac) 0,5 M c.f. a 37°C en agitación fuerte hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,2. Se añadió penicilina (10 µg/ml c.f.) y se incubó durante 2 horas en las mismas condiciones. Las bacterias fueron recogidas por centrifugación y lavadas 4 veces con una solución de tampón Hepes (Fluka), sacarosa 0,5 M, pH 7,0. Se concentraron 400 veces resuspendiéndolas finalmente en el mismo tampón con 10% de glicerol y congeladas a -20°C hasta su utilización. La electroporación se llevó a cabo en cubetas de 0,2 cm (Genotronics) a 400Ω, 10 kV/cm y 25 µF utilizando un Pulser-Controller y Gene-Pulser (BioRad). Tras la electroporación, las bacterias fueron incubadas en BHI durante 2 horas y sembradas en placas con los antibióticos apropiados en cada caso.

5.18. Otras técnicas genéticas

Las cepas de *E. coli* fueron transformadas mediante choque térmico de las bacterias tratadas con CaCl₂. Los fragmentos de DNA fueron purificados a partir de geles de agarosa 0,8 % con Qiaquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las extracciones rutinarias de plásmidos a partir de *E. coli* se realizaron por lisis alcalina, protocolo al que se le añadió una incubación con lisozima durante 2 horas a 37°C durante la fase de lisis en el caso de *Listeria*. La precipitación de DNA se realizó con Pellet Paint Co-precipitant (Novagen). La purificación de plásmidos se realizó con el sistema comercial Plasmid Purification Kit (Qiagen).

5.19. Curvas de crecimiento

Se prepararon precultivos de 18 horas con el que se inocularon 100 ml de BHI en matraces Erlenmeyer de 250 ml a una dilución 100:1. La DO₆₀₀ fue determinada en los momentos requeridos con un espectrofotómetro Hitachi

150-20. Se realizaron las diluciones adecuadas en cada momento para que las mediciones espectrofotométricas no superaran la unidad.

5.20. Ensayos de virulencia en el modelo murino

Ratones hembra BALB/c o Swiss CD1 (Harlán Ibérica S.A.) libres de patógenos específicos de 22-24 gramos de peso se mantuvieron en condiciones de aislamiento con comida estéril y agua *ad libitum*. Para la DL₅₀, grupos de 5 ratones fueron inoculados por vía intravenosa en la vena lateral caudal con dosis de 1×10^5 a 1×10^8 bacterias en 0,2 ml de PBS. La DL₅₀ se calculó por el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938), y los datos obtenidos fueron analizados por el U-test de Mann Whitney. La limitación del uso de la DL₅₀ con *L. ivanovii* es que dosis similares pueden dar lugar a un 100% de mortalidad o un 100% de viabilidad después de una observación de 7 días. Por tanto hemos usado una DL₅₀ ‘aguda’, en la que la mortalidad se refiere a la recogida de datos en el día 3 postinoculación. Este punto discrimina de forma óptima las determinaciones de DL₅₀ con *L. ivanovii*.

Para las curvas de proliferación en hígado y bazo, los ratones fueron inoculados con 1×10^4 bacterias. Grupos de 3 ratones fueron sacrificados a partir del día 0 de inoculación, y el bazo e hígado extraídos en condiciones de esterilidad. Los órganos fueron homogeneizados en 5 ml de PBS con ayuda de un homogeinizador de palas y diluciones seriadas plaqueadas por duplicado en BHI-agar para determinar el número de bacterias viables por órgano.

5.21. Ensayos de invasión y proliferación en cultivos celulares

Para los ensayos de invasión y proliferación intracelular se utilizaron las líneas celulares MDCK, MDBK y J774A.1 en medio RPMI 1640 (Gibco) con 10% de suero fetal bovino inactivado. 24 horas antes de la infección, las células fueron cultivadas a 37°C y 5% CO₂ en placas de 24 pocillos (Costar) para tener un 70% de confluencia al día siguiente. Las monocapas fueron lavadas con PBS estéril (Dulbecco's) e infectadas con el inóculo bacteriano a una MOI (multiplicidad de infección) de 50:1 (10:1 en el caso de células J774). El inóculo

se obtuvo de un cultivo bacteriano en BHI lavado 3 veces con PBS, alicuotado en PBS 20% glicerol para su congelación a -80°C y diluido oportunamente para obtener la MOI requerida. Las placas infectadas fueron centrifugadas a 500 g durante 5 minutos e incubadas de 30 minutos a 1 hora (*L. ivanovii* y *L. monocytogenes* tipo silvestre, respectivamente) o 2 horas (PKP1, ver Tabla 5.1.) a 37°C . Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS e incubados con RPMI-suero conteniendo $100\ \mu\text{g/ml}$ de gentamicina para matar a las bacterias extracelulares. Muestras de células infectadas fueron lisadas añadiendo $100\ \mu\text{l}$ de Triton X-100 (Sigma) 1% en PBS por pocillo tras incubación en presencia de gentamicina a 1 (bacterias internalizadas), 2, 5, y 7 horas. Los homogenados fueron recogidos con $400\ \mu\text{l}$ de PBS, y las bacterias intracelulares viables fueron determinadas por plaqueo de diluciones seriadas en PBS. La cinética de la población intracelular se determinó utilizando un 'coeficiente de crecimiento intracelular' (IGC), resultante de la aplicación de la fórmula $\text{IGC}=(\text{ib}_F-\text{ib}_0)/\text{ib}_0$, donde ib_F es el número de bacterias determinadas en cada punto, e ib_0 el número de bacterias internalizadas. Valores de IGC positivos indican crecimiento intracelular, mientras que valores de IGC negativos reflejan un descenso en la población bacteriana intracelular.

5.22 Microscopía electrónica

Células MDBK semiconfluentes fueron infectadas como se explica en la sección anterior, con la excepción de que se utilizó una MOI 100 veces superior, con el fin de facilitar la detección de bacterias intracelulares. Células infectadas fueron incubadas durante 7 horas, lavadas 3 veces con PBS y fijadas durante 30 minutos con glutaraldehído 2,5 % en PBS. Las células se rascaron suavemente de los pocillos y fueron centrifugadas a $1000 \times g$ durante 30 minutos a temperatura ambiente. El pellet se lavó una vez con PBS antes de la post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% durante 30 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con H_2O destilada, deshidratadas en etanol, tratadas con óxido de propileno e incluidas en EPON 812. Se prepararon secciones ultrafinas (70 nm) con un microtomo Reichert-Jung Ultracut-E sobre rejillas de 200 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo al 2% durante 20 minutos y

solución de Reynold's durante 5 minutos. Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 902 a 80 kV. Se examinaron secciones no consecutivas (100 μm) de dos experimentos distintos, y se contaron bacterias en el interior de vacuolas o libres en el citoplasma celular.

5.23. Medición de los niveles de SM y fosfatidilcolina

Para la determinación de los niveles de SM y fosfatidilcolina durante la infección bacteriana, las células fueron incubadas previamente a la infección en placas de 6 pocillos (Costar) durante 48 horas en presencia de 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [metil- ^3H] colina. El medio se reemplazó 2 horas antes de la infección por medio fresco no radiactivo. Las células se infectaron a una MOI de 50:1 como se indica en el apartado anterior, y las células rascadas y congeladas a -80°C para el posterior análisis.

La extracción lipídica comenzó con la resuspensión de las células congeladas en 600 μl de H_2O y una breve sonicación en frío. Se conservaron 100 μl para la dosificación de proteínas por el método del ácido bicinónico (Smith *et al.*, 1985). A los 500 μl restantes se les añadió 2,5 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v). La mezcla se centrifugó a 1.000 g durante 15 minutos (Folch 1957) y la fase inferior fue lavada con una fase superior sintética, cloroformo/metanol/agua (3:48/47 v/v/v) para eliminar la radiactividad no incorporada a los lípidos. La fase inferior se evaporó con N_2 .

Los residuos lipídicos fueron resuspendidos en 250 μl de cloroformo y 250 μl de sosa en metanol 0,5 M. Tras una incubación a 37°C durante 2 horas se paró la metanolización añadiendo por este orden 850 μl de cloroformo, 250 μl de HCl metanólico (0,5 M), 430 μl de H_2O y 500 μl de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Tras agitación y centrifugación a 1.000 g durante 15 minutos, la fase superior, que contenía la glicerofosfocolina marcada, fue analizada en un contador de centelleo. La fase inferior con la SM radiactiva fue evaporada bajo N_2 , lavada dos veces con una fase superior sintética y analizada igualmente en un contador de centelleo (Andrieu, 1994).

5.24. Medición de los niveles de CER y DAG

Se realizaron infecciones celulares en placas de 6 pocillos sin marcaje radiactivo que se sometieron a extracciones lipídicas como se indica en la sección anterior. Los extractos lipídicos fueron resuspendidos en 40 μ l de solución detergente (di-oleil-fosfatidil-glicerol/octil- β -glucósido) e incubadas en presencia de DAG quinasa de *E. coli* (Calbiochem) (que fosforila la CER a CER-1-fosfato) y de ATP γ P³² (ICN) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción enzimática se frenó añadiendo 2 ml de cloroformo, 2 ml de metanol y 1,7 ml de H₂O. Tras agitación fuerte y centrifugación a 1.000 g, la fase inferior que contenía el ácido fosfatídico y la CER-1-fosfato, fue evaporada con N₂ y resuspendida en 80 μ l de cloroformo-metanol (2:1 v/v). 20 μ l de este extracto fueron depositados en una placa de sílice y sometidos a migración en un sistema cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua (50:20:15:10:5 v/v/v/v/v). La placa se expuso a una película autorradiográfica durante toda la noche. Tras el revelado, las bandas correspondientes a la CER-1-fosfato y al ácido fosfatídico fueron rascadas y analizadas en un contador de centelleo (van Veldhoven, 1992).

5.25. Microscopía de fluorescencia

Células MDBK fueron infectadas en placas de 24 pocillos como se describe anteriormente. A los tiempos requeridos, se añadió ioduro de propidio a 2 μ g/ml c.f. (marcador de células muertas) y Hoechst 33348 a 2 μ g/ml c.f. (marcador de DNA) directamente al pocillo. Tras 2 minutos se observaron los pocillos en un microscopio de fluorescencia (Leitz Dialux 20) y se tomaron imágenes con una cámara electrónica (Princeton Instruments) que fueron procesadas utilizando METAMORPH software (Universal Imaging Corporation).

5.26. Sandwich ELISA para la cuantificación de apoptosis y necrosis

Para la cuantificación de células apoptóticas y necróticas se utilizó el sistema comercial Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Boehringer Mannheim), basado en la detección de oligonucleosomas en el sobrenadante del cultivo celular (necrosis) o en el interior de las células eucariotas (apoptosis), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.27. Citometría de flujo

La viabilidad celular se cuantificó mediante marcaje IP y citometría de flujo. Las células adherentes fueron tripsinizadas, lavadas dos veces con PBS 1× como se indica anteriormente y teñidas con 2 µg/ml de IP durante 2 minutos. El análisis se llevó a cabo en un citómetro Epics Elite EPS (Costar) bajo el canal rojo (630/20 nm). Como controles para establecer los parámetros de compensación se utilizaron células a las que no se añadió IP y células que se trataron en las mismas condiciones sin haber sido infectadas.

6. CONCLUSIONES

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

Primera. Se ha identificado y caracterizado el papel en la patogénesis de un nuevo factor alterante de las membranas de *Listeria*, la esfingomielinasa SmcL. Este enzima es producido específicamente por *L. ivanovii* dentro del género *Listeria* y es uno de los cuatro miembros que forman actualmente la familia de esfingomielinasas bacterianas, cuyo prototipo es la β -toxina de *S. aureus*.

Segunda. Nuestras evidencias preliminares sugieren que SmcL podría jugar un importante papel en el tropismo de *L. ivanovii* hacia los rumiantes. De hecho, su gen codificante forma parte de una isla de patogenicidad de 22 kb denominada LIPI-2, también específica de *L. ivanovii* y que incluye a un amplio número de genes de internalinas, factores de virulencia que han sido implicados en el tropismo patogénico de *Listeria*.

Tercera. SmcL es responsable de las características hemolíticas que diferencian a *L. ivanovii* del resto de las listerias hemolíticas, v.g. una intensa actividad lítica bizonal y la reacción CAMP con *Rhodococcus equi* en forma de pala. La actividad hemolítica de SmcL se manifiesta en eritrocitos de oveja, cuyas membranas son ricas en esfingomielina, pero no en eritrocitos de caballo, con un contenido mucho menor en esfingomielina, lo que aporta indicaciones sobre el papel de este enzima en la adaptación a de *L. ivanovii* a los rumiantes.

Cuarta. SmcL promueve la proliferación intracelular de *L. ivanovii*, contribuyendo junto a los otros factores membranolíticos de *Listeria* (Hly, PlcA, PlcB) a la disrupción de la vacuola fagocítica y a la correspondiente liberación de las bacterias al citoplasma de la célula hospedadora.

Quinta. Además de su efecto mecánico sobre las membranas del fagosoma, SmcL produce durante la infección intracelular una elevación de los niveles de ceramida a partir de la esfingomielina presente en la membrana de la célula

eucariota, con lo cual puede interferir con las vías de señalización moduladas por dicho segundo mensajero lipídico.

Sexta. SmcL es un homólogo estructural y funcional de las esfingomielinasas neutras eucariotas, implicadas en el control de importantes procesos celulares tales como apoptosis y la diferenciación y proliferación celular. En consonancia con este hecho, nuestros resultados indican que la producción de ceramida por parte de SmcL requiere la previa disrupción de la vacuola fagocítica y el escape de la bacteria del ambiente ácido del fagosoma.

Séptima. La generación de ceramida por parte de SmcL durante la infección intracelular se asocia con un aumento de la muerte de la célula hospedadora por apoptosis. Este resultado aporta nuevas pruebas que consolidan el papel de la ceramida como importante molécula implicada en la señalización en la respuesta apoptótica de la célula eucariota.

Octava. SmcL constituye un nuevo ejemplo de que los microorganismos patógenos intracelulares utilizan la estrategia de adoptar mecanismos moleculares que mimetizan el efecto de sistemas presentes en la célula eucariota, con el fin de subvertir su fisiología y adaptarla a los peculiares requerimientos de la vida parásita en el interior de la célula.

7. BIBLIOGRAFÍA

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.

Alouf, J.E. 1999. Introduction to the family of the structurally related cholesterol-binding cytolysins («sulfhydryl-activated» toxins), pp. 443-456. *In* J. E. Alouf and J. H. Freer (eds.). The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, 2nd edit. Academic Press, London – San Diego.

Álvarez-Domínguez, C., R. Roberts, and P.D. Stahl. (1997). Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J. Cell Sci.* 110:731-743.

Álvarez-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.

Allan, D. (1996) Mapping the lipid distribution in the membranes of BHK cells (mini-review). *Mol. Membr. Biol.* 13:81-84.

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, Artcraft Printers.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moor, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.

Awad, M.M., Bryant, A.E., Stevens, D.L., Rood, J.I. (1995), Virulence studies on chromosomal α -toxin and θ -toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of α -toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Mol. Microbiol.* 15: 191-202

Barsig, J., Kaufmann, S.H.E. (1997). The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* 65: 4075-4081.

Beauregard, K.E., K.D. Lee, R.J. Collier, and J.A. Swanson. (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 186:1159-1163.

Beckerle, M.C. (1998). Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*. *Cell* 95:741-748.

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.

- Bierne, H., Dramsi, S., Gratacap, M.P., Randriamampita, C., Carpenter, G., Payrastre, B., Cossart, P. (2000). The invasion protein InlB from *Listeria monocytogenes* activates PLC-gamma from PI3-kinase. *Cell. Microbiol.* 2: 465-476
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P.D., Jacquet, C., Piffaretti, J.-C. (1992) *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:69-73.
- Bramley, A.J., Patel, A.H., O'Reilly, M., Foster, R., Foster, T.J. (1989). Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect. Immun.* 57: 2489-2494.
- Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart. (2000). gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 19:1458-1466.
- Braun, L., F. Nato, B. Payrastre, J.-C. Mazié, and P. Cossart. (1999). The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol. Microbiol.* 34:10-23.
- Braun, L., H. Ohayon, and P. Cossart. (1998). The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol. Microbiol.* 27:1077-1087.
- Braun, L., S. Dramsi, P. Dehoux, H. Bierne, G. Lindahl, and P. Cossart. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* 25:285-294.
- Brehm K., J. Kreft, M.-T. Ripio, and J.-A. Vazquez-Boland. 1996. Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. *Microbiol. SEM* 12:219-236.
- Brehm, K., M.-T. Ripio, J. Kreft, and J.-A. Vázquez-Boland. 1999. The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by β -glucosides. *J. Bacteriol.* 181:5024-5032.
- Brennan, M. and Cookson, B.T. 2000. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 38: 31-40.
- Burn, C.G. (1935). Characteristics of a new species of the genus *Listerella* obtained from human sources. *J. Bacteriol.* 30: 573-591.
- Burrell, D.H. (1983) Caseous lymphadenitis vaccine, *NSW Vet. Proc.* 19: 53-57
- Cameron, L.A., M.J. Footer, A. van Oudenaarden, and J.A. Theriot. (1999). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:4908-4913.

- Camilli, A., H. Goldfine, and D.A. Portnoy. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. 1991. *J. Exp. Med.* 173:751-754
- Camilli, A., L.G. Tilney, and D.A. Portnoy. (1993). Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 8:143-157.
- Chico-Calero, I., M. Suárez, B. González-Zorn, J. Slaghuis, W. Goebel, and J.A. Vázquez-Boland. (2001). Efficient intracellular replication of *Listeria monocytogenes* requires Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase. (enviado).
- Cifrian, E., Guidry, A.J., Bramley, A.J., Norcross, N.L., Bastida-Corcuera, F.D., Marquard, W.W. (1996) Effect of staphylococcal toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 48:187-198.
- Collins, M. D., S. Wallbanks, D. J. Lane, J. Shah, R. Nietupsdi, J. Smida, M. Dorsch, And E. Stackebrandt. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 240-246.
- Cooper, R. and Dennis, S.M. (1978). Further characterization of *Listeria monocytogenes* serotype 5. *Can. J. Microbiol.* 24: 598-599.
- Cossart, P. (1995). Actin-based bacterial motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:94-101.
- Cossart, P. (2001). Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 9: 105-107.
- 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.
- Cossart, P., Boquet, P., Normark, S., Rappuoli, R. (1996). Cellular Microbiology emerging. *Science.* 271: 315-316.
- Cummins, A.J., Fielding, A.K., and McLauchlin, J. (1994). *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J. Infect.* 28: 89-91.
- Chakraborty, T. (1996). The molecular mechanisms of actin-based intracellular motility by *Listeria monocytogenes*. *Microbiol. SEM* 12:237-244.
- Chen, Y., Smith, M. R., and Zychlinski, A. (1996). A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by directly binding ICE. *EMBO J* 15, 3853-3860.
- Christie, R., Atkins, N.E. and Munch-Petersen. (1944). A note on lytic phenomenon shown by Group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 22: 197-200.

- Dabiri, G.A., J.M. Sanger, D.A. Portnoy, and F.S. Southwick. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6068-6072.
- Decatur, A.L., and D.A. Portnoy DA. (2000). A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* 290:992-995.
- Derewenda, Z.S., Martin, T.W. (1998), Structure of the gangrene alpha-toxin: the beauty in the beast. *Nat. Struct. Biol.* 5: 659-662.
- Dhar, G., K.F. Faull, and O. Schneewind. (2000). Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochem.* 39:3725-3733.
- Dietrich G., A. Bubert, I. Gentschev, Z. Sokolovic, A. Simm, A. Catic, S.H. E. Kaufmann, J. Hess, A.A. Szalay, and W. Goebel. (1998). Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nature Biotech.* 16:181-185.
- Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wächter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty. (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11: 1981-1990.
- Domann, E., Wehland, J., Niebuhr, K., Haffner, C., Leimeister-Wächter, M., Chakraborty, T. (1993) Detection of a *prfA*-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in the mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect. Immun.* 61:3073-3075.
- Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Dargi, A., Nichterlein, T., Wehland, J., 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.
- Dramsı, S., and P. Cossart. (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:137-166.
- Dramsı, 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.
- Drevets, D.A. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J. Immunol.* 158:5305-5313.

- Drevets, D.A. (1998). *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect. Immun.* 66:232-238.
- Drevets, D.A. (1999). Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect. Immun.* 67:3512-3517.
- Drevets, D.A., Jelinek, T.A., Freitag, N.A. (2001). *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. *Infect. Immun.* 69: 1344-50.
- Elischerova, K., Cupkova, E., Uurgeova, E., Lysy, J. , Sesevickova, A. (1990). Isolation of *Listeria ivanovii* in Slovakia . *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 39:228-236.
- Engelbrecht, F., Chun, S.-K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., Sokolovich, 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.
- Engelbrecht, F., Dickneite, C., Lampidis, R., Götz, M., DasGupta, U., Goebel, W. (1998a) Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (inlC) of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Mol. Gen. Genet.* 257:186-197.
- Engelbrecht, F., Domínguez-Bernal, G., Hess, J., Dickneite, C., Greiffenberg, L., Lampidis, R., Raffelsbauer, D., Daniels, J.J.D., Kreft, J., Kaufmann, S.H.E., Vázquez-Boland, J.A., Goebel, W. (1998b) 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.
- Exton, J.H. (1990). Signalling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 265: 1-4.
- Falkow, S., Cellular Microbiology is launched. (1999). *Cell. Microbiol.* 1: 3-6
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.
- Fehrenbach, F.J., Jürgens, D. (1991) Cooperative membrane-active (lytic) processes. In Sourcebook of bacterial protein toxins. Alouf, J.E., Freer, J.H. (eds.). London: Academic Press, pp. 187-213.
- Finlay, B., and Ruschkowski, S. (1991). Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* 99: 283-296.
- Fischetti, V.A., V. Pancholi, and O. Schneewind. (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface protein from gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* 4:1603-1605.

- Fratazzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C. and Remold, H.G. 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4 infected macrophages prevents the micobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 158: 4320-4327.
- 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.
- Gaillard, J.-L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55:2822-2829.
- Galán, J.E. (2000). Alternative strategies for becoming an insider: lessons from the bacterial world. *Cell.* 103: 363-366.
- Gao, L.-G., and Abu Kwaik, Y. (2000). The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8, 306-313.
- Gatt, S., Dinur, T., Barenholz, Y. (1978) A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta* 530:503-507.
- Gedde, M.M., D.E. Higgins, L.G. Tilney, and D.A. Portnoy. (2000). Role of listeriolysin o in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68:999-1003.
- 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.
- Geoffroy, C., Ravenau, J., Beretti, J.-L., Lecroisey, A., Vázquez-Boland, J.-A., Alouf, J.E., Berche, P. (1991) Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 59:2382-2388.
- 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.
- Gilmore, M.S., Cruz-Rodz, A.L., Leimeister-Wächter, M., Kreft, J., Goebel, W. (1989) A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *J. Bacteriol.* 171:744-753.
- 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.
- Gill, D.A. (1937). Ovine bacterial encephalitis (circling disease) and the bacterial genus *Listerella*. *Australian Vet. J.* 13: 46-56.

- Goebel, W., Kreft, J. (1997) Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiol.* 5:86-87.
- 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, 510-523.
- 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.
- Gouin, E., Mengaud, J., Cossart, P. (1994) The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect. Immun.* 62:3550-3553.
- Grassmé, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang, F., and Meyer, T. F. (1997). Acidic Sphingomyelinase Mediates Entry of *N. gonorrhoeae* into Nonphagocytic Cells. *Cell* 91, 605-615.
- Grassmé, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kürthy, G., Lang, F., Weller, M. and Gulbins, E. (2000). CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 290: 527-530.
- Gray, M.L. and Killinger, A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listerial infections. *Bact. Rev.* 30: 309-382.
- 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: InIB-Dependent Invasion, Long-Term Intracellular Growth, and Spread from Macrophages to Endothelial Cells. *Infect. Immun.* 66: 5260-5267.
- 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.
- Guilloard, I., Garnier, T., Cole, S.T., Use of site-directed mutagenesis to probe structure-function relationship of alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 64: 2440-2444.
- Guzmán, C. A., E. Domann, M. Rhode, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty, and K. N. Timmis. (1996). Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 20:119-126.

- 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.
- Haima, P., van Sinderen, D., Schotting, H., Bron, S., Venema, G. (1990) Development of a β -galactosidase β -complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* 86:63-69.
- Hanawa, T., T. Yamamoto, and S. Kamiya. (1995). *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. *Infect. Immun.* 63:4595-4599.
- Hannun, Y. A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274, 273-278.
- Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., and Kuhn, M. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF- κ B (RelA/p59) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I κ B- α and I κ B- β degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9394-9399.
- Hauf, N., W. Goebel, F. Fiedler, and M. Kuhn. (1999). *Listeria monocytogenes* infection of Caco-2 epithelial cells induces activation of transcription factor NF- κ B/Rel-like DNA binding activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 178:117-122.
- Hedlund, M., Svensson, M., Nilsson, A., Rui-Dong, D., and Svanborg, C. (1996). Role of the Ceramide-signaling Pathway in Cytokine Responses to P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Exp Med* 183, 1037-1044.
- Hersh, D., Monack, D., Smith, M., Ghori, N., Falkow, S., and Zychlinsky, A. (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2396-2401.
- Hodgson, A.L., Corner, L.A., Rothel, J.S., Radford, A.J. (1992). Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.* 60: 2900-2905.
- Hof, H., Hefner, P. (1988) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* 16 (suppl. 2):S141-S144.
- Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., and Stoffel, W. (2000). Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5895-5900.
- Hummel, R., Witte, W., Kemmer, G. (1976). Zur Frage der wechselseitigen Übertragung von *Staphylococcus aureus* zwischen Mensch und Rind und der Milieuadaptation der Hämolyse und Fibrinolysebildung. *Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig.* 32: 287-298

- Ireton, K., and Cossart, P. (1997). Host-Pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Ann. Rev. Genet.* 31:113-38.
- Ireton, K. and Cossart, P. (1998). Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 276-283.
- Ireton, K., B. Payraastre, and P. Cossart. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274:17025-17032.
- Ireton, K., B. Payraastre, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 274:780-782.
- Isberg, R. R., and Tran Van Nhieu, G. (1994). Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 27: 395-422.
- Ivanov, I. (1962). Untersuchungen über die Listeriose der Schafe in Bulgarien. *Monatsh. Veterinaermed.* 17: 729-736.
- 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
- Johansen, T., Haugli, F.B., Ikezawa, H., Little, C. (1988) *Bacillus cereus* strain SE-1: nucleotide sequence of the sphingomyelinase C gene. *Nucl. Acids Res.* 16:10370.
- Jones, D. (1992). Current classification of the Genus *Listeria*. Libro de resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, p. 7-8. Copenhagen, Dinamarca.
- Jones, S., Preiter, K., 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.
- Jonquières, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart. (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.* 34:902-914.
- Karunasagar, I., Krohne, G., Goebel, W. (1993) *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect. Immun.* 61:162-169.
- Klarsfeld, A.D., P.L. Goossens, and P. Cossart. (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.

- Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68:521-531.
- Kolesnick, R.N., Krönke, M. (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Ann. Rev. Physiol.* 60:643-665.
- Kreft, J., Bohne, J., Gross, R., Kestler, H., Sokolovic, Z., Goebel, W. (1995) Control of *Listeria monocytogenes* virulence by the transcriptional regulator PrfA. In *Signal transduction and bacterial virulence*. Rappuoli, R., Scarlato, V., Arico, B. (eds.). Landes Company, pp. 129-142.
- 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
- 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.
- Kreft, J., Funke, D., Haas, A., Lottspeich, F., Goebel, W. (1989) Production, purification and characterization of hemolysins from *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* Sv4b. *FEMS Microbiol. Lett.* 57:197-202.
- Kreft, J., Vázquez-Boland, J.-A., Eva, Ng., Goebel, W. (1999). Virulence Gene Cluster and Putative Pathogenicity Islands in *Listeria*. pp. 219-232. *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. Edited by J. B. Kaper and J. Hacker. ASM, Washington, D. C.
- Kuhn, M., and W. Goebel. (1998). Host cell signalling during *Listeria monocytogenes* infection. *Trends Microbiol.* 6:11-15.
- Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W., Kreft, J. (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 transcription regulators. *Mol. Microbiol.* 13:141-151.
- 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
- Lasa, I., P. Dehoux, and P. Cossart. (1998). Actin polymerization and bacterial movement. *Biochim. Biophys. Acta* 1402:217-228.
- Lebrun, M., J. Mengaud, H. Ohayon, F. Nato, and P. Cossart. (1996). Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 21:579-592.

Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., Cossart, P. (2001). A transgenic model for listeriosis: Role of Internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*. 292: 1722-1725.

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.

Leimeister-Wächter, M., E. Domann, and T. Chakraborty. (1991). Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is coordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 5:361-366.

Lessing, M.P., Curtis, G.D. and Bowler, I.C. (1994). *Listeria ivanovii* infection. *J. Infect.* 29: 230-231

Lety, M.A., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J.L., Kayal, S., Berche, P., Charbit, A. (2001). Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 39: 1124-39.

Levade, T., and Jaffrézou, J. P. (1999). Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta* 1438, 1-17.

Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., et al. (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.

Loisel, T.P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M.-F. Carlier. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401:603-616.

Lorber, B. (1997). Listeriosis: State-of-the-art clinical article. *Clin Infect Dis.* 24:1-11.

Low, J.C., Wright, F., McLauchlin, J., Donachie, W. (1993) Serotyping and distribution of *Listeria* isolates from cases of ovine listeriosis. *Vet. Rec.* 133:165-166.

MacFarlane, M. G., Knight, B.C.J.G. (1941). The biochemistry of bacterial toxins. I. Lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem. J.* 35: 884-902.

Machesky, L.M. (1999). Rocket-based motility. a universal mechanism? *Nature Cell Biol.* 1:E29-E31.

Mackness, G.B. 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116:381-406.

- Mackness, G.B. 1969. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vitro. *J. Exp. Med.* 129:973-992.
- Marquis, H., Doshi, V., Portnoy, D.A. (1995) The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.* 63:4531-4534.
- Marquis, H., Goldfine, H., and Portnoy, D.A. (1997). Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* 137:1381-1392.
- Marquis, H., Doshi, V., and Portnoy, D.A. (1995). The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.* 63:4531-4534.
- Martin, E.D., Gothard, W.P., Levine, D.F. (1994). *Listeria ivanovii* infection. *J. Infect.* 1994. 29(2): 230-31.
- Masamune, A., Shimosegawa, T., Masamune, O., Mukaida, N., Koizumi, M., and Toyota, T. (1999). Helicobacter pylori-Dependent Ceramide Production May Mediate Increased Interleukin 8 Expression in Human Gastric Cancer Cell Lines. *Gastroenterology* 116, 1330-1341.
- Mencikova, E. (1989). Phospholipase C in *Listeria*. *Acta. Microbiol. Hung.* 36: 321-325
- 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.* 5:367-372
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vázquez-Boland, J.A., Milon, G., Cossart, P. (1991) Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.* 5:2273-2283.
- 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.
- 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.

- Miki, K., and G.B. Mackaness. 1964. The passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 120:93-103
- Miura, T, S. Nishikawa, S. Sasaki, K. Yamada, S. Hasegawa, D. Mizuki, M., Mizuki, I. Hatayama, S. Sekikawa, Y. Tagawa, Y. Iwakura, A. Nakane. (2000). Roles of endogenous cytokines in liver apoptosis of mice in lethal *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28:335-341.
- Monack, D.M., Hersh, D., Ghori, N. Bouley, D., Zychlinsky, A. and Falkow, S. 2000. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* 192: 249-258.
- Mounier, J., A. Ryter, M. Coquis-Rondon, and P. J. Sansonetti. (1990). Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 58:1048-1058.
- Muckle, C.A., Gyles, C.L. (1983). Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1149-1153
- Müller, S., T. Hain, P. Pashalidis, A. Lingnau, E. Domann, T. Chakraborty, and J. Wehland. (1998). Purification of the inlB gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect. Immun.* 66:3128-3133.
- 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.
- Navarre, W.W., and O. Schneewind. (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTGX motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 14:115-121.
- Navarre, W.W., and O. Schneewind. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:174-229.
- Nelson, G.J. (1967) Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. *Biochim. Biophys. Acta* 144:221-232.
- Niebuhr, K., T. Chakraborty, P. Köllner, and J. Wehland. (1993). Production of monoclonal antibodies to the phosphatidyl-choline-specific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*, a virulence factor for this species. *Med. Microbiol. Lett.* 2:9-16.
- 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.

- North, R.J. 1970. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. *J. Exp. Med.* 132:521-534.
- North, R.J. 1978. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* 121:806-809.
- Nyfeldt, A. (1929). Etiologie de la mononucléose infectieuse. *C. R. Soc. Biol.* 101: 590.
- O'Callaghan, R.J., Callegan, M.C., Moreau, J.M., Green, L., Foster, T.J., Hartford, O.M., Engel, L.S., Hill, J.M. (1997) Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infect. Immun.* 65:1571-1578.
- Okazaki, T., Bell, R. M., and Hannun, Y. A. (1989). *J Biol Chem* 264, 19076-19080.
- Osebold, J.W. and Inouye, T. (1954). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural host. I. Rabbit studies. *J. Infect. Dis.* 95: 52-66.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., Vasil, M.L. (1990) Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172:5915-5923
- Ostroff, R.M., Wretlind, B., Vasil, M.L. (1989) Mutations in the haemolytic phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect. Immun.* 57: 1369-1373
- 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.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., Carrier, M.F. (2001) Mechanism of actin-based motility. *Science.* 292: 1502-1506.
- Pelech, S.L., Vance, D.E. (1989). Signal transduction via phosphatidylcholine cycles. *Trends. Biochem. Sci.* 4: 28-30.
- Pérez-Casal, J., Caparon, M.G., and Scott, J.R. (1991) Mry, a *trans*-acting positive regulator of the M protein gene of *Streptococcus pyogenes* with similarity to the receptor proteins of two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.* 173:2617-2624.
- 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.

Pirie, J.H.H. (1927). New diseases of veld, rodents, "Tiger River Disease" *Publ. S. African. Inst. Med. Research.* 3: 163-186.

Pirie, J.H.H. (1940). The genus *Listerella Pirire*. *Science* (Washington) 91: 383.

Portnoy, D.A. (1994) Cellular biology of *Listeria monocytogenes* infection. In *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis* (Miller, V.L., Kaper, J.B., Portnoy, D.A., Isberg, R.R., eds.) Washington D.C.: American Society for Microbiology Press, pp. 279-293.

Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W. and Cossart, P. (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60: 1263-1267.

Portnoy, D.A., P.S. Jacks, and D.J. Hinrichs. (1988). Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167:1459-1471.

Poyart, C., E. Abachin, I. Razafimanantsoa, and P. Berche. (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.

Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S.L., Eiser, W., Novick, R.P. (1989) Nucleotide of the α -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 17:3305.

Pushkareva, M., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. (1995) Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol. Today* 16:294-297.

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.

Raveneau, J., C. Geoffroy, J.-L. Beretti, J.-L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche. (1992). Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.* 60:916-921.

Reed L.J. and Muench H. (1938) A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497

Ripio, M. T., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Brehm, K., Berche, P., and Vázquez-Boland, J. A. (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.

Ripio, M.-T., Brehm, K., Lara, M., Suárez, M., Vázquez-Boland, J.A. (1997a) Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J. Bacteriol.* 179:7174-7180.

- Ripio, M.-T., Domínguez-Bernal, G., Lara, M., Suárez, M., Vázquez-Boland, J.A. (1997b) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 179:1533-1540.
- Ripio, M.-T., Geoffroy, C., Domínguez-Bernal, G., Alouf, J.E., 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.
- 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.
- Ripio, M.-T., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Brehm, K., Berche, P., Vázquez-Boland, J.A. (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
- Robbins, J.R., A.I. Barth, H. Marquis, E.L. de Hostos, W.J. Nelson, and J.A. Theriot. (1999). *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell Biol.* 146:1333-1350.
- Rocourt, J. (1994). *Listeria monocytogenes*: the state of the art. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 14:70-82.
- Rocourt, J. and Grimont, P.A.D. (1983). *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 866-869.
- Rocourt, J. and Seeliger, H. P. R. (1985): Distribution des espèces du genre *Listeria*. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg.* A259: 317-330.
- Rocourt, J., Alonso, J.-M., Seeliger, H.P.R. (1983) Virulence comparée des cinq groupes génomiques de *Listeria monocytogenes* (*sensu lato*). *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134A:359-364.
- Rocourt, J., and Cossart, P. (2000) *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Edited by Michael P. Doyle, Larry R. Beuchat and Thomas J. Montville. *Capt.* 18: 337-352.
- Rocourt, J., Seeliger, H.P.R. (1985) Distribution des espèces du genre *Listeria*. *Zbl. Bakt. Hyg.* A229:317-330.
- Rogers, H. W., M. P. Callery, B. Deck, and E. R. Unanue. (1996). *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* 156:679-684.

- Saiman, L., Carcalano, G., Gruenert, D., Prince, A. (1992). Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from cystic fibrosis patients and healthy subjects. *Infect. Immun.* 60: 2808-2814
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, 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.
- 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.
- 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.
- Schmiel, D. H., and Miller, V. L. (1999). Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microb Infect.* 1, 1103-1112.
- Schneewind, O., A. Fowler, and K.F. Faull. (1995). Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* 268:103-106.
- 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.
- Schwan, W.R., A. Demuth, M. Kuhn, and W. Goebel. (1994). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* contributes to intracellular survival and growth of *Listeria innocua*. *Infect. Immun.* 62:4795-4803.
- Schwarzer, N., Nöst, R., Seybold, J., Parida, S. K., Fuhrmann, O., Krüll, M., Schmidt, R., Newton, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Suttrop, N. (1998). Two distinct Phospholipases C of *Listeria monocytogenes* Induce Ceramide Generation, Nuclear Factor-kB Activation, and E-Selectin Expression in Human Endothelial Cells. *J Immunol* 161, 3010-3018.
- Sechi, A.S., J. Wehland, and J.V. Small. (1997). The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *J. Cell Biol.* 137:155-167.
- Seeliger, H. P. R. 1976. Notion actuelle sur l' epidemiologie de la listeriose. *Med. Mal. Infect.* 9: 6-14.
- Seeliger, H. P. R., Schrettenbrunner, A., Pongratz, G., and Hof, H. (1982). Zur Sonderstellung stark hämolysierender Sämme der Gattung *Listeria*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A* 252:176-190

- 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.
- Seeliger, H.P.R., Jones, D. (1986) Genus *Listeria*. In Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Sneath P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (eds.). Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 1235-1245.
- 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
- Segers, R.P.A.M., Van der Drift, A., de Nijs, A., Corcione, P., Van der Zeijst, B.A.M., Gaastra, W. (1990) Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect. Immun.* 58:2177-2185.
- Sheehan, B., Kocks, C., Dramsi, S., Gouin, E., Klarsfeld, A.D., Mengaud, J., Cossart, P. (1994) Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 192:187-216.
- Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103:501-510.
- Sibeliuss, U., Chakraborty, T., Krögel, B., Wolf, J., Rose, F., Schmidt, R., Wehland, J., Seeger, W., Grimminger, F. (1996) The listerial exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C synergizes to elicit endothelial cell phosphoinositide metabolism. *J. Immunol.* 157:4055-4060.
- Smith, G.A., and D.A. Portnoy. (1997). How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. *Trends Microbiol.* :272-276.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., 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.
- Smyth, C.J. and Duncan, J.L. (1978) Thiol-activated (oxygen-labile) cytolysins. *In* Bacterial toxins and cell membranes, p.129-183. J. Jeljaszewicz and T. Eadström eds., Academic Press, Inc., New York.
- Songer, J.G. (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5:156-161.
- Spiegel, S., and Merrill, A. H. J. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* 19, 1388-1397.

Stevens, D.L., Bryant, A.E. (1997). Pathogenesis of *Clostridium perfringens* infection: mechanisms and mediators of shock. *Clin. Infect. Dis.* S160-S164

Stevens, D.L., Tweten, R., Awad, M.M., Rood, J.L., Bryant, A.E. (1997). Clostridial gas gangrene: evidence that the alpha and theta toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis. *J. Infect. Dis.* 176: 189-195

Suárez, M., González-Zorn, B., Vázquez-Boland, J.A. Observaciones no publicadas.

Swanson, J. A., and Baer, S.C. (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5: 89-93.

Tamura, H., Tameishi, K., Yamada, A., Tomita, M., Matsuo, Y., Nishikawa, K., Ikezawa, H. (1995) Mutation in aspartic acid residues modifies catalytic and haemolytic activities of *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochem. J.* 309:757-764.

Tang, P., C. L. Sutherland, M. R. Gold, and B. B. Finlay. (1998). *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect. Immun.* 66:1106-1112.

Theriot, J.A. (1995). The cell biology of infection by intracellular pathogens. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:213-239.

Theriot, J.A., T.J. Mitchison, L.G. Tilney, and D.A. Portnoy. (1992). The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357:257-260.

Tilney, L.G., and D.A. Portnoy. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 109:1597-1608.

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.

Tilney, L.G., and M.S. Tilney. (1993). The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. *Trends Microbiol.* 1:25-31.

Titball, R.W. (1993) Bacterial phospholipases C. *Microbiol. Rev.* 57:347-366.

Titball, R.W. (1999). Membrane-damaging and cytotoxic phospholipases. pp. 310-329. In J.E. Alouf and J.H. Freer (eds.). The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Academic Press, London UK.

Titball, R.W., Leslie, D.L., Harvey, S., Kelly, D. (1991) Hemolytic and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin are

dependent on a domain homologous to that of an enzyme from the human arachidonic acid pathway. *Infect. Immun.* 59:1872-1874.

Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M., and Stoffel, W. (1998). Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling? *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3638-3643.

Valenti, P., R. Greco, G. Pitari, P. Rossi, M. Ajello, G. Melino, and G. Antonini. (1999). Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes*: protective effect of lactoferrin. *Exp. Cell. Res.* 250:197-202.

Vázquez-Boland, J.-A, Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., and Goebel, W. (2001a), Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microb. Infect.* 3: 1-14.

Vázquez-Boland, J.-A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossart. (1992a). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60:219-230.

Vázquez-Boland, J.A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. and Suárez, G. (1992b). *Listeria monocytogenes* CAMP reaction. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 343.

Vázquez-Boland, J.A., Domínguez, L., Rodríguez-Ferri, E.F., Suárez, G. (1989) Purification and characterization of two *Listeria ivanovii* cytolysins, a sphingomyelinase C and a thiol-activated toxin (ivanolysin O). *Infect. Immun.* 57:3928-3935.

Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001b) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 1-57.

Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M.-T., Böckmann, R., González-Zorn, B., Novella, S., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., 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.

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.

Wadsworth, S.J., Goldfine, H. (1999) *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. *Infect. Immun.* 67:1770-1778.

Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T., Bhakdi, S. (1996). Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 64: 2974-2979.

Weiglein, I., W. Goebel, J. Troppmair, U.R. Rapp, A. Demuth, and M. Kuhn. (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.

Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (1999). The Induction of Apoptosis by Bacterial Pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53, 155-187.

Whitney D.R. (1951) A bivariate extension of the U statistic. *Anal Math Stat* 22:274-282.

Yozwiak, M.L., Songer, J.G. (1993). Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 54: 392-397.

Zhang, P., Liu, B., Jenkist, G. M., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (1998). Expression of Neutral Sphingomyelinase Identifies a Distinct Pool of Sphingomyelin Involved in Apoptosis. *J Biol Chem* 272, 9609-9612.