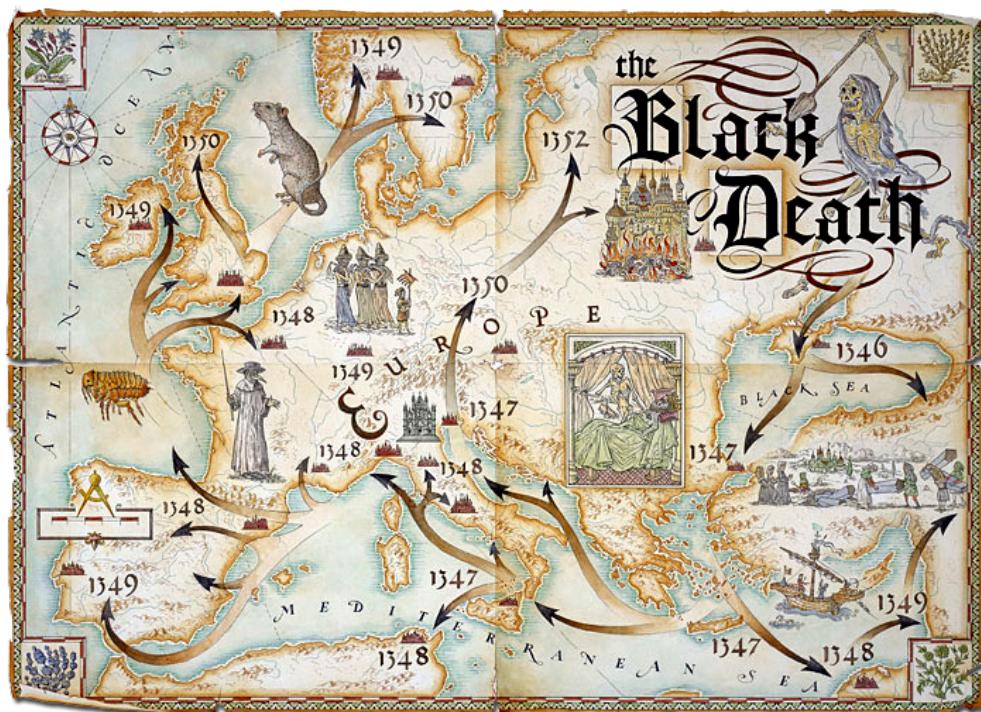


Género: *Yersinia*



"Nuestras vidas son los ríos
que van a dar en la mar,
que es el morir;
allí van los señoríos
derechos a se acabar
y consumir;

allí los ríos caudales,
allí los otros medianos
y más chicos,
y llegados, son iguales
los que viven por sus manos
y los ricos."

Jorge Manrique. *Coplas a la Muerte de su padre.*

ÍNDICE

1. Introducción	3
1.1. Características del género Yersinia	6
2. Enfermedad causada por Yersinia enterocolítica	7
3. Factores de virulencia de Yersinia enterocolítica codificadas en el cromosoma	8
3.1. La enterotoxina Yst	8
3.2. La Internalina Inv	9
4. Factores de virulencia de Yersinia enterocolítica codificadas en el plásmido pYV	11
4.1. Aparato de secreción de las Yops (El inyesctosoma Ysc)	11
4.2. Chaperonas citosólicas	13
4.3. Control de la inyección	14
4.4. Efecto de las proteínas Yops sobre las células del hospedador	14
4.4.1. Inhibición de la fagocitosis	14
4.4.2. Bloqueo de la respuesta inflamatoria	19
4.4.3. Inducción de apoptosis en macrófagos	21
4.5. YadA	23
5. Regulación de los genes de virulencia	24
6. Bibliografía	26

PORTRADA

La imagen pertenece a un blog de historia: *Khronos, la historia como nunca te la enseñaron*. El poema pertenece al libro *Coplas a la Muerte de su padre* de Jorge Manrique, escrito tras el fallecimiento de su padre en 1476. La muerte era un tema frecuente en la literatura medieval. Las epidemias de peste redujeron a la población en casi un 40%, marcando fuertemente la inspiración de la época.

1. Introducción

En el período 1346-1352, Europa sufrió la pérdida de unos 20 millones de personas, lo que correspondía a cerca de la mitad de la población que poseía en ese momento. La enfermedad responsable de tan macabra estadística fue la peste bubónica, a la que, oportunamente, se denominó “**Peste Negra**”, designación que ha conservado a lo largo de la historia. Reflejo del gran impacto de la enfermedad, se ve la repercusión que pudo tener en el arte, como en el cuadro *El Triunfo de la muerte* de Pieter Brueghel el Viejo en el que se refleja el horror de la época y la gran cantidad de muertes (Fig. 1).

Entre el 70 y el 80 por ciento de los que contrajeron la peste en el siglo XIV murieron por ello. Los síntomas se presentaban con tal gravedad que presagiaban la muerte en un plazo de cinco días. El nombre de peste bubónica procede de uno de los primeros signos clínicos de la enfermedad: la aparición de grandes hinchazones dolorosas (llamadas bubones) en los nódulos linfáticos de la axila, cuello o ingle de la víctima. Por regla general, tres días después de la aparición



Figura 1. Óleo “El triunfo de la muerte” de Brueghel (1562).

Fuente: Wikipedia

de los bubones los enfermos se veían asaltados por fiebre alta, acompañada de delirio y de la presencia de manchas negras, resultado de hemorragias subcutáneas.

Por extraño que parezca, pese a la frecuente presencia de la enfermedad y el elevado precio que se cobraba, nadie disponía entonces de indicios sobre su naturaleza, su causa última o el mecanismo de difusión. Durante el período de la Peste Negra, las gentes solían atribuir el mal a combinaciones astrológicas desfavorables o aires o vapores pútridos (“miasmas”), nada de lo cual podía traducirse en programas preventivos de ninguna clase. Debido a estas creencias los médicos llevaban una indumentaria muy característica para evitar respirar los aires que desprendían los enfermos, que constaba de una máscara con lentes de vidrio para los ojos y una nariz en forma de pico que se rellenaba de perfumes y paja para “filtrar” el aire (Fig. 2).



Figura 2. Máscara característica de los médicos que trataban la Peste Negra.

Fuente: Wikipedia.

Por fin, en 1894, el bacteriólogo francés Alexandre Yersin descubrió que la peste bubónica estaba causada por una bacteria gram-negativa, *Yersinia pestis*.

En 2011 se publicó el genoma completo de *Y. pestis* obtenida de víctimas de la Peste Negra del cementerio East Smithfield de Londres, donde se enterraban exclusivamente enfermos de esta epidemia. Esto ha permitido ver que en más de 600 años no se han producido grandes variaciones de su genoma.

Recientemente se ha demostrado la implicación de *Y. pestis* en varias pandemias históricas como son: la plaga de Justiniano (que devastó al Imperio bizantino en el siglo VI), la Peste Negra (que ocurrió en Europa durante la Edad Media) y la peste moderna (surgida en China en el siglo XIX). Así se ha podido determinar que los orígenes del patógeno están en Asia Central, desde donde llegó a Europa en el siglo XIV y se extendió por el continente.

Tras la Peste Negra se produjeron epidemias locales durante unos 400 años, de las que destacan la peste de Marsella y la Provenza francesa (1720-1722). Con el paso del tiempo, la bacteria volvió a Asia para provocar la tercera epidemia (Fig. 3).

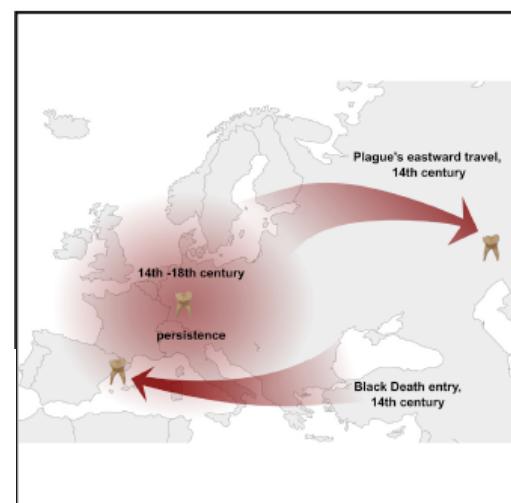


Figura 3. Introducción de la plaga desde Asia, dispersión por Europa en la Edad Media y extensión nuevamente por Asia. Obtenida de Spyrou *et al.* (2016)

Los bacilos de la peste se encuentran con baja frecuencia en numerosas poblaciones de roedores salvajes de todo el mundo; se transmiten entre ellos por las pulgas. En el caso de la peste bubónica, el insecto responsable suele ser la pulga oriental de la rata, *Xenopsylla cheopis*. Cuando pica a una rata infectada, ingiere los bacilos, que proliferan en su tubo digestivo y lo obstruyen; la pulga, incapaz de

ingerir sangre, se vuelve rabiosamente hambrienta y, en sus frenéticos intentos de alimentarse, pica repetidamente al hospedador, regurgitando más bacilos en cada picadura. Los puntos de inyección actúan como focos de diseminación de los bacilos. Si el hospedador muere, cosa probable, la pulga se traslada al roedor más cercano. De este modo la enfermedad se propaga con rapidez.

Conforme disminuye el número de ratas vivas, las pulgas parasitan hospedadores de sangre caliente a los que normalmente no atacarían, como seres humanos y animales domésticos, y se desencadena una epidemia. En el Medievo, ambas poblaciones se encontraban en contacto íntimo, las personas vivían rodeadas de ratas, tanto en las áreas urbanas como en las rurales.

Una vez introducida la enfermedad entre la población humana, puede transmitirse de una persona a otra a través de la inhalación de gotitas infectadas expulsadas con la respiración. Eso no quita que la manera habitual de propagación sea la picadura de pulga. De hecho, la enfermedad no subsiste al acabarse los roedores y sus pulgas (Fig. 4).

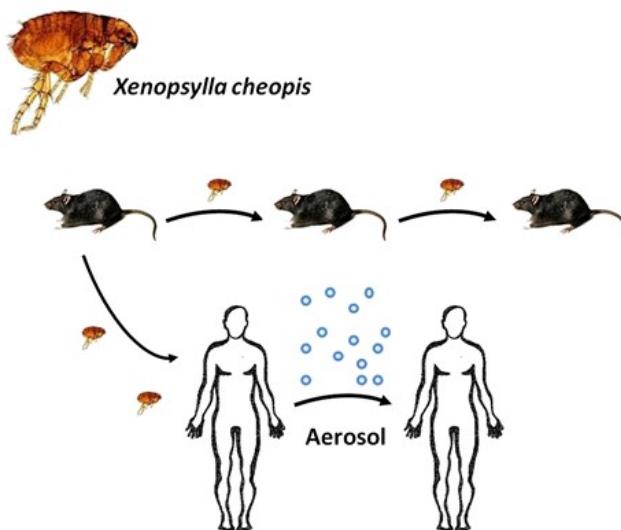


Figura 4. Modo de transmisión de la enfermedad. Una pulga infectada tras picar a un roedor, puede transmitir la enfermedad a más roedores, y, eventualmente, a humanos. En momentos de alta incidencia, la transmisión entre humanos puede ocurrir a través de aerosoles producidos durante la respiración. Adaptada de Raoult *et al* (2013)

Con frecuencia, la condición esencial para que se produzca una epidemia (un brote en la población humana) es la existencia de una epizootia (un brote en la población animal, en este caso de roedores).

Tras las epidemias locales descritas en Marsella y zonas cercanas a finales del siglo XVIII, los brotes se fueron haciendo menos frecuentes hasta desaparecer. Aunque *Y. pestis* sigue infectando a poblaciones de roedores en zonas endémicas. Actualmente las infecciones en humanos son esporádicas y muy limitadas. Así, según datos de la Organización Mundial de la Salud, se producen

unos 2000 casos al año en todo el mundo, aunque la mortalidad asociada sigue siendo alta. ¿Cuál fue la causa de esta disminución?

Se han dado todo tipo de hipótesis, de entre las que quiero referir lo que se ha venido a llamar la **hipótesis bacteriológica**. Esta hipótesis propone la aparición de una nueva especie de *Y. pestis*, evolucionada en sentido menos virulento que la estirpe anterior. Al ser menos dañina, habría actuado como una vacuna, confiriendo a los animales y a las personas infectadas una relativa inmunidad frente a las estirpes más virulentas de la misma bacteria.

La hipótesis bacteriológica resulta aceptable por varias razones. Primero, está de acuerdo con el aforismo propuesto por el patólogo norteamericano Theobald Smith, que dice: “las manifestaciones patológicas sólo constituyen incidentes en el desarrollo de un proceso de parasitación”; esto es, que, a largo plazo, las formas más suaves de enfermedad tienden a desplazar a las más virulentas.

Segundo, la hipótesis viene apoyada por la existencia de un bacilo de parentesco muy próximo al de la peste, *Y. pseudotuberculosis*, que no induce manifestaciones visibles de la enfermedad en ratas, pero les confiere un elevado grado de inmunidad frente a la peste.

1.1. Características del género *Yersinia*

Las especies del género *Yersinia* se definen como bacilos o cocobacilos gramnegativos, de 0,5-0,8 µm de diámetro y 1-3 µm de longitud.

Entre las muchas especies del género *Yersinia*, sólo *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* están adaptadas para multiplicarse a expensas de un hospedador que está aún vivo, y son patógenos de humanos. *Y. pestis* es inoculada a través de la picadura de pulga mientras que las otras dos son normalmente transmitidas como contaminaciones alimentarias.

Y. pestis, el agente de la peste, y *Y. pseudotuberculosis* son patógenos esencialmente de roedores. *Y. enterocolitica* es un patógeno común de humanos que causa síndromes gastrointestinales de severidad variada, que van desde una diarrea moderada auto-limitada a adenitis (Inflamación de los ganglios linfáticos) mesentérica que recuerda a la apendicitis.

Infecciones sistémicas son inusuales con *Y. enterocolitica*, pero con frecuencia, asociados a infecciones bacterianas moderadas o inaparentes, se disparan desórdenes autoinmunes. Entre éstos se encuentran la tiroiditis y la artritis reactiva. En Europa, el cerdo es la fuente más común de contaminación con *Y. enterocolitica*.

Estas bacterias tienen un tropismo por tejidos linfoides y una destacable habilidad para resistir la respuesta inmune no específica. Las principales estrategias consisten en:

- 1) Evitar la lisis por complemento.
- 2) Evitar la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.
- 3) Formar microcolonias extracelulares en los tejidos infectados.

2. Enfermedad ocasionada por *Yersinia enterocolítica*.

La enfermedad se inicia por la ingestión de alimentos o agua contaminadas.

En sistemas modelo, conejo y ratón, la enfermedad procede mediante translocación a través del epitelio del íleon o del colon hacia la región de la submucosa. En el íleon del ratón, hay alguna evidencia que indica que *Y. enterocolitica* se encuentra dentro de una subserie de células llamadas células M, localizadas sobre los parches linfoides de Peyer, que se encuentran alineados a lo largo del tracto gastrointestinal.

En los animales modelo, *Y. enterocolitica* drena en los nódulos linfáticos mesentéricos, y gran número de bacterias pueden ser encontradas en estas glándulas dentro de las 24 h de la infección inicial. En infecciones de humanos, parece que la enfermedad termina al tiempo de infectar los nódulos linfáticos mesentéricos. Después de la infección oral, los animales susceptibles, entre ellos muchas cepas de ratón, son incapaces de dañar la replicación de *Yersinia* en ese sitio, y el crecimiento de la bacteria continua después de drenar en el hígado y el bazo debido a la posible participación de macrófagos y células dendríticas como vehículos. Las bacterias se localizan exclusivamente de forma extracelular y continúan fuera de las células del hospedador durante toda la enfermedad. En los distintos tejidos infectados, la bacteria forma microcolonias que son resistentes a la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos.

3. Factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica* codificadas en el cromosoma.

3.1. La enterotoxina Yst.

En el cromosoma de *Y. enterocolitica* se encuentra codificada una enterotoxina estable al calor, Yst. Es un péptido de 30 aminoácidos que se asemeja a la enterotoxina estable al calor STI de *E. coli* y a la guanilina, un activador endógeno de la guanilato ciclase intestinal (Fig. 5).

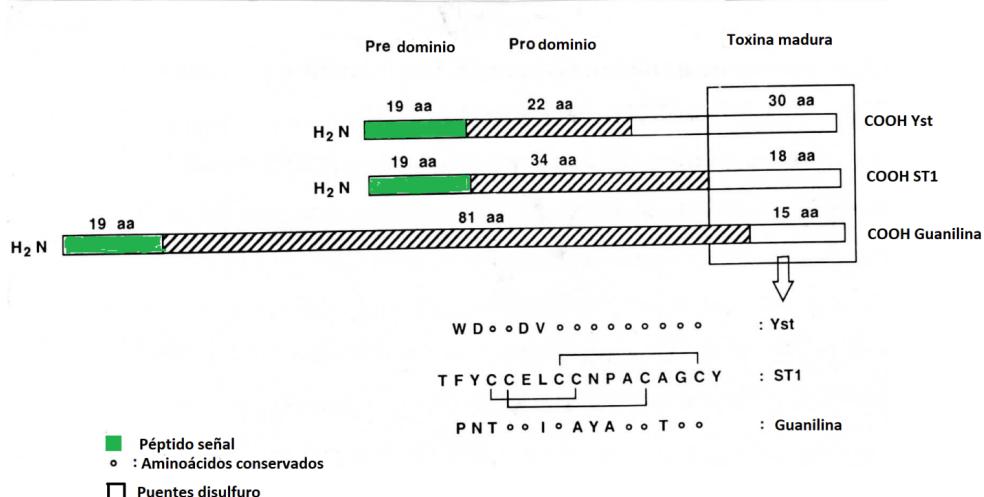


Figura 5: La enterotoxina Yst y ST1 comparado con guanilina.

La enterotoxina Yst se sintetiza como un polipéptido de 71 aminoácidos que es la pre-protoxina. Los 30 aminoácidos C-terminales corresponden a la toxina tal y como se extrae del sobrenadante de los cultivos de la bacteria, es decir, a la toxina madura. Los 19 aminoácidos N-terminales tienen las propiedades de un péptido señal y los 22 residuos centrales son retirados durante o después del proceso de secreción.

En vista de la similitud tan grande entre Yst y STI y la asociación con serotipos patogénicos, resulta tentativo especular que la producción de Yst es responsable de las manifestaciones diarreicas asociadas con la yersiniosis. En el modelo ratón, al menos, se ha demostrado que la toxina Yst es responsable de la diarrea.

La regulación de Yst es a nivel transcripcional. Se transcribe a partir de dos promotores y alcanza su máxima expresión en la fase estacionaria. La proteína YmoA es un regulador negativo de la transcripción, participa silenciando la enterotoxina.

En los cultivos bacterianos de *Y. enterocolítica* Yst solo se detectaba a una temperatura por debajo de los 30ºC, lo que parece confuso dado su papel en la patología. Sin embargo, en distintos estudios se ha observado que la enterotoxina Yst se expresa a 37ºC cuando la osmolaridad y el pH del medio son parecidos a los que hay en el intestino. Esto puede explicar su implicación en las manifestaciones diarreicas que tienen lugar durante la enfermedad.

3.2. La internalina Inv.

In vivo, la internalina Inv parece desempeñar un papel vital en promover la entrada en el tejido intestinal durante la etapa inicial de la infección. Permite la entrada a través de las células M localizadas en el epitelio intestinal.

El gen *inv* es muy similar a varios *loci* asociados con interacciones bacteria-célula hospedadora que han sido encontrados en una variedad de patógenos entéricos gram-negativos como la *E. coli* enteropatogénica. El producto de *inv*, predicho por tener 986 aminoácidos, se encontró que está expuesto sobre la superficie de la bacteria. La proteína tiene un péptido señal en el N-terminal, una región transmembrana y 5 dominios extracelulares (Fig. 6). Dos de ellos (D4 y D5) participan en la unión con las integrinas y el resto permiten la interacción con otras invasinas para formar homomultímeros. Las bacterias que expresan la invasina se unen fuertemente a la superficie de células de mamífero.

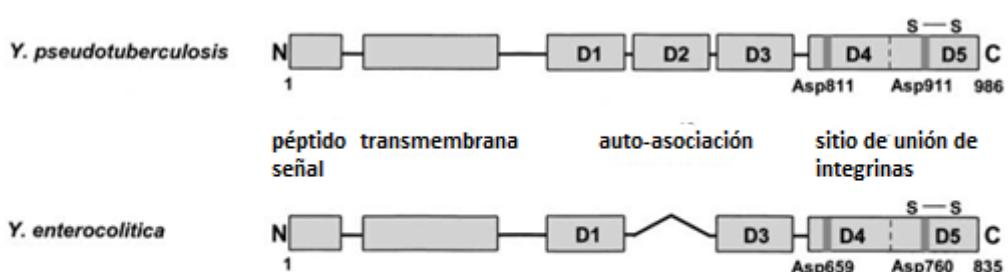


Figura 6: Esquema de la Invasina en *Yersinia pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*. Obtenida de Guntram et al (2003)

La invasina parece interaccionar con las integrinas situados sobre las células del hospedador, y más concretamente con la $\beta 1$ integrina. Las integrinas son una familia de proteínas formadas por más de 20 proteínas heterodiméricas $\alpha\beta$ implicadas en la unión a proteínas de la matriz extracelular y en interacciones célula a célula.

La asociación de elementos del citoesqueleto con la cadena β de la integrina puede ser importante para la entrada de la bacteria, promovida por la invasina. La internalización parece requerir del reordenamiento del citoesqueleto y es inhibida por agentes que despolimerizan la actina, tales como la citocalasina D.

La invasina se une al receptor-integrina con una extremadamente alta afinidad, que es uno o dos órdenes de magnitud mayor que la afinidad por la mayoría de los substratos naturales de las integrinas.

Por otro lado, la invasina media reacciones pro-inflamatorias en el epitelio intestinal. Induce la activación del factor de transcripción NF- κ B que lleva a la producción de citoquinas quimiotácticas (Fig. 7). Esto permite que las células fagocíticas del sistema inmunitario vayan al foco de infección y así *Yersinia* puede utilizarlas como vehículo para su diseminación por el organismo.

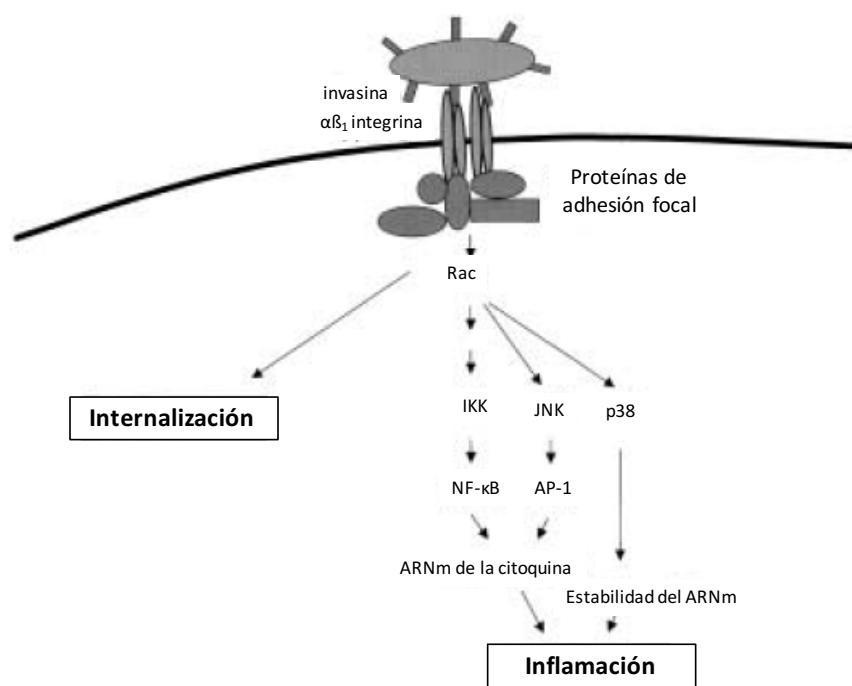


Figura 7: Vías de señalización inducidas por la invasina de *Yersinia*. Obtenida de Guntram et al (2003)

4. Factores de virulencia codificadas en el plásmido pYV.

Las especies patogénicas de *Yersinia* presentan como particularidad un plásmido de 70-kb denominado pYV (“plasmid *Yersinia* Virulence”; en *Y. pestis*, el plásmido se llama pCD1) (Fig. 8). La importancia de este plásmido, y de los genes situados en él, se puso de manifiesto en estudios de infección en animal utilizando cepas de *Yersinia* “curadas” del plásmido (cepas P⁻). Así, se vio que las cepas P⁻ eran capaces de establecer infecciones intestinales e incluso acceder a los parches de Peyer, mostrando que los genes codificados en este plásmido no son requeridos para atravesar la barrera intestinal. Sin embargo, las cepas P⁻ desaparecen de estos nódulos linfáticos a los pocos días mientras que las cepas P⁺ continúan creciendo. Las funciones principales de las proteínas que codifica el plásmido son la fagocitosis de la bacteria y la de evadir la respuesta del hospedador.

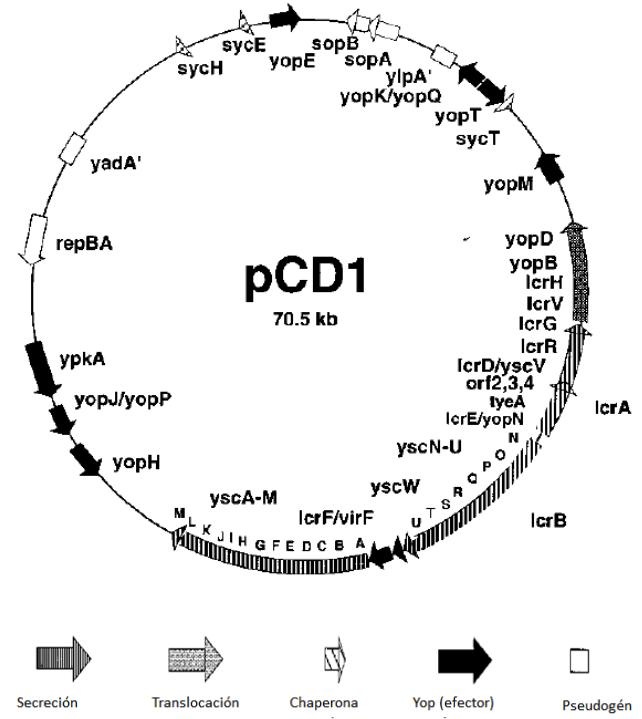


Figura 8: Plásmido de virulencia de *Yersinia pestis*. Obtenida de Guy et al (1998)

En el plásmido de virulencia se encuentran codificadas las proteínas Yop efectoras y las proteínas necesarias para inyectarlas dentro de las células del hospedador. Así, el virulón Yop es un arquetipo de sistemas de secreción tipo III.

4.1. El aparato de secreción de las Yops (El inyectosoma Ysc).

Hasta el momento se han identificado 30 genes *ysc* (“Yop secretion”) implicados en el proceso de liberación de Yop’s. Su origen es una duplicación del operón que codifica para la formación del flagelo. Muchos de estos genes son homólogos a otros sistemas de secreción tipo III de otros patógenos bacterianos (*Shigella*, *Salmonella*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, los dos últimos patógenos de plantas).

El aparato de secreción es un orgánulo que consiste de un cuerpo basal, que atraviesa la capa de peptidoglicano y las dos membranas bacterianas, y que se continúa con una estructura similar a una aguja que sale de la bacteria (Fig. 9). El anillo en la membrana externa está formado por la secretina YscC, asistido por la lipoproteína YscW. YscF, YscO, YscP y YscX constituyen la parte externa del inyectosoma. YscF es el principal constituyente de la aguja. YscV, YscU, YscR, YscT e YscS son proteínas del cuerpo basal que están en contacto con la membrana citoplasmática.

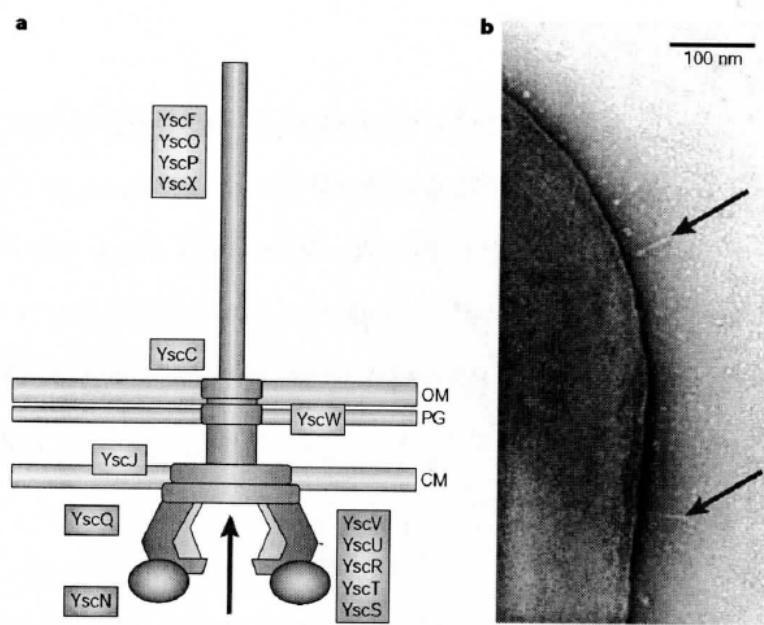


Figura 9. El inyectosoma Ysc. a) Representación esquemática del inyectosoma que abarca la membrana externa (OM), la membrana de peptidoglicanos (PG) y la membrana citoplasmática (CM) de la bacteria. B) Imagen de microscopía electrónica del inyectosoma. Obtenida de Cornelis (2002)

El proceso de secreción requiere a YscN, una proteína de 47,8-kDa con motivos de unión a ATP que recuerda a la subunidad catalítica β de la protón-translocasa F_0F_1 . Esta proteína proporciona la energía que permite el paso de las proteínas efectoras a través del canal para llegar a la célula hospedadora.

Mientras no existe contacto con una célula eucariótica, una válvula de parada, posiblemente hecha con YopN, TyeA y LcrG, bloquea el canal de secreción Ysc. (Fig. 10). Cuando hay depleción de calcio o tras el contacto con la célula blanco eucariótica, la bacteria se ancla fuertemente a través de la interacción entre sus adhesinas YadA e Inv y las β -integrinas, y el canal de secreción se abre. YopB y YopD forman un poro en la membrana plasmática de la célula blanco. Así, el aparato Ysc sirve como un conducto a través del cual las proteínas exportadas atraviesan las dos membranas y la barrera de péptidoglicano en una sola etapa (Fig. 11). Tienen que pasar parcialmente desplegadas porque el diámetro de la aguja no permite el paso de las proteínas globulares plegadas.

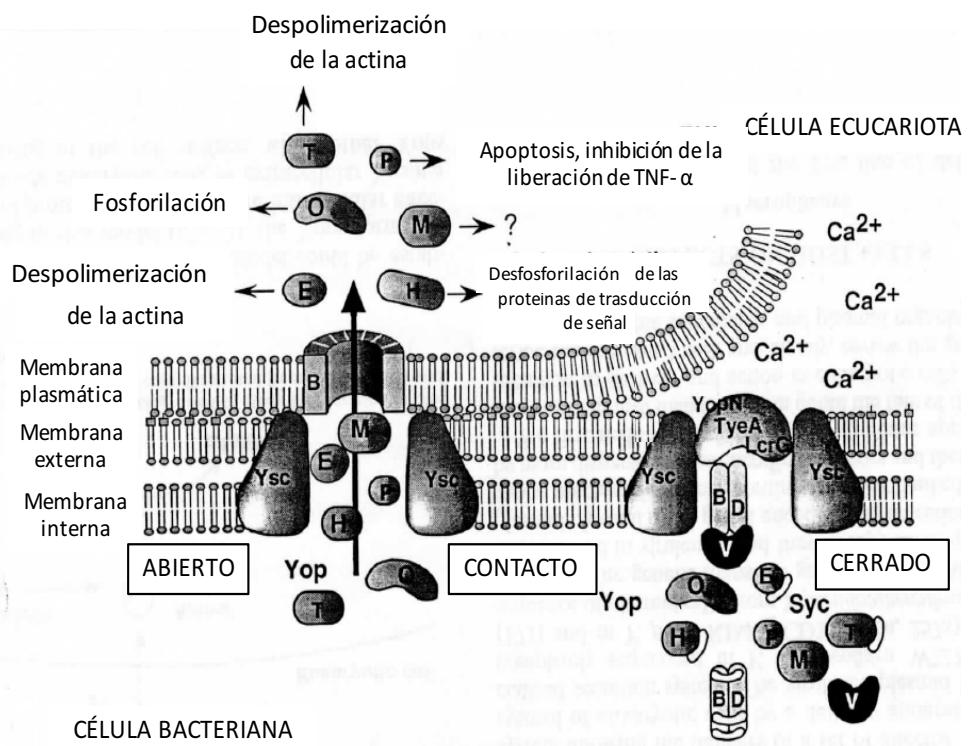


Figura 10. Modelo de la interacción entre *Yersinia* y un macrófago. Obtenida de Cornelis *et al* (1998)

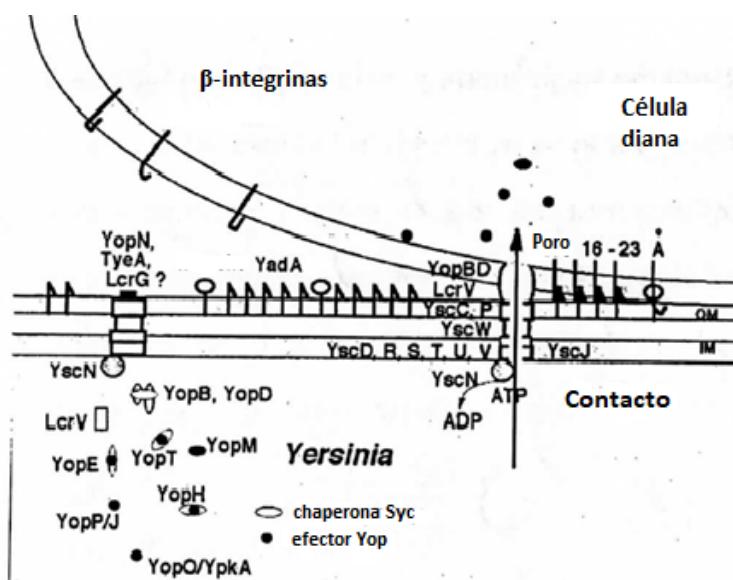


Figura 11. Esquema del virulon Yop.

4.2. Chaperonas citosólicas.

Otra de las peculiaridades del sistema de secreción Yop es que utiliza chaperonas citoplasmáticas que son específicas para Yops individuales. Se llaman Syc (for "specific yop chaperone") seguido de la letra de la correspondiente Yop. Si un gen syc es mutado, la correspondiente Yop no es exportada pero la

secreción de otras Yops no es afectada. Por su unión a la Yop, la chaperona Syc asegura la estabilidad y conformación apropiada de la proteína. En el momento de la secreción, la chaperona es liberada de su Yop pareja y se recicla para poder transportar otra proteína Yop al canal.

4.3. Control de la inyección.

Yersinia secreta las Yops *in vitro* bajo condiciones de falta de Ca^{2+} . Pero se piensa que *in vivo* la señal disparadora del proceso va a ser el contacto con la célula eucariótica. Varios trabajos indican que la liberación de las Yops es un fenómeno “direccional”, en el sentido de que la mayoría de la carga es liberada dentro de la célula eucariótica y que existe poco escape.

4.4. Efecto de las proteínas Yops sobre las células del hospedador.

Hasta el momento, se ha encontrado que las proteínas inyectadas por el aparato de secreción tipo III en el citoplasma eucariótico van a tener un papel clave en la **inhibición de la fagocitosis** (y respuestas asociadas con la fagocitosis, como son la producción de radicales libres de oxígeno por macrófagos y neutrófilos) (4.4.1), el **bloqueo de la respuesta inflamatoria** (4.4.2) y la **inducción de apoptosis en macrófagos** (4.4.3).

4.4.1. Inhibición de la fagocitosis.

Hay cuatro proteínas Yop implicadas:

- **YopH** es una tirosín-fosfatasa que desfosforila:
 - $\text{p}130_{\text{cas}}$
 - Paxilina
 - La quinasa de adhesion focal (FAK o “focal adhesion kinase”). Lo que conduce a la rotura de la adhesion focal y por tanto resulta en una inhibición de la fagocitosis (Fig. 12).
 - La proteína Fyb (de unión a Fyn) y la proteína SKAP-HOM interaccionan entre si y son fosforiladas en respuesta a la adhesión del macrófago, y su desfosforilación por YopH le permite a *Yersinia* interferir en la vía de transducción de señales regulada por adhesión en macrófagos (Fig. 12). Así, YopH también bloquea otras respuestas asociadas con la fagocitosis, como son la producción de radicales libres de oxígeno por macrófagos y neutrófilos.

Las otras tres Yops efectoras que inhiben fagocitosis (**YopE**, **YopT** y **YopO**) actúan sobre GTPasas de la familia Rho. Estas GTPasas pertenecen a un numeroso grupo de GTPasas eucarióticas que actúan como interruptores moleculares y controlan eventos clave en la célula a través de la oscilación entre sus formas “on” y “off” de acuerdo al nucleótido unido (Fig. 12). El reemplazamiento del nucleótido es catalizado por proteínas especializadas, entre las que se incluyen las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) y el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEFs). Las proteínas de la familia Rho están ancladas a la cara interna de la membrana plasmática de la célula a través de un grupo prenilo que está unido covalentemente al extremo carboxilo-terminal de la proteína. Este anclaje es esencial para su función. Los miembros de la familia Rho que están implicados en controlar la dinámica del citoesqueleto de actina son Rho, Rac y Cdc42. (Ver Caja 1)

- **YopE** actúa como una GAP (Proteína activadora de la GTPasa), cambiando RhoA, Rac y Cdc42 a su forma “off” al acelerar la hidrólisis de GTP (Fig. 12). YopE se une a la GTPasa e introduce una secuencia que contiene arginina (“the arginine finger”) en el sitio catalítico de la GTPasa. Este residuo de arginina (Arg-144) completa el sitio activo y promueve una hidrólisis eficiente de GTP. Este mecanismo de acción está conservado con el de otras GAPs eucarióticas.
- **YopT** tiene un fuerte efecto despolimerizador sobre la actina, al modificar a las proteínas de la familia-Rho e induciendo su liberación de la membrana al citoplasma. YopT es una cisteína-proteasa que rompe RhoA, Rac y Cdc42 cerca del extremo carboxilo terminal (C-term), liberándolas de su anclaje a membrana. *In vivo*, YopT parece tener una actividad preferencial hacia RhoA y menor para las otras dos GTPasas.

Las acciones de YopE y YopT resultan en la inactivación de Rho y despolimerización de las fibras de estrés.

- La proteína efectora **YopO** es una quinasa homóloga a las serinas/treoninas quinasas eucariotas. Tiene un dominio similar a la molécula GDI (“GDP-dissociation inhibitor”) con el que interacciona con las RhoGTPasas. Se postula que podría interaccionar con la proteína Rac1 anclada a la membrana, facilitando su liberación y su desactivación.

Mutantes de *Yersinia* carentes de cualquiera de estas cuatro Yops resultan mejor fagocitados por PMN

y macrófagos que lo son las *Yersinias* normales, lo que indica que cada una de las cuatro Yops contribuyen al efecto antifagocítico y que no hay redundancia entre ellas, más bien habría sinergismo.

Así, la inhibición de la fagocitosis permite a *Yersinia* proliferar en los “Peyer’s patches”, y otros tejidos más profundos, como microcolonias extracelulares. En este punto, cabe destacar que contrario a lo que ocurre en *Shigella* y *Salmonella*, las que usan el sistema de secreción tipo III para entrar en células no fagocíticas, *Yersinia* utiliza el mismo tipo de sistema para evitar ser tomada por células fagocíticas.

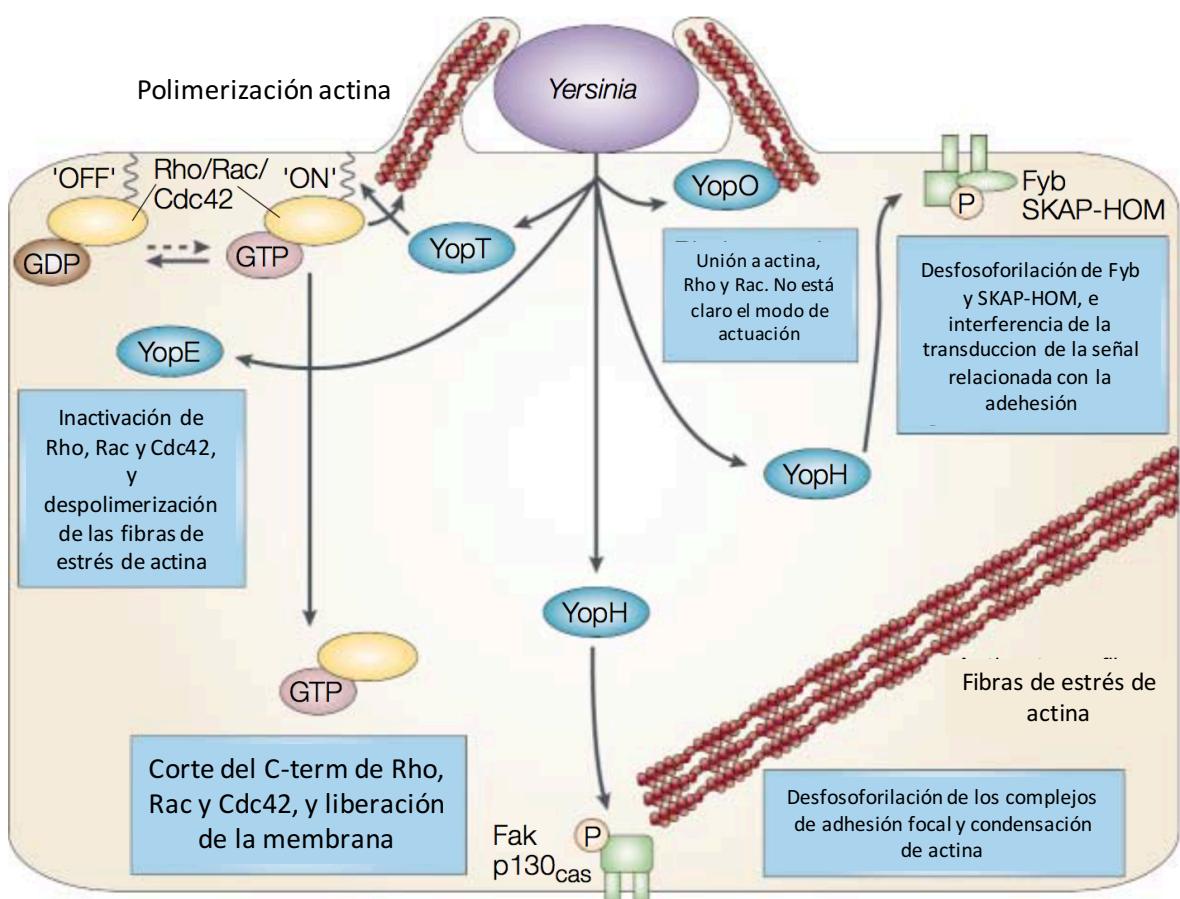


Figura 12. Dianas de YopE, YopH, YopT y YopA/YopO. Modificada a partir de figura en Cornelis (2002).

CAJA 1. El ciclo de las GTPasas y la organización del citoesqueleto de actina

El estado de la actina fluctúa entre actina monomérica soluble (G-actina) y la actina polimerizada (F-actina), especialmente durante la fagocitosis. Arp2/3 es un complejo proteico de unión que se une al extremo de la F-actina y recluta complejos profilina-actina-ATP. La profilina es un factor de intercambio que une actina-ADP y estimula el intercambio de nucleótido para generar G-actina-ATP. Por otro lado, la cofilina estimula la hidrólisis de actina-GTP a actina-GDP, favoreciendo la despolimerización. (Fig.13)

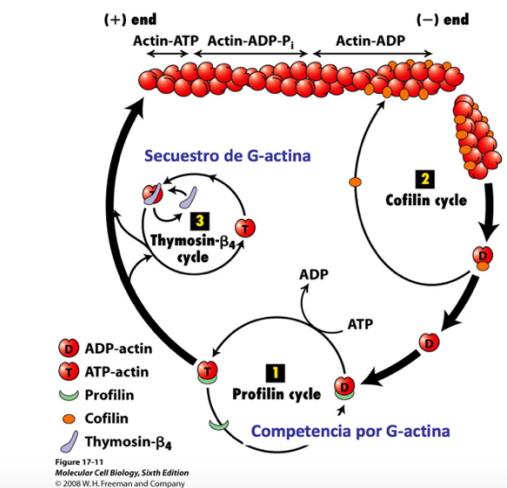


Figura 13. Proteínas accesorias asociadas a G-actina que modifican la elongación de los microfilamentos

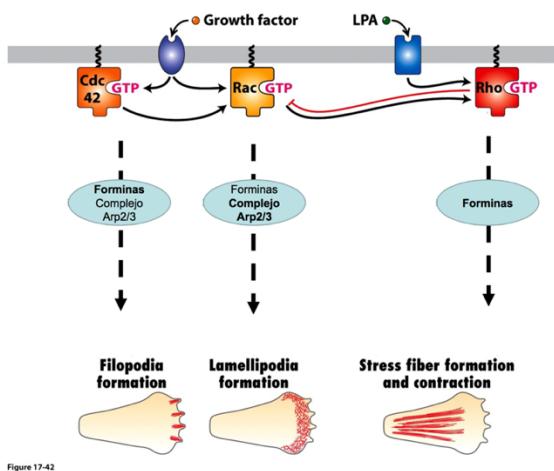


Figura 14. Regulación de la nucleación de la actina

La nucleación de actina y la formación de fibras de estrés, filopodios y lamelipodios son reguladas por las Rho GTPasas Rho, Rac y Cdc42. Las Rho GTPasas actúan como interruptores moleculares que controlan vías de transducción de señales a través de un ciclo en las formas inactiva (unida a GDP) y la activa (unida a GTP). En su estado unido a GTP, éstas interactúan con otras proteínas para inducir una gran variedad de respuestas intracelulares, la función mejor caracterizada es la regulación de la dinámica de actina. (Fig 14)

Rho regula el ensamblaje de fibras de estrés contráctiles de actina-miosina, mientras que Rac y Cdc42 regulan la polimerización de actina para formar lamelipodios periféricos, regulando las rugosidades de membrana y la locomoción celular, y Cdc42 regula los filopodios para definir la polaridad del movimiento celular.

La interacción de las Rho GTPasas con la membrana plasmática es mediada por modificaciones postraduccionales con lípidos. En concreto, experimentan geranilgeranililación, catalizada por la

geranilgeraniltransferasa tipo I (GGTasa-I), que afecta al residuo de cisteína situado en el motivo CAAX del extremo C-terminal. Como consecuencia de esta prenilación, los tres aminoácidos C-terminales son retirados y la proteína queda anclada a la membrana por el residuo de cisteína.

El ciclo de las Rho GTPasas es regulado por tres grupos de proteínas. Las Rho-GTPasas inactivas son secuestradas de forma soluble en el citoplasma con la formación de un complejo con los inhibidores de disociación del nucleótido de guanina (**GDI**s, “Guanine nucleotide dissociation inhibitors”). Las proteínas **ERM** estimulan la liberación de GDI de las proteínas Rho, lo que desenmascara el grupo lipofílico isoprenil, facilitando la transferencias de las Rho GTPasas a la membrana celular. Además, la liberación de GDI permite que las proteínas Rho se asocien con los **GEFs** (“guanine nucleotide exchange factors”), que estimulan la conversión de Rho-GDP a Rho-GTP. Ahora, las Rho-GTP unidas a membrana interactúan con las proteínas efectoras para estimular la reorganización del citoesqueleto de actina. La inactivación de las Rho-GTP a Rho-GDP es estimulada por proteínas GAPs (“Rho specific GTPase-activating proteins”), que actúan aumentando la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas. Finalmente, el ciclo se completa cuando las Rho-GDP son extraídas de la membrana celular por las GDI. (Fig 15.)

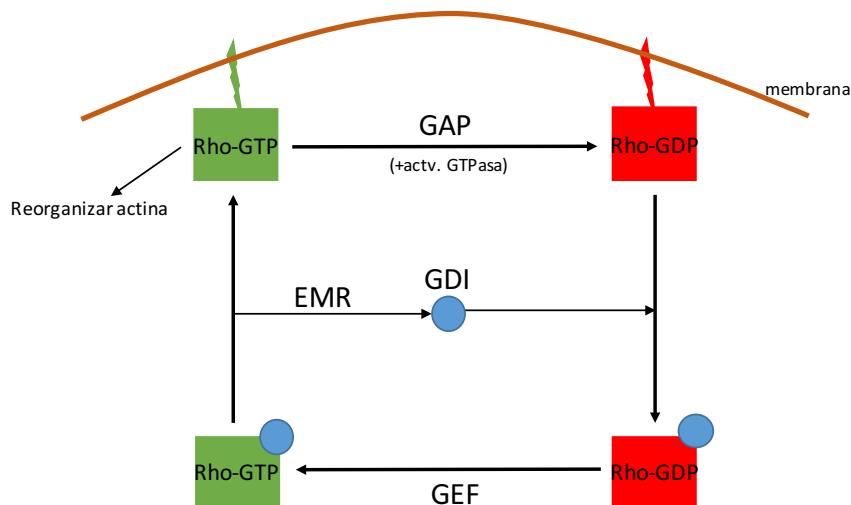


Figura 15. Ciclo de las GTPasas

4.4.2. Bloqueo de la respuesta inflamatoria.

Tras la infección de los macrófagos por *Yersinia enterocolitica*:

(1) Bid (proteína pro-apoptótica de la familia de las Bcl-2) es liberada gracias a la caspasa 8 (activada) en su forma truncada y activada (tBid). La proteína tBid provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria que activa a Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) que a su vez activa a la caspasa 9. Debido a esto, las caspasas 3 y 7 son activadas y promueven la apoptosis.

Se piensa que YopP/J activa la apoptosis por una o dos rutas, o bien evitando la liberación de factores anti-apoptóticos (2) o bien por una ruta más directa no conocida (3).

- (2.1) YopP/J inhibe la migración hacia el núcleo de NF-κB inhibiendo la fosforilación de IκB (Inhibidor de NF-κB). La fosforilación se inhibe porque se fosforila IKKβ (quinasa de IκB).
- (2.2) YopP/J también inhibe la ruta de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), lo hace inhibiendo las MAPK quinasas anteriores (MEKs).

Como resultado de estas dos inhibiciones (2.1 y 2.2) los activadores de la transcripción CREB (*c-AMP response element binding protein*), ATF-1 (*activating transcription factor*) y NF-κB no pueden estimular la transcripción de los genes implicados en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión.

YopP/J parece ser una proteasa, posiblemente una de la familia de las de-SUMOladadoras (SUMO: “*small ubiquitin related modifier*”), pero no se conoce cómo la actividad proteasa conduce a la inhibición de las dos rutas, NF-κB y MAPK.

(4) La interacción de LPS (lipopolisacáridos) u otras señales bacterianas con un RTK (receptor tirosín-quinasa) no identificado conduce a que la proteína PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa) sea reclutada a la membrana. La PI3K activada fosforila a lípidos fosfoinositidos, permitiendo así que en la membrana encontramos PtdIns(3)Ps (Fosfatidilinositol 3 fosfato). Estos lípidos reclutan a su vez otras proteínas como PDK-1 (*phosphoinositide dependent kinase-1*) que fosforila y activa Akt (protein-kinasa B). La Akt activada fosforila otras proteínas que controlan la síntesis de MCP1 (*monocyte chemotactic protein 1*).

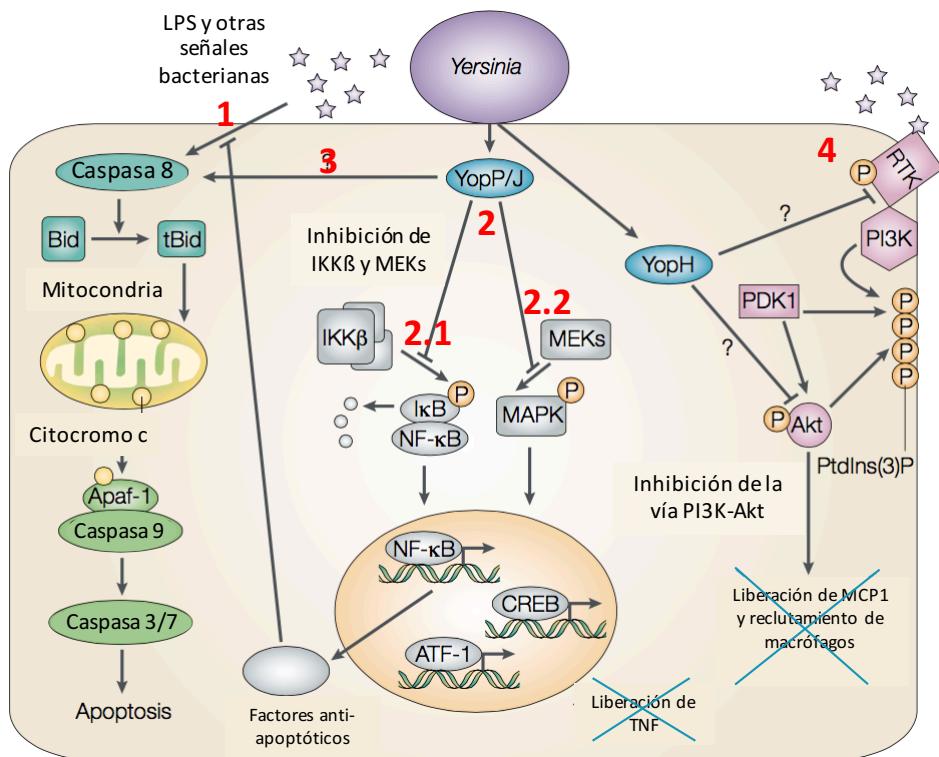


Figura 16. Acción antiinflamatoria de YopP/J y YopH. Modificada a partir de figura en Cornelis (2002).

Dos efectores intracelulares (YopP y YopH) se han encontrado que son capaces de contrarrestar la respuesta pro-inflamatoria de las células.

- **YopP:**

- reduce la liberación de:
 - TNF (“tumour-necrosis factor”) (ver Caja 2) por los macrófagos
 - IL-8 por células epiteliales y endoteliales.
- Reduce la presentación de moléculas de adhesión, tales como ICAM1 (“intercellular adhesion molecule 1”) y E-selectina en la superficie de células endoteliales, y esto probablemente reduce el reclutamiento de PMNs al sitio de infección.

Todos estos eventos son la consecuencia, en parte, de la inhibición de la activación de NF-κB (un factor transcripcional que es central para desencadenar la inflamación). La inhibición de la activación del NF-κB es provocada por YopP al inhibir a la NF-κB quinasa β ($\text{IKK}\beta$) –una quinasa que fosforila al inhibidor de NF-κB ($\text{I}\kappa\text{B}$) (Fig. 16). Dentro de la vía NF-κB, $\text{IKK}\beta$ es un activador y ejerce su efecto fosforilando al inhibidor $\text{I}\kappa\text{B}$, que como consecuencia sufre ubiquitinación y degradación. La degradación de $\text{I}\kappa\text{B}$ deja expuesta la señal de localización nuclear de NF-κB y éste se transloca al núcleo para activar la

transcripción. Al impedir la fosforilación de I κ B, YopP impide la degradación de I κ B y, de esta forma, la traslocación de NF- κ B al núcleo (Fig. 16).

Además de actuar sobre la vía NF- κ B, YopP también inhibe vías de MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) mediante la inhibición de **MEKs** (“MAPK kinases”) que se encuentran por encima en la vía de señalización (Fig. 16). Como resultado de estos efectos inhibitorios, activadores transcripcionales tales como la proteína CREB (“cAMP-response-element-binding”) y el factor ATF-1 (“activating transcription factor 1”), al igual que NF- κ B, no pueden estimular la transcripción de los genes implicados en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y de moléculas de adhesión.

- Por otro lado, se ha demostrado que **YopH** previene la síntesis de MCP1 por los macrófagos infectados (Fig. 16). Esta inhibición tiene un papel crucial durante la infección al inhibir el reclutamiento de macrófagos a los nódulos linfáticos.

CAJA 2

El TNF- α es una citoquina pro-inflamación y desempeña un papel central en el desarrollo de una respuesta inmunitaria frente a la infección. Secretado principalmente por los macrófagos, el TNF- α actúa sobre varios tipos de células implicadas en los mecanismos de defensa del hospedador. Estimula la actividad microbicida de macrófagos y PMN y actúa sobre las células NK junto con la IL-12 para provocar la liberación de IFN- γ , que adicionalmente aumenta la actividad microbicida de los macrófagos. Además, el TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales y es quimiotáctico para monocitos, contribuyendo así a la amplificación de la actividad microbicida de macrófagos.

4.4.3. Inducción de apoptosis en macrófagos.

Estudios pioneros en 1986 pusieron de manifiesto que los macrófagos de ratón mueren tras 4-6 horas tras la infección con *Y. pestis* o *Y. pseudotuberculosis*. Posteriormente se vio que una cepa de *Y. pestis* carente del plásmido pCD1 no fue capaz de matar a los macrófagos. En 1997, se describió que los macrófagos infectados por *Yersinia* mueren de apoptosis.

En 2001, se detectó que en los macrófagos infectados por *Yersinia* se producía la rotura de la proteína Bid (un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2), un sustrato específico de la caspasa-8, lo que

sugirió que era la activación de la caspasa 8 una de las etapas iniciales de la muerte inducida en macrófagos infectados por *Yersinia*. tBid, el producto de degradación de Bid, induce la liberación de citocromo c por la mitocondria. La liberación del citocromo c promueve el ensamblaje del “apoptosoma”, la rotura y activación de la caspasa-9, y finalmente la activación de las caspasas ejecutantes 3 y 7 que producen la muerte celular (Fig. 16).

YopP (YopJ en *Y. pestis*) es requerida por las tres especies patogénicas de *Yersinia* para inducir apoptosis en macrófagos. Sin embargo, esta proteína no induce apoptosis en otros tipos celulares.

Como se indicó arriba, YopP inhibe las vías de señalización que operan a través de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK, “mitogen-activated protein kinases”) y por el factor de transcripción NF-κB. Sobre esta base, se ha postulado que YopP induce apoptosis a través de bloquear las proteínas antiapoptóticas que están bajo el control de NF-κB.

Teniendo en cuenta que YopP parece actuar bloqueando las proteínas antiapoptóticas inducidas por la activación del factor NF-κB, es necesario implicar la presencia de un factor apoptótico asociado a la infección por *Yersinia*. Esta molécula podría ser el LPS, un componente de la pared celular de todas las bacterias Gram-negativas. Estudios preliminares han puesto de manifiesto que los macrófagos expuestos a LPS mueren de apoptosis si se bloquea la síntesis de proteínas. LPS estimula la muerte de los macrófagos a través de su interacción con TLR4; sin embargo, esta muerte puede ser inhibida a través de la síntesis de factores antiapoptóticos que se encuentran bajo el control transcripcional de NF-κB. Hay que tener en cuenta, que el LPS es un inductor de una respuesta pro-inflamatoria mediada a través de señalización por el factor NF-κB. De hecho, los macrófagos deficientes en TLR4 son menos sensibles a la apoptosis inducida por *Yersinia*. Entre los inhibidores de la apoptosis que son regulados por NF-κB están: c-FLIP, que interfiere con la activación de la caspasa-8; miembros de la familia Bcl-2, que inhiben la apoptosis al impedir la despolarización de la mitocondria y la liberación de citocromo c.

Así, en conjunto, estas Yops están dedicadas a frustrar al macrófago, por un lado bloquean su aparato de fagocitosis y, por otro, lo inducen a suicidarse.

4.5. YadA.

La proteína YadA está constituida por un homotrímero cuyas subunidades se encuentran ancladas a la membrana externa. Su estructura en forma de “piruleta” cubre la superficie entera de la bacteria, aportándole propiedades hidrofóbicas. Forma una matriz fibrilar sobre la superficie de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, cuando son cultivadas a 37°C.

YadA es una proteína de adhesión codificada en el plásmido de virulencia. YadA se considera un factor de virulencia para *Y. enterocolitica*, pero parece ser dispensable para la virulencia de *Y. pseudotuberculosis*. En el caso de *Y. pestis*, el gen *yadA* presenta una delección de una sola base que cambia el marco de lectura y silencia el gen. Además, al expresar en *Y. pestis* el gen *yadA* de *Y. pseudotuberculosis* se vio que se reducía su virulencia. Se considera una proteína multifacética que tiene diversas funciones biológicas.

El nombre YadA fue dado por "Yersinia adhesin", dado que su presencia hace a la bacteria adherente a las células epiteliales. YadA es también responsable de una marcada autoaglutinación, permitiendo que las bacterias establezcan colonias en los sitios donde se van a multiplicar. Se trata de una proteína muy abundante que interacciona con las fibras de colágeno y la fibronectina, con las que establece uniones muy fuertes que permiten que la bacteria permanezca y pueda formar colonias en lugares como los nódulos linfáticos, por los que *Yersinia* presenta tropismo.

Aunque estas propiedades tienden a sugerir que YadA podría ser un factor de colonización, algunas observaciones indican que, al menos en *Y. enterocolitica*, YadA desempeña un papel mayoritario en la defensa frente a la respuesta inmunitaria no específica. De hecho, YadA se une a C4BP y al factor H (proteínas reguladoras del complemento presentes en nuestro suero), que reduce la deposición de C3b en la superficie de *Y. enterocolitica* (Fig. 17). Esto tiene dos consecuencias: (1) inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana del complemento, lo que inhibe la muerte de la bacteria; (2) impide la opsonización, lo que drásticamente reduce la fagocitosis y muerte por leucocitos polimorfonucleares.

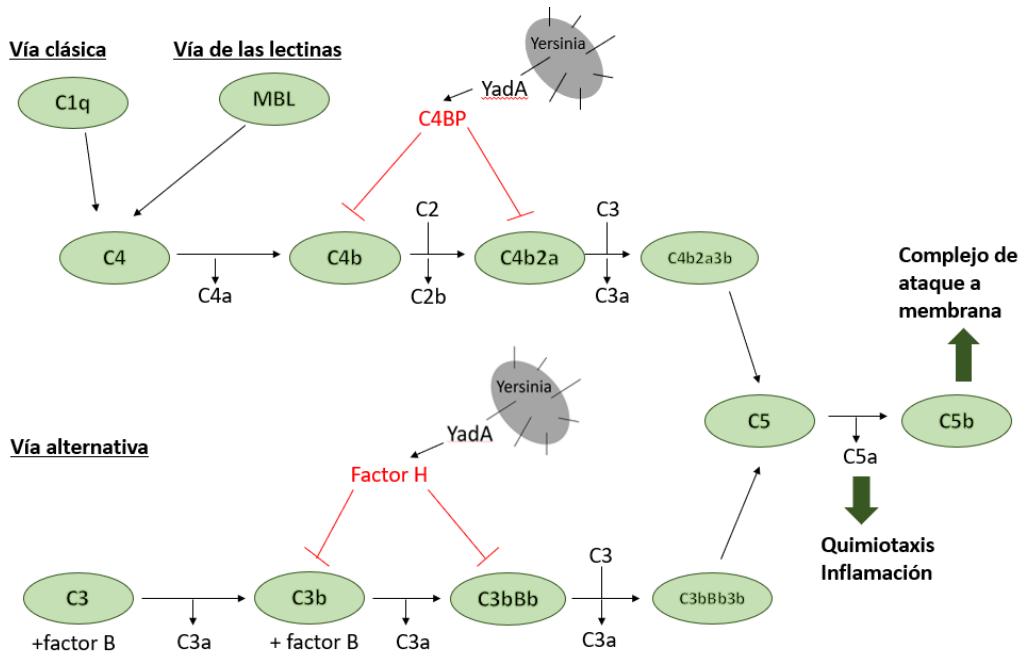


Figura 17. Interacción y reclutamiento de las proteínas inhibidoras del complemento C4BP y factor H por parte de la proteína bacteriana YadA. C4BP inhibe la progresión de la vía clásica y de las lectinas, mientras que el factor H interfiere en la vía alternativa.

5. Regulación de los genes de virulencia.

En 1986 mediante estudios de mutagénesis con el transposón Tn5 en *Y. pestis* identificaron el gen *lcrF* como un locus responsable de la activación transcripcional de los genes *yop*. Posteriormente, se descubrió el homólogo en *Y. enterocolitica* que se denominó *virF*. El gen *virF*, codificado en el plásmido de virulencia, regula la expresión de proteínas del sistema de secreción tipo III, tanto estructurales como efectoras. Concretamente, codifica un activador transcripcional de 30-kDa que controla la expresión de los genes *yop*, de *yadA* y también del operón *virC* (donde se encuentran los genes *Ysc*, que codifican para las proteínas que forman el inyectosoma), además de su propia síntesis (se regula positivamente a sí mismo). La proteína VirF pertenece a la familia AraC de reguladores. Esta larga familia incluye reguladores de las vías degradativas en *E. coli* al igual que reguladores implicados en el control de virulencia de *Shigella*, *Yersinia* y *Pseudomonas*.

VirF actúa como una proteína de unión a DNA. Experimentos de “footprinting” con DNaseI mostraron que VirF se une en una región de los promotores de los genes *yopE*, *yopH*, *virC* y otros, unos 40-pb por encima del sitio de unión de la RNA polimerasa.

La transcripción de los genes *yop* y *vir*, incluyendo *virF*, es fuertemente termodependiente. *VirF* hace que solo a 37°C se expresen los genes de virulencia, ya que solo en esos momentos la bacteria los va a necesitar. Esto es una característica común a la mayoría de los patógenos. Uno de los factores que actúa de activador de los genes de virulencia es la temperatura. Además, se vio que la transcripción del gen *virF* clonado en una cepa de *Y. enterocolitica* curada del plásmido pYV es termodependiente, lo que indica que *virF* es en sí termorregulado por un gen cromosomal.

De hecho, se sabe que la presencia de *VirF* por sí sola no es suficiente para llevar a cabo la activación. Esto se vio transformando a *Yersinia* con un plásmido que expresa *virF* bajo el control de un promotor distinto, que permite la expresión de la proteína a temperatura normal. En ese caso, aunque hay mucha cantidad de *VirF*, el nivel de activación de los genes de virulencia es mínimo (los genes *yop* y *yadA* son transcritos pobremente y no se traducen las Yops). Esta transcripción pobre a 25°C del regulón *yop* en presencia de *VirF* puede ser debida a una conformación inadecuada del promotor.

Experimentos de mutaciones con transposones pusieron de manifiesto un gen modulador, situado en el cromosoma, que se llamó *ymoA* (por "Yersinia modulator"). Este gen codifica una proteína de 8064 daltons extremadamente rica en residuos cargados positiva y negativamente.

Parece ser que la temperatura desempeña un papel adicional en la regulación de estos genes. La hipótesis más probable es que la temperatura, de alguna forma, podría modificar la estructura de la cromatina, haciendo que los promotores sean más accesibles a *VirF*. Datos experimentales sugieren que *YmoA* interacciona con las regiones promotoras tanto de *virF* como de los genes *yop*, e impide la activación transcripcional por parte de *VirF*. La temperatura alteraría el superenrollamiento del DNA, y este cambio en la estructura y curvatura del DNA permitiría quizás que el represor *YmoA* se retirase de las regiones promotoras de los genes regulados por *VirF*. (Fig. 18)

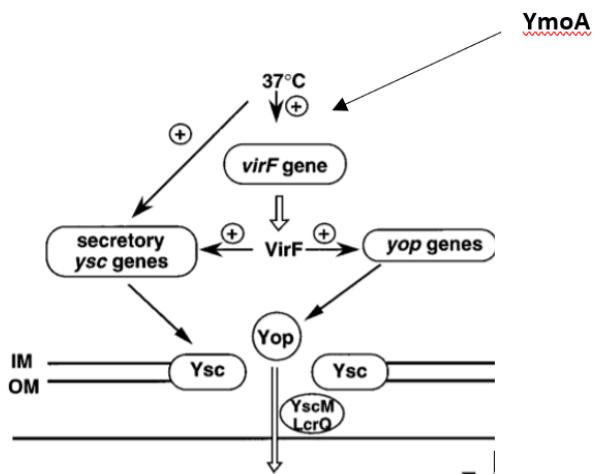


Figura 18. Representación esquemática del circuito que regula la transcripción de los genes *yop* y *ysc*. IM, membrana interna; OM, membrana externa. Obtenida de Cornelis (1998).

6. Bibliografía:

- Baldwin, M.R. and Barbieri, J.T. (2005) The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 291: 147-166.
- Bos KI, Schuenemann VJ, Golding GB, Burbano HA, Waglechner N, Coombes BK, McPhee JB, DeWitte SN, Meyer M, Schmedes S, Wood J, Earn DJ, Herring DA, Bauer P, Poinar HN, Krause J. (2011). A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. Nature 12;478(7370):506-10
- Carniel, E. (2002) Plasmids and pathogenicity islands of *Yersinia*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 264: 89-108.
- Cornelis, G.R. (1994) *Yersinia* pathogenicity factors. Cur. Top. Microbiol. Immunol. 192: 243-263.
- Cornelis, G.R. (2000) Molecular and cell biology aspects of plague. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8778-8783.
- Cornelis, G.R. (2002) The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3: 742-752.
- Cornelis, G.R. (2002) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. J. Cell Biol. 158: 401-408.
- Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. Nat Rev Microbiol 4: 811-825.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.-P. and Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1315-1352.
- Cornelis Guy R., Boland Anne, Boyd Aoife P., Geuijen Cecile, Iriarte Maite, Neyt Cécile, Sory

Marie-Paule and Stainer Isabelle (1998) The Virulence Plasmid of *Yersinia*, and Antihost Genome. Microbiology and Molecular Biology Reviews.

- **Donnenberg, M.S.** (2000) Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406: 768-774.
- **Grassl Guntram A., Bohn Erwin, Müller Yvonne, Bühl Oliver T., Auterieth Ingo B.** (2003) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: beyond invasión. *International Journal of Medicine Micobiology* 293, 51-54.
- **H.W. Freeman and Company.** 2008. Molecular Cell Biology. Sixth edition.
- **Isberg, R.R.** (1996) Uptake of enteropathogenic *Yersinia* by mammalian cells. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 209: 1-24.
- **McEvedy, C.** (1988) La Peste Negra. *Investigación y Ciencia* 139: 82-87.
- **Mikulskis Alvydas V., Delor Isabelle, Vinh Ha Thi and Cornelis Guy R.** (1994) Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence os growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Molecular Microbiology* 14(5), 905-915
- **Ramamurthi, K.S. and Schneewind, O.** (2003) Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol. Microbiol.* 50: 1095-1102.
- **Raoult D, Mouffok N, Bitam I, Piarroux R, Drancourt M.** (2013). Plague: history and contemporary analysis. *Journal of Infection* 66(1): 18-26
- **Spyrou MA, Tukhbatova RI, Feldman M, Drath J, Kacki S, Beltrán de Heredia J, Arnold S, Sitzdikov AG, Castex D, Wahl J, Gazimzyanov IR, Nurgaliev DK, Herbig A, Bos KI, Krause J.**(2016). Historical Y. pestis Genomes Reveal the European Black Death as the Source of Ancient and Modern Plague Pandemics. *Cell Host Microbe* 8;19(6): 874-81
- **Viboud, G.I. and Bliska, J.B.** (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 69-89.
- **Zhang, Y. and Bliska, J.B.** (2005) Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of *Yersinia*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289: 151-173.

En la red:

- Vídeo explicativo sobre la Peste Negra y los avances logrados por el grupo de Johannes Krause en la identificación del genoma de *Yersinia* (Nature video)
<https://www.youtube.com/watch?v=pRZYb2Jl22g>