

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Resistencia a Cefalosporinas en *Enterococcus* spp.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Carrilero Aguado

Director

Bruno González Zorn

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



Resistencia a Cefalosporinas en *Enterococcus* spp.

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

Laura Carrilero Aguado

Director: Bruno González Zorn

Tabla de contenidos

Índice de Figuras	3
Índice de Tablas	5
Abreviaturas utilizadas en esta Tesis	7
Resumen / Summary	8
Resumen	9
<i>Summary</i>	14
Introducción	19
Introducción	20
Género <i>Enterococcus</i>	20
Los antibióticos	48
Sistema SOS	77
Descubrimiento	77
Mecanismo general: Regulación básica, objetivos y estrategias	78
Estímulos desencadenantes de la respuesta SOS	82
Funcionamiento del regulón SOS	87
El sistema SOS en bacterias Gram positivas	103
Importancia del sistema SOS en la virulencia	104
Justificación y Objetivos	106
Justificación y Objetivos	107
Resultados	109
Resultados	110
Capítulo primero: Caracterización de la relación entre la respuesta SOS y la resistencia a antibióticos en <i>Enterococcus faecalis</i>	110

Capítulo segundo: Estudio del regulón SOS y de los determinantes de resistencia a cefalosporinas	126
Discusión	143
Discusión	144
Visión integrada	186
Materiales y Métodos	190
Materiales y Métodos	191
Capítulo primero: Caracterización de la relación entre la respuesta SOS y la resistencia a antibióticos en <i>Enterococcus faecalis</i>	191
Capítulo segundo: Estudio del regulón SOS y de los determinantes de resistencia a cefalosporinas	202
Conclusiones	213
Conclusiones	214
Material Suplementario	217
Bibliografía	239
Bibliografía	240

Índice de Figuras

Figura 1: Árbol filogenético del género <i>Enterococcus</i>	23
Figura 2: Loci CRISPR/Cas y resistencias a antibióticos adquiridas en la bacteria <i>E. faecalis</i>	31
Figura 3: El tracto gastrointestinal y las infecciones enterocócicas.....	35
Figura 4: Logo de la caja de unión Cop en <i>Enterococcus faecalis</i>	45
Figura 5: Homeostasis del cobre y operón Cop en <i>E. hirae</i>	46
Figura 6: Dibujo esquemático de la organización modular de los transportadores tipo ABC.....	48
Figura 7: Nuevos agentes antibacterianos aprobados en EEUU desde 1983 a 2007 en periodos de 5 años	50
Figura 8: Principales mecanismos de resistencia a antibióticos en el género <i>Enterococcus</i>	60
Figura 9: Ruta biosintética de la pared bacteriana.....	65
Figura 10: Estructura química del anillo beta-lactámico, de las penicilinas (núcleo penam) y de las cefalosporinas (núcleo cepem)	70
Figura 11: Biosíntesis del peptidoglicano	76
Figura 12: Representación de la inducción del sistema SOS en <i>E. coli</i>	79
Figura 13: Estímulos inductores de la respuesta SOS	83
Figura 14: Caja LexA descrita para firmicutes	104

Figura 15: Resistencia a diferentes intensidades de luz ultravioleta	110
Figura 16: Estructura de las metoxi-iminocefalosporinas	111
Figura 17: Efecto de la inducción del sistema SOS en la concentración mínima inhibitoria de ceftriaxona en <i>E. faecalis</i> JH2-2	114
Figura 18: Efecto de la inducción del sistema SOS en la CMI de ciertas cefalosporinas en <i>L. ivanovii</i>	116
Figura 19: Efecto de la inducción del sistema SOS en la CMI de cefuroxima en la especie <i>E. faecium</i> determinada mediante E-test	120
Figura 20: Log ₁₀ de las UFCs presentes en cada par de riñones.....	125
Figura 21: Logo de la caja de unión LexA identificada para <i>Enterococcus faecalis</i> V583	127
Figura 22: Expresión relativa de los genes que codifican las proteínas descritas hasta ahora como importantes en la resistencia intrínseca a cefalosporinas	136
Figura 23: Genes en los que se ha insertado el transposón y las unidades transcripcionales de las que forman parte.....	138
Figura 24: Efecto de la adición de CuSO ₄ en la CMI a cefuroxima en el mutante JH2-2LexAind y el mutante de <i>copA</i>	141
Figura 25: Efecto de 1,4 mM de CuSO ₄ en la CMI a cefuroxima	142
Figura 26: Factores implicados en la resistencia intrínseca a cefalosporinas y estímulos que la revierten.....	185
Figura 27: Esquema del tratamiento seguido en el ensayo <i>in vivo</i>	201

Índice de Tablas

Tabla 1: CMI determinada para las cepas de <i>E. faecalis</i> V583 y JH2-2 y los diferentes mutantes construidos en ellas.....	113
Tabla 2: Concentración y calidad de la reversión de la resistencia inducida por diferentes compuestos	115
Tabla 3: Efecto de la inducción del sistema SOS en la resistencia a cefalosporinas en <i>E. faecalis</i> V583 y JH2-2 y en <i>L. ivanovii</i>	118
Tabla 4: Efecto de la inducción del sistema SOS en los antibiogramas realizados frente a algunas cefalosporinas en <i>E. faecalis</i> V583 y en <i>E. faecium</i>	119
Tabla 5: Resistencia a antibióticos de cepas de <i>E. faecium</i> de la India.....	121
Tabla 6: Fenotipo de reversión de la resistencia de las cepas clínicas de Holanda en presencia de mitomicina C	123
Tabla 7: Genes cuya expresión se encuentra aumentada respecto a su expresión en la cepa V583 WT.....	129
Tabla 8: Genes cuya expresión se encuentra disminuida respecto a su expresión en la cepa V583 WT.....	130
Tabla 9: Tendencia de la expresión de los profagos en V583 LexA ⁻ respecto a la cepa V583 WT	130
Tabla 10: Resultados de los antibiogramas realizados con V583 WT y JH2-2 en BHI y en BHI con 10 µg/ml de fosfomicina	133
Tabla 11: Genes en los que se ha integrado el transposón	137
Tabla 12: La presencia de cobre induce sensibilidad a ciertas cefalosporinas en la cepa de <i>E. faecalis</i> JH2-2.....	139
Tabla 13: La presencia de cobre induce sensibilidad a ciertos antibióticos en <i>E. faecium</i>	140

Tabla 14: La presencia de cobre puede inducir la sensibilidad a ciertos antibióticos en aislados clínicos de <i>E. faecium</i>	140
Tabla 15: Homología entre las PBPs de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	148
Tabla 16: Cepas utilizadas en el capítulo 1A	191
Tabla 17: Cepas utilizadas en el capítulo 1B.....	192
Tabla 18: Cepas utilizadas en el capítulo 1C.....	193
Tabla 19: Oligonucleótidos utilizados en el capítulo 1.....	196
Tabla 20: Plásmidos utilizados en el capítulo 1.....	196
Tabla 21: Cepa inoculada, tratamiento administrado y número de individuos del experimento <i>in vivo</i>	201
Tabla 22: Cepas utilizados en el capítulo 2.....	203
Tabla 23: Plásmidos utilizados en el capítulo 2	205
Tabla 24: Oligonucleótidos utilizados en el capítulo 2	206
Tabla 25: Presión antibiótica, diluciones sembradas y objetivos de las placas sembradas para la realización de la librería por transposición.....	210
Tabla 26: Presión antibiótica las placas en las que se replican los mutantes por transposición ...	210

Abreviaturas utilizadas en esta Tesis

- ABC: *ATP-Binding Cassette*, casete de unión a ATP
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: Adenosín trifosfato
- CC: *clonal cluster*, complejo clonal
- CGH: *comparative genome hybridization*, hibridación comparativa
- CLSI: *clinical and laboratory standard institute*, instituto de estándares clínicos and de laboratorio
- CMI: concentración mínima inhibitoria
- Col.: colaboradores
- EEUU: Estados Unidos
- E. g.: exempli gratia*
- Et al.: et alli* (y colaboradores)
- MLST: *multi locus secuencia typing*, tipificación multilocus de secuencias
- Nt: nucleótido
- PCR: polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
- Spp: especie
- SSB: *Single Strand Binding protein*, proteína de unión a hebra sencilla
- ST: *secuencia type*, secuencia tipo
- UE: Unión Europea
- UFCs: unidades formadoras de colonias
- WT: *wild type*, cepa silvestre

Resumen / *Summary*

Resumen

Los enterococos son cocos gram positivos, catalasa-negativos y anaerobios facultativos que se presentan de manera individual, en parejas o en cadenas cortas. El género *Enterococcus* incluye la especie *Enterococcus faecalis*, uno de los patógenos nosocomiales más importantes actualmente. *E. faecalis* puede dar lugar a infecciones de heridas, tejidos blandos y el tracto urinario. Dan lugar a cuadros de bacteriemia lo que, en caso de un daño previo de las válvulas cardiacas, puede desembocar en un proceso de endocarditis. Se han identificados varios factores como importantes en la patogénesis de la bacteria, aunque aún no se ha esclarecido el modo en el que esta bacteria pasa del comensalismo a la patogenicidad. Además, esta bacteria suele ser portadora de determinantes de resistencia tanto intrínsecos como adquiridos. Un tratamiento con cefalosporinas, a las que el enterococo es intrínsecamente resistente, supone un factor de riesgo para la adquisición de una infección enterocócica.

La resistencia intrínseca a cefalosporinas es una de las más interesantes de las que presenta el enterococo. Se han identificado varios factores importantes para esta resistencia, pero la relación entre ellos y sus efectores permanecen sin dilucidar.

El regulón SOS es una respuesta global de la bacteria ante un daño en su material genético. Se trata de una respuesta altamente coordinada para enfrentar las lesiones en el material genético mediante los procesos de recombinación, reparación del ADN, síntesis de translesión y la detención del ciclo celular para evitar la división celular si el material genético está dañado.

Los objetivos de este trabajo son caracterizar la respuesta SOS de *E. faecalis*, estudiar la implicación de la respuesta SOS en el perfil de resistencia a antibióticos y arrojar luz sobre el mecanismo de la reversión de la resistencia intrínseca dependiente de la respuesta SOS.

El estudio de la respuesta SOS en los mutantes de inserción para los genes *lexA* y *recA* y para el mutante de *lexA* que no es posible lisar es compatible con una respuesta SOS clásica regulada por las proteínas LexA y RecA en esta bacteria. El mutante de inserción en el gen *lexA*, que tiene la respuesta SOS constitutivamente activada, es sensible a cefalosporinas. En presencia de mitomicina C, un agente alquilante que provoca roturas en el ADN que por tanto induce la respuesta SOS, las especies *E. faecalis*, *E. faecium* y *L. ivanovii* son sensibles a cefalosporinas. Se estudió este fenómeno en dos cepas diferentes de *E. faecalis*, V583 y JH2-2, en las que se han construido mutantes de inserción para *lexA*.

In vivo la inducción de la sensibilidad en las bacterias silvestres se realizó administrando a un modelo murino una combinación de ceftriaxona y levofloxacin, una fluoroquinolona que induce la respuesta SOS.

Se realizó un estudio de la expresión génica de las cepas V585 WT y su mutante V583 LexA-, que presenta el sistema SOS constitutivamente inducido, para identificar el regulón SOS y determinar el mecanismo mediante el que se revierte la resistencia a cefalosporinas. En el regulón SOS se han identificado genes que también forman parte del regulón SOS de otras bacterias, como son genes implicados en la recombinación y reparación del ADN. También presenta peculiaridades como la falta en la respuesta SOS de un inhibidor de la división celular y de una proteína de unión a hebra simple.

Ninguno de los determinantes genéticos descritos como importantes en la resistencia intrínseca a cefalosporinas presenta una gran variación en su expresión génica. Ésta expresión también se estudió mediante PCR cuantitativa. El patrón de expresión es diferente entre las cepas V583 y JH2-2, por lo que estos factores no parecen implicados en el fenómeno. La reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas observada en un mutante de V583 al que se le habían delecionado los fagos descarta la implicación de los mismos en la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas.

Se realizó una librería de inserción por transposición a fin de identificar determinantes genéticos implicados en la reversión de la resistencia. Seleccionamos los mutantes que en presencia de mitomicina C permanecían resistentes.

Mediante esta técnica se identificaron dos transportadores de glutamina. Uno de ellos está regulado por el sistema de dos componentes CroR/S, implicado en la Resistencia intrínseca a cefalosporinas. El otro transportador de glutamina forma parte del regulón SOS.

También se identificaron un sistema transportador de cationes y un sistema transportador de péptidos. Éste último es homólogo a Opp, implicado en el transporte de péptidos de la pared. En un mutante por transposición la expresión de la proteína RecO, necesaria para la inducción de la respuesta SOS, está presumiblemente alterada.

Finalmente en nuestra librería identificamos un mutante de inserción para el gen *copY*, el primer gen del operón Cop. Este operón está implicado en la homeostasis del cobre. Hay una caja Cop delante de un gen que codifica para una proteína de unión a hebra sencilla. Estas proteínas de unión a hebra sencilla participan en la inducción del sistema SOS.

Sorprendentemente, la presencia de cobre en las cepas silvestres de *E. faecalis* y *E. faecium* produce el mismo perfil de antibiorresistencia que la mitomicina C. En un mutante de inserción en el segundo gen del operon, en el cual el gen *copY* es el

único del operón que se expresa, la reversión de la resistencia a cefalosporinas sólo ocurre con mitomicina C. Esto sugiere que, de las proteínas codificadas por el operón, es el regulador transcripcional CopY el que está implicado en la reversión intrínseca a cefalosporinas.

Summary

Enterococcus spp. are facultatively anaerobic, catalase-negative Gram-positive cocci, arranged individually, in pairs, or short chains. Enterococci include one of the most important nosocomial pathogens, *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* can be responsible for infections of wounds, soft tissue and the urinary tract. In some cases they produce bacteremia which can lead to endocarditis in previously damaged cardiac valves. Several factors have been identified as important in the pathogenesis of the bacteria. Nevertheless, it remains unclear how this commensal bacteria evolved into an insidious pathogen. In addition, *Enterococcus faecalis* harbours a large amount of both intrinsic and acquired antibiotic resistance determinants. In fact, the administration of cephalosporins is a risk factor for the acquisition of an enterococcal infection.

Among the different antibiotic resistance phenotypes that the bacteria display, one of the most fascinating resistance mechanism is the intrinsic resistance to cephalosporins. Various important factors important for this intrinsic resistance have been identified, but the relationships between them and their upstream and downstream effectors remain unknown.

The SOS regulon is a global response of the bacteria to damaged DNA. It is a highly coordinated response to address the DNA damage mediated by recombination, DNA repair, translesion synthesis and cell division arrest, in order to avoid the cell division until the genetic material is repaired.

The objectives of this work are to characterize the SOS response of *E. faecalis*, study the implication of the SOS response on the antibiotic resistance profile and to elucidate the reversion of the intrinsic resistance to cephalosporins upon the induction of the SOS response.

Mutants for LexA, RecA and an uncleavable LexA variant in *E. faecalis* demonstrated a phenotype compatible with a typical SOS response in this bacterium, mediated by the two main proteins LexA and RecA. Interestingly, the LexA mutant was susceptible to cephalosporins. We saw that under the effect of mitomycin C, a potent DNA crosslinker that leads to breaks in the DNA inducing the SOS response, *E. faecalis*, *E. faecium* and *L. ivanovii* became sensitive methoxyimino cephalosporins.

As this phenomenon is caused by the SOS response, two LexA defective mutants in two different genetic backgrounds in *E. faecalis* result in an identical phenotype. *In vivo*, we mimic this effect by treating mice with a combination of

levofloxacin, an SOS response inducing fluoroquinolone, and ceftriaxone, a Methoxymino cephalosporin.

In order to identify the SOS regulon and to determine the mechanism by which the resistance is reverted we conducted a transcriptomic study of a wild type *E. faecalis* and its LexA⁻ mutant. We demonstrated that the SOS response involved some known genes also described in the SOS response of other bacteria, such as genes involved in repair and recombination of DNA. It also displays peculiarities, such as the lack of both a cell division inhibitor in the genome and a single strand binding protein (SSB) in the regulon.

None of the genetic determinants thought to be required for the intrinsic resistance to cephalosporins, e. g., *murAA*, *croR/S*, *IreK/P*, low affinity *pbp* or *rpoB*, showed significant variations in their expression levels. These results were validated by quantitative PCR. To rule out the involvement of phages we also conduct resistance profiles in a phage-free bacteria (bacteria lacking phages).

To decipher the mechanism of the resistance reversion, we performed a random insertion library by transposition. Subsequently we selected the mutants that remain resistant in the presence of mytomicin C, whereby we identified several interesting transcriptional units.

With these results we proceeded to disrupt two ABC type amino acid transporters implicated in the uptake of glutamine. Intriguingly, one of these transporters is regulated by the CroR/S two component system implicated in the intrinsic resistance to cephalosporins, while the other transporter is a component of the SOS regulon.

Additionally we identified both a cation and a peptide transporter system from the random insertion library. This peptide transporter has homology with the Opp family, implicated in the transport of cell wall peptides.

The expression of the RecO protein, required for the induction of the SOS response, is affected by an upstream transposon insertion within its operon.

Finally we disrupted the first gene of the Cop operon, the CopY repressor. This operon is involved in copper homeostasis. There is a copper box upstream of the *ssb-2* gene, a protein involved in DNA metabolism that binds single stranded DNA and therefore participates in the SOS system induction.

Strikingly, the presence of copper in wild type *E. faecalis* and *E. faecium* produces the same resistance profile to cephalosporins as mitomycin C. In an insertion mutant in the second gene of the operon, in which the CopY repressor should be expressed but not CopA and CopZ, the susceptibility to cephalosporins is induced only by mitomycin C but not by copper. This suggests that the effect of

the SOS response on the intrinsic resistance to cephalosporins depends on the CopY repressor.

Further work should be performed to unravel the underlying mechanisms of this phenomenon.

Introducción

INTRODUCCIÓN

Género *Enterococcus*

Características Generales

Los enterococos se encuentran enmarcados en el filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* familia *Enterococcaceae*, que se estableció como tal en el año 1984 al evidenciarse, tras ensayos de hibridación de ADN, que eran diferentes a los *Streptococcus* del grupo D de Lancefield (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984) con los que inicialmente estaban clasificados.

Se trata de cocos Gram positivos, catalasa negativos y anaerobios facultativos que pueden fermentar la glucosa a ácido láctico. Pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y producen bacteriocinas. Se caracterizan por tener un contenido en G+C menor al 50% (Fisher y Phillips, 2009). Son microorganismos robustos capaces de crecer y mantenerse viables en condiciones extremas: su rango de temperatura de crecimiento es de 10 a 45°C, crecen a concentraciones de cloruro de sodio de hasta el 6.5% y a un pH de 9,6, además de sobrevivir a un tratamiento térmico de 60°C de 30 minutos de duración y resistir la presencia de sales biliares. Todo esto permite a los enterococos estar presentes en un gran número de hábitats, tanto bióticos como abióticos, teniendo alta persistencia en los mismos. Se pueden aislar tanto del sistema digestivo de invertebrados como del tracto gastrointestinal de vertebrados, lo que implica que pertenecen al núcleo del

microbioma intestinal desde el último antecesor común de mamíferos, reptiles, aves e insectos, que existió hace unos 400 millones de años, en el periodo devónico (Gilmore *et al.*, 2013). Igualmente se aíslan de la superficie de plantas y de suelo, arena y agua (Giraffa, 2003; MUNDT, 1963). En el agua los enterococos se han utilizado como indicadores de contaminación fecal y de calidad de la misma (Byappanahalli *et al.*, 2012).

Al igual que otras bacterias ácido lácticas, presentan ciertas características metabólicas (actividad proteolítica y esterolítica) deseables en la industria alimentaria como cultivos iniciadores y bacterias participantes en el proceso de maduración de diferentes derivados de productos animales. Se han utilizado en la industria alimentaria como cultivos iniciadores en la maduración de, entre otros productos, el queso feta y la mozzarella (Centeno *et al.*, 1999), ya que en la leche y en productos lácteos tienen una actividad proteolítica y, en menor medida, lipolítica (Wessels *et al.*, 1990). De las diferentes especies de bacterias ácido lácticas que se utilizan como cultivos iniciadores y probióticos, la seguridad de los enterococos es la más controvertida (Eaton y Gasson, 2001). A pesar de que la presencia de factores de virulencia es más frecuente en cepas clínicas de *Enterococcus faecalis*, también se han encontrado, con menor frecuencia, en cepas aisladas de alimentos y más raramente en cultivos iniciadores (Eaton y Gasson, 2001). Tienen potencial para su uso médico a modo de probióticos (Tsai *et al.*,

2004) y moduladores de la respuesta inmune (Zhang *et al.*, 2012a) entre otras aplicaciones, pero debido a su capacidad para producir aminas biógenas, su facilidad para intercambiar material genético (Franz *et al.*, 2003; Ladero *et al.*, 2012) y a que pueden causar procesos infecciosos en determinadas poblaciones, no son organismos generalmente reconocidos como seguros (*Generally Recognized as Safe*, GRAS) (Godfree *et al.*, 1997).

Especies relevantes por su potencial patogenicidad

El género engloba actualmente casi 50 especies (Parte, 2014), de las cuales *E. faecalis* y *E. faecium* son las más frecuentemente aisladas de heces humanas, especialmente la primera (Manson *et al.*, 2008; Noble, 1978). Son parte habitual de la microbiota intestinal y constituyen el 1% de la misma. En humanos también se han encontrado en el tracto genitourinario. Las especies que tienen mayor importancia clínica son principalmente *E. faecalis* y *E. faecium*, ya que son las de mayor incidencia en procesos infecciosos (Gilmore *et al.*, 2013) (**Figura 1**). Los enterococos empezaron a emerger como causa líder en la aparición de infecciones nosocomiales resistentes a antibióticos en las décadas de los 80 y 90 (Huycke *et al.*, 1998; Jett *et al.*, 1994). Datos obtenidos de todo tipo de muestras y todo tipo de hospitales tomadas en EEUU entre 01/01/10 y 30/06/12 han identificado enterococos en 9309 aislados de sangre, 54709 aislados del tracto urinario y 20032 aislados de heridas, dando un total de 84050 aislados clínicos de enterococos. De

todos ellos, el 76% correspondían a *Enterococcus faecalis* y el 24% a *E. faecium*, siendo el 20,6% del total resistentes a vancomicina.

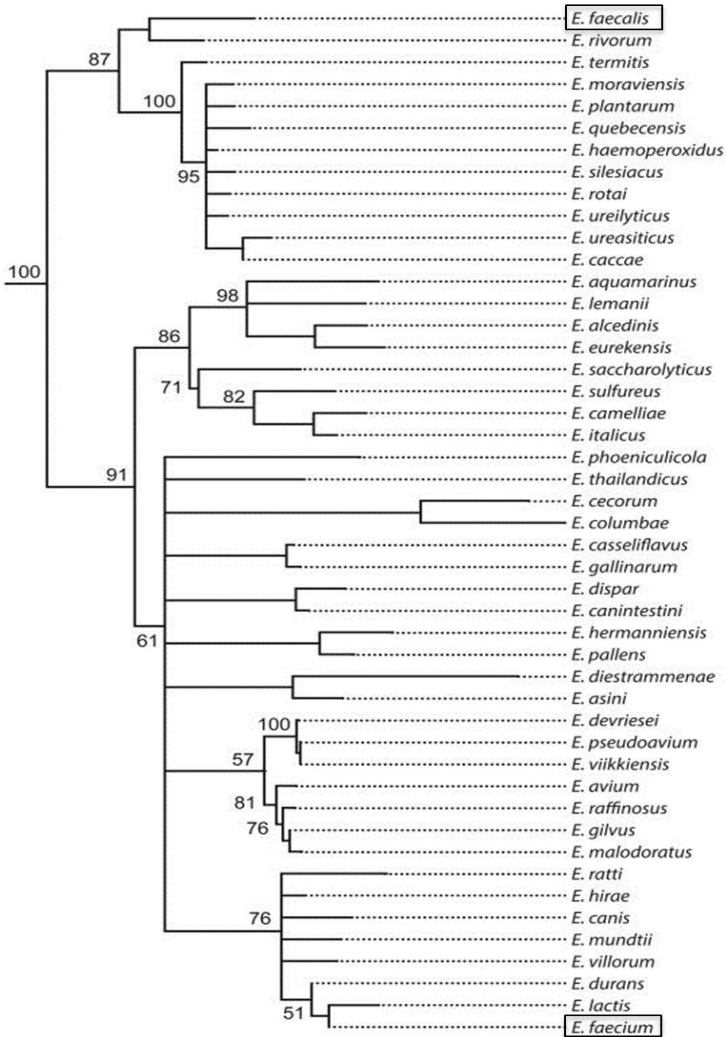


Figura 1: Árbol filogenético del género *Enterococcus*. Adaptado de Van Tyne y Gilmore, 2014 (Paulsen *et al.*, 2003).

De entre los aislados resistentes a vancomicina, la mayoría de ellos (75%) pertenecían a la especie *E. faecium*. Los datos de la Unión Europea son similares (de Kraker *et al.*, 2013; Werner *et al.*, 2008). Parece que las infecciones causadas por *E. faecium* dependen en gran medida de su resistencia a antibióticos de última generación, mientras que en el caso de *E. faecalis* la bacteria parece tener una mayor capacidad infectiva independientemente de su resistencia a antibióticos (Huycke *et al.*, 1998; Mundy *et al.*, 2000).

Filogenia de las cepas de interés clínico

Filogenéticamente, *Enterococcus faecalis* se encuadra en una de las ramas más antiguas del género, mientras que la aparición de *Enterococcus faecium* es más reciente (Van Tyne y Gilmore, 2014). Esto sugiere una cierta estocasticidad en su virulencia, ya que estas dos especies relativamente lejanas dentro del género son capaces de compartir y de causar infección en un entorno relativamente tan reciente como son los hospitales o las unidades de cuidados intensivos, de manera que ciertos rasgos que suponen una ventaja evolutiva en otros ambientes les han permitido sobrevivir en este nicho hostil para los microorganismos. Mientras que *E. faecalis* presenta una mayor capacidad innata para causar procesos clínicos, parece que la capacidad oportunista de *E. faecium* recae principalmente en la resistencia a antimicrobianos de último recurso ya que proliferaría tras un

tratamiento antibiótico. Por ello, conviene tener en consideración ambas especies (Arias y Murray, 2012).

Estas especies, y, más concretamente, los linajes adaptados al ámbito hospitalario, comparten una serie de características que les permiten sobrevivir y causar infección. En las cepas hospitalarias de ambas especies, una serie de elementos auxiliares tienden a converger en elementos genéticos móviles y, de hecho, el genoma de las cepas clínicas tiende a ser de mayor tamaño que el de las cepas comensales (Lebreton *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2010). Además, estas cepas son también únicas en su capacidad de persistencia en el ambiente y en la transmisión paciente-paciente (Arias y Murray, 2012). Debido a su mayor relevancia clínica en este estudio nos hemos centrado en la especie *Enterococcus faecalis*.

Procesos patológicos enterocócicos

Los procesos clínicos en los que se ha visto implicado este género abarcan infecciones de diversa gravedad y pronóstico. En ocasiones se aísla más de un patógeno en dichas infecciones, y no queda claro si el enterococo es causa principal o no de dicha infección. Sin embargo, en casos de septicemia y endocarditis el enterococo sí que es un agente causal importante y se precisa terapia específica para tratar estas infecciones (Hoge *et al.*, 1991). Tradicionalmente se han asociado las infecciones enterocócicas a la microbiota

propia del hospedador, pero se ha demostrado la diseminación de los enterococos de paciente a paciente y entre centros de salud (Dworkin *et al.*, 2006).

Las infecciones más comunes causadas por enterococos son las del tracto urinario. En varones de edad avanzada son frecuentes las infecciones del tracto urinario bajo causadas por enterococos (cistitis, prostatitis y epididimitis) y pueden padecer también infecciones del tracto urinario superior complicadas con bacteriemia. Generalmente se adquieren en ambientes hospitalarios y por ello las bacterias causantes suelen ser resistentes a antibióticos. Los enterococos resistentes a vancomicina se han convertido en uno de los principales patógenos implicado en infecciones del tracto urinario en las UCIs (Hidron *et al.*, 2008).

Los enterococos también se aíslan frecuentemente de infecciones intraabdominales, pélvicas y de tejidos blandos generalmente como parte de infecciones polimicrobianas. Heridas y abscesos en esas localizaciones se han asociado a bacteriemia (Graninger y Ragette, 1992; Patterson *et al.*, 1995). Las peritonitis causadas por enterococos se han relacionado con cirrosis hepática y con pacientes que se sometían a diálisis peritoneal de manera crónica. En estas peritonitis los enterococos se han aislado como únicos agentes (MS, 2014).

La bacteriemia y la endocarditis son las manifestaciones más graves causadas por enterococos. Los enterococos son la segunda causa de bacteriemia asociada al

ámbito hospitalario (Hidron *et al.*, 2008), mientras que en 1980 eran la sexta causa. Los enterococos son una de las bacterias más frecuentemente aisladas en bacteriemias polimicrobianas (Maki y Agger, 1988; Pammi *et al.*, 2014; Patterson *et al.*, 1995). En los casos de bacteriemia y endocarditis, el enterococo puede venir principalmente del tracto genitourinario, de fuentes intraabdominales o biliares, de catéteres contaminados y de infecciones de los tejidos blandos (Maki y Agger, 1988).

El mayor problema asociado con las bacteriemias causadas por enterococos es la presencia de endocarditis, con una tasa de mortalidad de entre el 18% y el 46% (Chirouze *et al.*, 2013; Fernández Guerrero *et al.*, 2007; Maki y Agger, 1988; Malone *et al.*, 1986; Patterson *et al.*, 1995; Shlaes *et al.*, 1989). Los enterococos son la tercera causa de endocarditis causando del 5 al 15% de los casos (Murdoch *et al.*, 2009). Su tratamiento resulta difícil incluso en el caso de enterococos relativamente susceptibles a los antibióticos. La fuente inicial de las mismas son normalmente los tractos urinario y gastrointestinal. Se ha sugerido una relación entre la aparición de tumores en el aparato digestivo y la producción de especies reactivas del oxígeno por parte del enterococo (Huycke *et al.*, 2002; Wang y Huycke, 2007)

En mujeres se han descrito casos de salpingitis y de cuadros infecciosos en el periparto. Más raramente se han visto infecciones neonatales o del sistema nervioso central (Dworkin *et al.*, 2006).

Enterococcus faecalis

Diversidad genética en *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis presenta una gran diversidad genética que ha sido estudiada y puesta en evidencia a través de diferentes técnicas moleculares de tipaje, hibridación comparativa de genoma (*Comparative Genome Hybridization*, CGH) y, en los últimos tiempos, por análisis de genomas completos. Mediante la técnica de tipado por tipificación multilocus de secuencias (*Multi Locus Sequence Typing*, MLST), se genera un perfil alélico para 7 genes constitutivos (*housekeeping*) que permite discernir la relación filogenética de diferentes cepas. Este perfil se lanza a una base de datos que contiene diferentes secuencias tipo (*sequence type*, ST), de manera que permite asignar la cepa a un ST ya establecido (actualmente hay 676 en pubmlst.org/efaecalis) o se define uno nuevo en caso de que su perfil sea novedoso.

La técnica de MLST revela una gran variabilidad genética dentro de esta especie, ya que las poblaciones de *E. faecalis* no siguen una distribución clonal. En el modelado genético de esta especie parecen claves la recombinación (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006) y el intercambio de material genético. Se ha visto que

grandes secciones cromosómicas pueden ser transferidas y movilizadas a través de plásmidos de respuesta a feromonas entre *E. faecalis* (Manson *et al.*, 2010), lo que puede limitar la especiación. Mediante esta técnica de MLST, las cepas de los linajes adaptados al ámbito hospitalario multirresistentes a antibióticos se atribuyen a los complejos clonales (*Clonal Cluster*, CC) CC2, CC9, CC28 y CC40 (McBride *et al.*, 2007; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Solheim *et al.*, 2011). Cepas aisladas en Europa entre 2006 y 2009 muestran que la multirresistencia está muy representada en los complejos clonales CC2, CC16 y CC87, encontrándose los linajes CC2 y CC87 prácticamente solo en hospitales (Kuch *et al.*, 2012). Los linajes CC2 y CC9 se han identificado como potencialmente de “alto riesgo” (Leavis *et al.*, 2006) aunque en Europa el CC87 podría desplazar al CC9 (Kuch *et al.*, 2012). Es destacable la facilidad del linaje CC2 de adquirir multirresistencias.

Los estudios de hibridación comparativa de genoma apuntan a la presencia o ausencia de elementos genéticos móviles como son los fagos y los elementos transponibles conjugativos como causa principal y fuente de la variabilidad genética. Esta teoría se ha visto corroborada con la secuenciación de genomas completos. El primer genoma de *E. faecalis* que se secuenció fue el de la cepa de *E. faecalis* V583, perteneciente al CC2, en el año 2003 (Paulsen *et al.*, 2003). Esta cepa es el primer aislado clínico resistente a vancomicina de Estados Unidos, y se tomó de un paciente en el año 1989 (Sahm *et al.*, 1989). El estudio de su genoma

indica que más de un cuarto de su información genética está constituido por elementos genéticos móviles de distinta naturaleza, incluyendo 7 regiones probables de fagos integrados, 38 elementos de inserción (IS), múltiples transposones conjugativos y compuestos, una isla de patogenicidad y diversos genes de plásmidos integrados en su cromosoma (Paulsen *et al.*, 2003). Las diferencias entre los genomas de las otras 16 cepas secuenciadas, provenientes de muestras de múltiples orígenes y tomadas a lo largo de un lapso de tiempo de 80 años, también se deben básicamente a la presencia o ausencia de elementos genéticos móviles. Sus genomas tenían un tamaño comprendido entre el de *E. faecalis* V583 (3,35997 megabases) (Paulsen *et al.*, 2003) y OG1RF (2,23963 megabases) (Bourgogne *et al.*, 2008), siendo el genoma de las cepas multirresistentes normalmente de mayor tamaño (Palmer *et al.*, 2012).

Actualmente existen hipótesis que correlacionan la ausencia de un sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/Cas funcional con una alta proporción de elementos genéticos móviles y por consiguiente con un genoma más grande, además de estar implicado en la evolución de cepas de *E. faecalis* multirresistentes (Palmer y Gilmore, 2010; Palmer *et al.*, 2012) (**Figura 2**). El sistema CRISPR/Cas es un sistema bacteriano que protege a la bacteria de la adquisición e incorporación de material genético

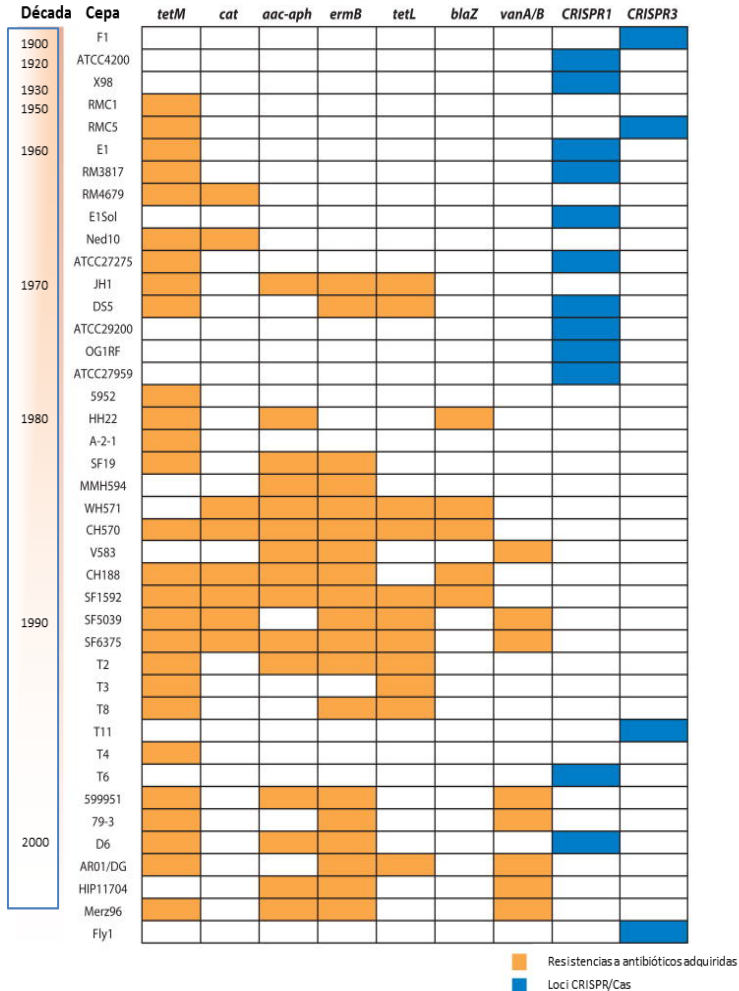


Figura 2: Loci CRISPR/Cas y resistencias antibióticas adquiridas en *E. faecalis*. Las cepas están en orden de aislamiento, de la más antigua a la más reciente, y las décadas aproximadas de su aislamiento están representadas a su izquierda. La presencia de resistencias adquiridas se indica con sombreado naranja en las casillas correspondientes y la presencia de *locus* CRISPR/cas con sombreado azul. Solo se muestran las cepas que presentan una resistencia a antibióticos adquirida o un locus CRISPR/cas. Las resistencias a antibióticos se corresponden a los siguientes compuestos: tetraciclina (*tetM* y *tetL*), cloranfenicol (*cat*), gentamicina (*aac-aph*), eritromicina (*ermB*), ampicilina (*blaZ*) y vancomicina (*vanA/B*). Figura adaptada de Palmer y Gilmore, 2010 (Van Tyne y Gilmore, 2014).

exógeno como puede ser el procedente de fagos y plásmidos (Van Tyne y Gilmore, 2014). Se trata de un sistema adaptativo basado en una estrategia de interferencia con el ADN extraño y su posterior eliminación. La cepa V583 carece de ese sistema (Paulsen *et al.*, 2003), lo que puede ser la causa subyacente de la alta proporción de elementos móviles en su genoma. La falta de un sistema CRISPR/Cas operativo podría contribuir a la adquisición de elementos genéticos móviles y de las resistencias a antibióticos que estos elementos porten (Van Tyne y Gilmore, 2014). Se especula que la selección antibiótica a favor de una pérdida del sistema CRISPR/Cas podría hacer a las cepas hospitalarias de *E. faecalis* más receptivas a otros elementos móviles, como son las islas de patogenicidad y los fagos (Palmer y Gilmore, 2010).

Factores implicados en la virulencia de *Enterococcus faecalis*

Los mecanismos que determinan la transición del comensalismo a la patogenicidad oportunista de esta bacteria no están del todo esclarecidos, aunque sí que se han descrito una serie de factores que juegan un papel en la virulencia de la misma. En algunos CC, como por ejemplo el CC2, compuesto mayormente por aislados hospitalarios, las cepas presentan una alta proporción de elementos genéticos móviles y pueden tener, por tanto, una mayor proporción de factores de oportunismo. Pero estos factores no son determinantes ya que no siempre están presentes en las cepas hospitalarias y de hecho, también se pueden encontrar en

cepas sin relevancia clínica, lo que pone en evidencia la naturaleza compleja y multifactorial de estas infecciones y la necesidad de más investigaciones. Este hecho también dificulta la puesta a punto de una técnica con valor predictivo a la hora de clasificar las cepas por su potencial oportunismo y el diseño de un plan de contención.

Como patógeno oportunista, para dar lugar a una infección deben de confluír una serie de condiciones ajenas al propio microorganismo y que atañen a los hospedadores. La población diana de estas infecciones se circunscribe al ámbito hospitalario y hay dos factores importantes a tener en cuenta. El primero de ellos es que los pacientes a los que afecta presentan el sistema inmune comprometido, encontrándose hospitalizados por otra patología de base. El enterococo tiene dos posibilidades para alcanzar el torrente sanguíneo: por translocación desde una localización orgánica, o directamente a través de soluciones de continuidad. Por tanto un factor importante en el desarrollo de una infección causada por enterococos es el desequilibrio de la microbiota intestinal. Una disbiosis puede hacer que haya una proliferación anormal de la población enterocócica de manera que los enterococos alcancen, mediante translocación intestinal, el torrente sanguíneo, desencadenando procesos infecciosos graves como puede ser una endocarditis. Esto se ve facilitado por la robustez de los enterococos, la cual les permite sobrevivir dentro de los macrófagos y atravesar así la barrera intestinal

para diseminarse posteriormente (Kajfasz *et al.*, 2012). En este sobrecrecimiento juegan un papel importante los tratamientos antibióticos a los que habitualmente están sometidos los pacientes hospitalizados. Los antibióticos pueden eliminar a gran parte de la microbiota saprófita y comensal del individuo y quedar ese nicho disponible para que cepas multirresistentes de enterococos, a falta de microbiota competidora, lo colonicen. Esto se ha descrito en enterococos resistentes a vancomicina (VRE) (Arias y Murray, 2012; Ubeda *et al.*, 2005). Así, la resistencia a antibióticos juega un papel fundamental, hasta el punto que un tratamiento con cefalosporinas puede ser un factor de riesgo para las infecciones por enterococos (Shepard y Gilmore, 2002).

Ese mismo desequilibrio en la microbiota va a determinar la eliminación de una mayor carga bacteriana al ambiente. Teniendo en cuenta la gran resistencia de los enterococos a las condiciones extremas, la probabilidad de la diseminación de la bacteria por las instalaciones hospitalarias y también la transmisión persona a persona se va a ver aumentada, con el riesgo de infección de heridas quirúrgicas, etc. (Austin *et al.*, 1999) (**Figura 3**).

Como hemos comentado, otra vía hacia el torrente sanguíneo es por acceso directo al mismo a través de la ruptura directa de las barreras físicas, por heridas o por catéteres contaminados, por ejemplo, donde la bacteria puede formar biopelículas o *biofilms*. Esta vía de acceso del enterococo al torrente sanguíneo

también se ve favorecida cuanto mayor es la contaminación ambiental (Arias y Murray, 2012).

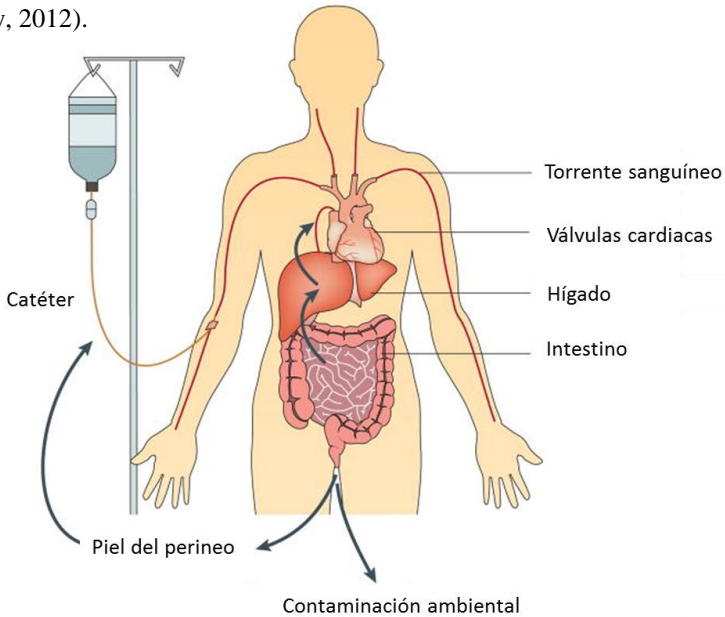


Figura 3: El tracto gastrointestinal juega un papel fundamental en la infección y diseminación de las infecciones enterocólicas. Los enterococos presentes en el tracto gastrointestinal pueden acceder al torrente sanguíneo desde el hígado tras atravesar la barrera intestinal. Una vez en sangre pueden llegar al corazón y potencialmente causar endocarditis. Es frecuente que ocurra tanto la contaminación fecal del ambiente, que puede constituir una fuente de colonización para otros pacientes, como la contaminación de la piel del paciente, que es la principal fuente de infección del tracto urinario y de los catéteres intravenosos. Adaptado de Arias y Murray, 2012 (Palmer y Gilmore, 2010).

Los casos de infecciones enterocólicas en individuos pertenecientes a la comunidad tienen lugar en individuos que presentan alguna causa predisponente. Es el caso de la primera infección por enterococos de la que se tiene constancia fuera del ambiente hospitalario, en el que el paciente previamente había sufrido

fiebres reumáticas que favorecieron el desarrollo de una infección (Maccallum y Hastings, 1899).

El enterococo y, por ende, *Enterococcus faecalis*, es una bacteria con una alta resistencia a condiciones desfavorables. Resiste en un medio pobre en nutrientes, tiene una alta capacidad de sobreponerse a las sustancias inhibidoras sintetizadas por el organismo hospedador y además, a menudo porta determinantes de resistencia a antibióticos. Los factores de oportunismo que se han descrito favorecen su éxito en las diferentes etapas necesarias para culminar el proceso infeccioso: persistencia en superficies abióticas, entrada en el torrente sanguíneo, colonización del lugar de infección y daño tisular (Arias y Murray, 2012; Jett *et al.*, 1994; Sava *et al.*, 2010). Algunos de estos factores son constitutivos de su genoma, mientras que otros los pueden adquirir y diseminar.

Determinantes de superficie

Además de esta robustez intrínseca el enterococo puede portar una serie de factores, como pilis o proteínas de superficie, que favorecen la formación de biopelículas. Mediante esta estrategia la bacteria aumenta su persistencia en el ambiente y también en el hospedador, ya que las biopelículas o tapetes bacterianos aportan a la bacteria una mayor resistencia a las condiciones ambientales y a los antibióticos. Estos factores que favorecen la formación de biopelículas son Esp (*enterococcal surface protein*) (Toledo-Arana *et al.*, 2001), Ebp (*endocarditis*, y

biofilm-associated pili, pili asociado a endocarditis y formación de biopelículas) (Nallapareddy *et al.*, 2006), Bee (Tendolkar *et al.*, 2006) y StrA (Guiton *et al.*, 2010). StrA es una sortasa importante en la formación de biopelículas y está implicada infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (Guiton *et al.*, 2010).

En un modelo murino se ha visto que la proteína Esp favorece las infecciones ascendentes del tracto urinario (Shankar *et al.*, 2001). Esp y Esp_{fm} en *E. faecium* cuyos genes codificantes parecen haber sido adquiridos dentro de una isla de patogenicidad, se encuentran frecuentemente en aislados clínicos y afectan a la formación de biopelículas (Heikens *et al.*, 2007). Parecen jugar un papel en modelos animales de infecciones del tracto urinario y endocarditis (Heikens *et al.*, 2011; Leendertse *et al.*, 2009; Shankar *et al.*, 2001).

Ebp es importante para la adhesión al fibrinógeno en presencia de suero (Nallapareddy *et al.*, 2011), y, junto con Bee, son los únicos tipos de pilus identificados en *E. faecalis*, mientras que *E. faecium* presenta codificados habitualmente cuatro o más de estas estructuras (Arias y Murray, 2012). Ebp se engloba dentro de los llamados MSCRAMMs, *Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules*, componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz. Está codificado por el operón *ebpABC*, precisa de una sortasa para su ensamblamiento, *bps*, y está regulado

positivamente por *ebpR*. Ebp juega un papel importante en el desarrollo de endocarditis y en la formación de biopelículas. Al cultivar esta bacteria, solo el 10-20% de la población expresa el pili, lo que se ha relacionado con una mayor capacidad de formación de biofilm (Tariq *et al.*, 2012).

A fin de favorecer su acceso al torrente sanguíneo y colonizar los tejidos del hospedador, el enterococo puede contar con proteínas del tipo adhesinas que faciliten el proceso. La adhesión a componentes de la matriz extracelular es un punto clave en los estadios iniciales de infección. Entre ellas tenemos de nuevo a Ebp, que también juega un papel en este estadio del proceso infeccioso.

También la sustancia de agregación (*Aggregation Substance*, AS) promueve la adherencia entre la bacteria y el hospedador, favoreciendo la internalización y la supervivencia intracelular dentro de los macrófagos además de suprimir el estallido respiratorio (Süssmuth *et al.*, 2000). Estas proteínas se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos de respuesta a feromonas. La célula no portadora del plásmido produce feromonas dando lugar a la expresión de la sustancia de agregación por parte de la célula donadora del plásmido. La sustancia de agregación lleva a una fuerte unión entre ambas, lo que favorece la eficiencia de la transferencia del plásmido por conjugación. La sustancia de agregación está compuesta por polipéptidos que se anclan en la membrana y participan así en la transferencia de plásmidos y factores de virulencia (Olmsted *et al.*, 1991).

Al secuenciar el genoma de *E. faecalis* V583, se descubrió otro gen que codifica para una adhesina, *ace*, que, al igual que Ebp, es un componente de la superficie microbiana que reconoce moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs) y que es capaz de unirse a componentes importantes de la membrana basal (Nallapareddy *et al.*, 2000). Ace juega un papel importante en los estadios iniciales de la infección y se ha identificado *ccpA* como su efector (Gao *et al.*, 2013). Hay numerosos estudios que demuestran la importancia de Ace en la virulencia del enterococo. Mutantes de delección para el gen que lo codifica muestran una atenuación en la virulencia en un modelo de infección del tracto urinario en ratones, en un modelo de *Galleria mellonella* y en la supervivencia de macrófagos intraperitoneales en ratones (Lebreton *et al.*, 2009). Es importante también en la patogénesis de la endocarditis, ya que su delección atenúa la endocarditis experimental en ratas (Singh *et al.*, 2010) y es importante en la fase de adhesión de la misma habiéndose observado que *Enterococcus faecalis* expresa esta proteína *in vivo* en las vegetaciones cardiacas (Singh *et al.*, 2010).

El gen *efaA* forma parte del operón *efaBCA*, que hipotéticamente codifica un transportador tipo ABC. *efaA* es el componente lipoproteico de unión a sustrato del transportador (Low *et al.*, 2003) y puede jugar un papel en la adherencia y la patogénesis de la bacteria al ser su secuencia homóloga a la de una adhesina de

superficie de los estreptococos (Andersen *et al.*, 1993; Kolenbrander *et al.*, 1998; Viscount *et al.*, 1997).

Factores secretados

Una vez que el enterococo ha alcanzado un tejido, la bacteria puede producir daño tisular a través de la secreción de diversas proteínas. Muchas cepas de *Enterococcus faecalis* presentan citolisina, y se ha visto que ésta contribuye a la virulencia de la bacteria tanto en humanos como en todos los modelos animales estudiados (Haas y Gilmore, 1999; Van Tyne *et al.*, 2013). Las cepas que expresan esta proteína son más virulentas que las que no lo hacen. Se trata de bacteriocinas (CylA-M) de la clase de los lantibióticos que presentan actividad hemolítica y bactericida frente a un amplio rango de bacterias Gram positivas (BROCK *et al.*, 1963; STARK, 1960) y que son secretadas en forma de dos unidades estructurales (Arias y Murray, 2012). En experimentos realizados con animales, se ha visto que la citolisina contribuye de manera significativa a la severidad de la infección (Chow *et al.*, 1993; Garsin *et al.*, 2001; Huycke *et al.*, 1991; Ike *et al.*, 1984, 1987; Jett *et al.*, 1992). El determinante genético de esta toxina se describió por primera vez en un plásmido grande conjugativo (Clewell *et al.*, 1982), y la citolisina está codificada en un operón de 8 genes (Haas *et al.*, 2002). Se ha encontrado también en el cromosoma (Ike y Clewell, 1992) dentro de una isla de patogenicidad (Shankar *et al.*, 2002). Su regulación corre a cargo de dos genes, *cyl-R1* y *cyl-R2*,

que forman otra unidad transcripcional que se transcribe en la dirección opuesta a la del operón (Van Tyne *et al.*, 2013).

También se han estudiado en profundidad dos proteasas que se secretan, una gelatinasa (GelE) y una serina proteasa (SprE) (Qin *et al.*, 2001), que se encuentran formando un operón. GelE es una metaloproteasa de matriz, y presenta similitud con la elastasa de *Pseudomonas* y la aureolisina presente en *Staphylococcus*, mientras que SprE está relacionada con la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (Sifri *et al.*, 2002). Las proteasas pueden degradar el tejido conectivo del hospedador y diversas proteínas del mismo (Burns *et al.*, 1996; Lantz *et al.*, 1991), interferir con la señalización celular para facilitar la supervivencia microbiana (Duesbery *et al.*, 1998; Maeda y Yamamoto, 1996) y degradar componentes claves del sistema inmune del hospedador (Plaut, 1983). Se ha visto que en modelos animales de infección pueden actuar como determinantes de virulencia (Maeda y Yamamoto, 1996).

La regulación de los genes que las codifican, *gelE* y *sprE*, corre a cargo del conjunto de genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* y *fsrD*, (Qin *et al.*, 2000). Éstos regulan positivamente la expresión del operón como respuesta a la percepción del quórum o autoinducción (*quorum sensing*) lo que les permite detectar sus células diana en la distancia (Sifri *et al.*, 2002). El sistema de percepción del quórum Fsr modula la

presencia de Ace en la superficie mediante la regulación de *gelE* (Pinkston *et al.*, 2011).

Exopolisacáridos y componentes de la pared de membrana

A estos factores hay que sumarles los componentes de la pared bacteriana que aumentan la capacidad de la bacteria de superar las defensas del hospedador y que son considerados factores de virulencia. Hay componentes que pueden estimular la producción de citoquinas. Algunos polisacáridos se encuentran presentes en todas las especies de *E. faecalis*, como es el antígeno polisacárido enterocócico, codificado por los genes *epa* (*enterococcal polysaccharide antigen, epa cluster*), cuya pérdida conlleva una atenuación de la virulencia según varios estudios en modelos animales. Juega un papel importante en la evasión del sistema inmune al disminuir la eliminación de la bacteria por parte de los neutrófilos. Participa en la formación de biofilms y posiblemente en la colonización y la invasión así como en la translocación a través de las células intestinales (Mohamed *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2004).

En el caso del enterococo hay polisacáridos de la cápsula que impiden la opsonización de las bacterias por parte de los neutrófilos, lo que tiene relevancia al ser este mecanismo del sistema inmune particularmente importante en el aclaramiento de los enterococos (Arduino *et al.*, 1994; Huebner *et al.*, 1999;

Rakita *et al.*, 2000; Rakita *et al.*, 1999). Estos polisacáridos están codificados por el conjunto de genes *csp* (*capsule polysaccharide, cps cluster*).

Si el enterococo no presenta cápsula, existen otras moléculas que son también importantes a nivel de la pared. Los ácidos lipoteicoicos son un componente de la pared celular que define el modo en el que la bacteria interactúa con las células hospedadoras, y frente a los cuales el organismo hospedador puede producir anticuerpos opsonizantes. En las cepas sin cápsula estos lipopolisacáridos quedan expuestos los anticuerpos frente a dan lugar a la muerte de la bacteria (Huebner *et al.*, 1999).

Otros factores

Se han descrito otras proteínas que se caracterizan por tener dominios ricos en leucina y que contribuyen a la evasión del sistema inmune del hospedador y a la virulencia de la bacteria. Un ejemplo es la proteína de superficie ElrA, que es importante en la supervivencia en macrófagos y en la respuesta a la interleuquina 6 (Brinster *et al.*, 2007).

A la hora de adaptarse a las condiciones del medio interno del hospedador las características metabólicas del microorganismo pueden ser determinantes. Por ejemplo, se ha visto que la respuesta estricta o respuesta a condiciones severas (*stringent response*) es necesaria para la infección en un modelo de *C. elegans*

(Abranches *et al.*, 2009). La alarmona (p)ppGpp parece jugar un papel protector en las primeras horas de la infección, persistencia en abscesos y colonización de las valvas cardiacas (MS, 2014).

Una característica frecuente en *E. faecalis* es la capacidad de generar superóxido extracelular, particularmente en las cepas capaces de producir bacteriemia, lo que es raro de encontrar en *E. faecium* (Huycke *et al.*, 1996). El superóxido puede causar inestabilidad cromosómica en los colonocitos.

Aunque la capacidad de metabolizar etanolamida se ha asociado con patógenos intestinales como varias especies de *Salmonella* y la especie *Listeria monocitogenes* (Garsin, 2010) no se sabe el papel de esta característica metabólica en la virulencia de los enterococos en mamíferos.

Cuando un patógeno invade a su hospedador va a tener que lidiar con diferentes tipos de estrés. Por ello los mecanismos que contribuyen a la resistencia al estrés van a estar relacionados con la virulencia. La proteína general de estrés (*general stress protein*), Gls24, se ha relacionado con la resistencia a las sales biliares (Giard *et al.*, 2000) y con la virulencia en un modelo murino de peritonitis (Nannini *et al.*, 2005). Los fagocitos son una línea de defensa importante del sistema inmune y cuentan con rutas que les permiten la producción de especies reactivas del oxígeno. El enterococo está equipado con diversas armas para

contrarrestar este efecto, y las mismas son importantes para la colonización y la persistencia de estas bacterias en el lugar de la infección (La Carbona *et al.*, 2007). A este nivel son importantes una manganeso superóxido dismutasa (Verneuil *et al.*, 2006), una catalasa dependiente de hemo (Frankenberg *et al.*, 2002) y tres peroxidases dependientes de NADH (alquil hidroperóxido reductasa, tiol peroxidasa y NADH peroxidasa) (La Carbona *et al.*, 2007).

Todos estos factores, tanto microbiológicos como del hospedador, ponen en evidencia la naturaleza compleja y multifactorial de estas infecciones y la necesidad de más investigaciones, ya que con el envejecimiento de la población y los avances médicos, con terapias más intensas e invasivas, la incidencia de las infecciones nosocomiales va a ir en aumento (Gilmore, 2014).

Homeostasis del cobre y transportadores tipo ABC

Homeostasis del Cobre

El cobre es un micronutriente importante necesario como cofactor redox en el centro catalítico de diversas enzimas. Sin embargo, supone un peligro potencial para la bacteria debido a su alta reactividad química (Argüello *et al.*,

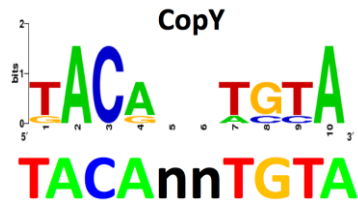


Figura 4: Logo de la caja de unión Cop en *Enterococcus faecalis*. Adaptado de Latorre, Galloway-Peña *et al.*, 2014 (Arias y Murray, 2012).

2013). Las células presentan diversos mecanismos para poder manejar el cobre de manera segura a nivel intracelular. Los mecanismos por los que el cobre ejerce su toxicidad no están del todo esclarecidos. El sistema de *E. hirae* para la homeostasis del cobre ha sido ampliamente estudiado (Lu y Solioz, 2002; Solioz, 2002) y se basa en el control de la expresión de un operón que posee una caja Cop (Figura 4) delante donde se unirá o no un represor transcripcional. Según el modelo propuesto, el represor transcripcional CopY regula la transcripción de un operón que tradicionalmente incluye los genes *copY* (el propio represor, que responde a las concentraciones de cobre), *copA* (ATPasa que capta cobre cuando éste es limitante), *copB* (ATPasa que extruye cobre cuando este metal alcanza niveles tóxicos) y *copZ* (chaperona capaz de transportar el cobre a nivel intracelular)

(Figura 5).

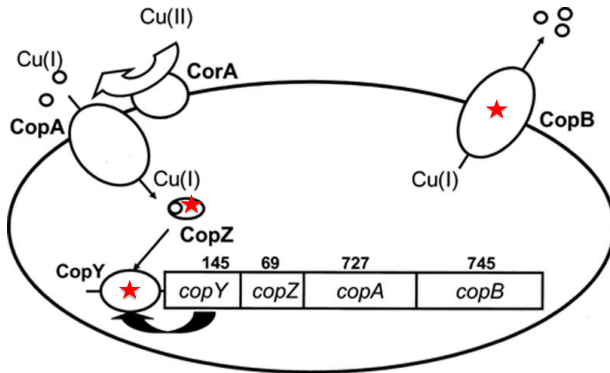


Figura 5: Modelo del operón de cobre y de la homeostasis del cobre en *E. hirae*. La reductasa extracelular CorA aporta cobre (I) para la captación por parte de CopA. Dentro de la célula la chaperona CopZ lleva el cobre de la ATPasa CopA al represor CopY. La forma CopY con cobre se separa del promotor permitiendo la transcripción del operón. En caso de exceso de cobre, CopZ puede llevarlo a la ATPasa exportadora de cobre CopB. Los números indican el número de aminoácidos de las proteínas. Las estrellas indican los elementos presentes en el operón de *E. faecalis* V583. Figura adaptada de Solioz *et al.*, 2003 (Latorre *et al.*, 2014).

El regulador transcripcional CopY es un dímero. El extremo N-terminal de cada monómero constituye el dominio de unión al ADN y el extremo C-terminal puede unir zinc o cobre, 1 y 2 iones por monómero respectivamente. Cuando unen zinc, el represor está unido al ADN en las cajas Cop (**Figura 4**) y reprime el operón. Si aumenta el cobre, CopZ u otro complejo de cobre dona cobre al dímero de CopY de tal modo que cambia de conformación, se separa del ADN y el operón se puede transcribir. Este conjunto de genes participa en la homeostasis del cobre en la célula. En el caso de *E. faecalis* la homeostasis del cobre recae sobre tres genes, *copY*, *copA* (ATPasa de eflujo para el cobre) y *copZ*, organizados en el operon *cop* y que constituye el modelo homeostático del cobre más simple descrito hasta el momento (Reyes-Jara *et al.*, 2010).

Transportadores tipo ABC

Los transportadores tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*, casete de unión al ATP) constituyen una superfamilia ubicua de proteínas integrales de membrana responsables de la translocación dependiente de ATP de un gran número de sustratos a través de la membrana. Estos transportadores se han relacionado con la resistencia a antibióticos y con procesos fisiológicos de las bacterias (Perego *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2014). Estos transportadores están conformados por diferentes subunidades que codifican para distintos dominios funcionales. Los dominios ABC se encuentran en el citoplasma, están muy conservados y aportan el

mecanismo dependiente de nucleótidos que dirige el transporte. Los dominios transmembrana que crean la vía para la translocación son más variables. Los transportadores que funcionan como importadores precisan de una proteína de unión de alta afinidad que se asocia al ligando en el periplasma para dirigirlo al transportador tipo ABC apropiado (Rees, Johnson *et al. et al.*, 2009) (**Figura 6**).

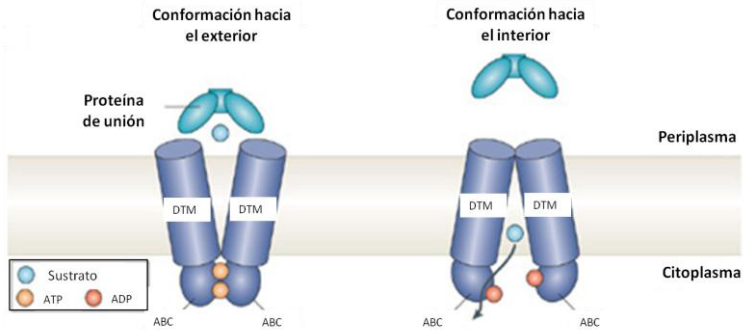


Figura 6: Dibujo esquemático de la organización modular de los transportadores tipo ABC. Estos transportadores se componen de dos dominios transmembrana (DTMs) y dos dominios ABC de unión a nucleótido. También se muestra la proteína de unión, componente necesario en los importadores. Estos transportadores tienen dos conformaciones, una conformación hacia el exterior en la que el lugar de unión al sustrato está orientado hacia el periplasma (extracelular) y una conformación hacia el interior en la que el lugar de unión al sustrato está orientado hacia el citoplasma (intracelular). Figura adaptada de Rees, Johnson *et al.*, 2009 (Doumith *et al.*, 2004; Paulsen *et al.*, 2003; Solioz y Stoyanov, 2003).

Los antibióticos

Definición de antibiótico y de resistencia a antibióticos

Según la Real Academia de la Lengua Española (RAE) el término antibiótico se aplica a la sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis,

capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos, por su acción bactericida.

Las primeras moléculas con efecto antibiótico fueron descubiertas a principios del siglo XX gracias a Paul Ehrlich (Ehrlich y Hata, 1910) y a Alexander Fleming, que descubrió la penicilina en 1929. La penicilina fue masivamente producida y distribuida a partir de 1945, y fue Fleming también uno de los primeros en alertar de la posible resistencia a la misma si ésta se administraba a bajas dosis o durante un corto periodo de tratamiento (Aminov, 2010). Los antibióticos han tenido un gran impacto en la sociedad ya que han permitido el aumento tanto de la esperanza de vida como de la población al disminuir la mortalidad infantil (Johnson, 2006). Desde su introducción en la práctica clínica se está librando una lucha armamentística entre la humanidad y los microorganismos, la primera mejorando los compuestos de los que disponemos actualmente o descubriendo nuevos compuestos antibióticos y los segundos eludiendo los efectos de los antibióticos a través de su gran habilidad para evolucionar mediante la capacidad para mutar, adquirir material exógeno extraño y formar grandes poblaciones.

Importancia de la resistencia a antibióticos

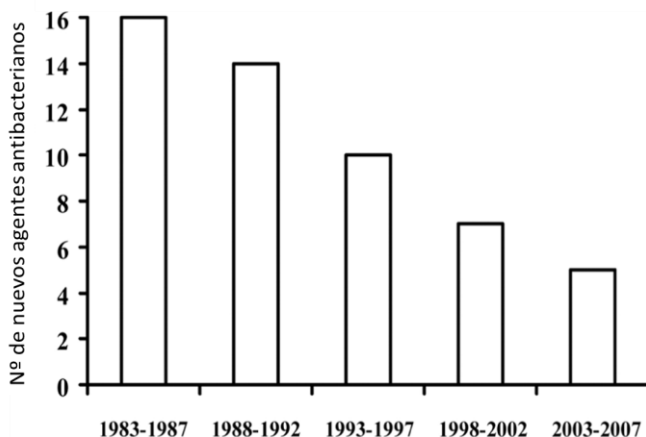


Figura 7: Nuevos agentes antibacterianos aprobados en EEUU desde 1983 a 2007 en periodos de 5 años. Adaptado de Boucher *et al.*, 2009 (Doumith *et al.*, 2004; Focus, 1986; Rees *et al.*, 2009).

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) la resistencia a los antimicrobianos (o farmacoresistencia) se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones dejen de ser eficaces. Reconoce que el uso y el abuso de los antimicrobianos en medicina humana y ganadería durante los últimos 70 años han producido un aumento incesante del número y de los tipos de microorganismos resistentes a estos medicamentos, con el consiguiente aumento de la mortalidad, de la morbilidad y de las discapacidades. Cada año, 25.000 pacientes mueren en la UE por bacterias multirresistentes (ECDC, 2009), y más de 63.000 pacientes mueren en los EEUU por infecciones bacterianas adquiridas en hospitales (www.extendingthecure.org/report). Según un estudio realizado en el Reino Unido en 2014 (O'Neill, 2014), el coste humano de

la crisis de los antibióticos se estima en una acumulación de 300 millones de muertes prematuras para el 2050, con pérdidas de hasta 100 trillones de dólares para la economía mundial. Esto, unido a la falta de nuevas familias de antibióticos desde la década de los 70 (la época dorada ocurrió entre los años 40 y los 60) (Arias y Murray, 2015), hace que las opciones terapéuticas se hayan reducido drásticamente y ha forzado a la modificación de las moléculas actuales a fin de mejorar la actividad de los antibióticos (Chopra *et al.*, 2002) (**Figura 7**). A pesar de este panorama desolador, y utilizando un innovador sistema de cultivo que ha permitido cultivar bacterias del suelo hasta el momento no cultivables (Nichols *et al.*, 2010), se ha identificado un nuevo péptido con actividad antibiótica, la teixobactina, efectiva frente a Gram positivos. Este antibiótico parece basar su mecanismo de acción en formar complejos con los precursores del peptidoglicano y con los ácidos teicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas (Ling *et al.*, 2015).

Esto no evita que las bacterias multirresistentes se consideren actualmente como una enfermedad emergente global y, de hecho, son uno de los principales problemas de salud pública, ya que en los últimos años tanto la proporción como el número absoluto de bacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos han aumentado (Roca *et al.*, 2015).

Mecanismos de resistencia

Existen dos tipos de resistencia: la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida. La resistencia intrínseca a un antibiótico es la habilidad de una especie de resistir la acción de ese antibiótico como resultado de características inherentes funcionales o estructurales (Blair *et al.*, 2015). Está determinada por mecanismos encontrados universalmente en el genoma de una especie (Hollenbeck y Rice, 2012). La resistencia adquirida ocurre por mutaciones en genes intrínsecos o por intercambio horizontal de material genético que codifica determinantes de resistencia (Hollenbeck y Rice, 2012).

La aparición de bacterias resistentes a nivel individual tiene lugar a través de eventos genéticos como pueden ser mutaciones puntuales o por medio de la adquisición de elementos genéticos móviles y es independiente de la presencia o no de antibióticos en el medio. La exposición de la población bacteriana a los antibióticos va a generar la presión selectiva necesaria para el crecimiento y la dispersión no solo de los microorganismos resistentes sino también de los determinantes genéticos de resistencia (Roca *et al.*, 2015).

Aún así, ciertos antibióticos pueden promover una mayor incidencia de esos eventos genéticos, pudiendo actuar como potentes motores evolutivos (Cirz *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2004). Por tanto, es conveniente tener en cuenta estos efectos colaterales a la hora de la administración de un tratamiento antibiótico.

Los principales mecanismos por los que una bacteria puede ser resistente a los antibióticos son variados, y se describen en profundidad en el siguiente apartado.

Inactivación del antibiótico

Las bacterias pueden destruir o modificar los antibióticos y resistir así a su acción (Blair *et al.*, 2015). Pueden inactivar los antibióticos mediante hidrólisis. Se han identificado cientos de enzimas que pueden degradar o modificar antibióticos de diferentes clases, incluyendo beta-lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles y macrólidos (Blair *et al.*, 2015). La modificación de los antibióticos catalizada por enzimas es uno de los principales mecanismos de resistencia y ha sido importante desde el descubrimiento de la penicilinasasa (una beta-lactamasa) en 1940 (Abraham y Chain, 1988). La adición de un grupo químico en posiciones vulnerables del antibiótico por enzimas bacterianas confiere resistencia a los antibióticos al impedir la unión de éstos a su diana (Blair *et al.*, 2015). Se pueden transferir diversos grupos químicos, incluyendo grupos acil, fosfato, nucleotidil y ribitoil (Wright, 2005). Los aminoglucósidos son especialmente sensibles a estas modificaciones, las cuales confieren alto nivel de resistencia, y las enzimas implicadas son acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas (Blair *et al.*, 2015; Norris y Serspersu, 2013). La detoxificación a través de enzimas disminuye la concentración del antibiótico en el medio a menudo de manera

irreversible, lo que tiene un mayor impacto en el crecimiento bacteriano al “detoxificar” el medio (Mayers *et al.*, 2009).

Modificación de la diana

La mayoría de los antibióticos se unen a su diana con alta afinidad, impidiendo la actividad normal de la misma. Cambios en la estructura de la diana que prevengan la unión del antibiótico pero que permitan a la diana llevar a cabo su función pueden conferir resistencia al antibiótico (Blair *et al.*, 2015). La modificación de la diana puede ocurrir por mutación ya sea ésta por una mutación puntual, por la formación de genes mosaico tras la captación de ADN del medio o por la adquisición de un gen homólogo a la diana original (Blair *et al.*, 2015). Un ejemplo de este último caso es el *S. aureus* resistente a meticilina, en el que la resistencia a meticilina se da con la adquisición del elemento SCCmec, *Staphylococcal cassette chromosome mec*. Este elemento porta *mecA*, que codifica para la proteína insensible a beta-lactámicos PBP2a (Katayama *et al.*, 2000). Una protección por modificación de la diana que no requiere de un cambio mutacional en los genes que codifican la misma puede ser un mecanismo efectivo de resistencia a antibióticos. Los aminoglucósidos inhiben la síntesis proteica mediante su unión al ribosoma. Un mecanismo de resistencia a aminoglucósidos es la modificación postranscripcional del ribosoma por metilación (Blair *et al.*, 2015). Las enzimas responsables de esto se han detectado en diferentes bacterias

patógenas (Fritsche *et al.*, 2008). En *P. aeruginosa*, RmtD metila G1405 del ARNr 16S confiriendo a la bacteria alta resistencia a los antibióticos 4,6-disustituidos (Gutierrez *et al.*, 2013).

Prevención del acceso a la diana

Permeabilidad reducida: en comparación con las Gram positivas, las bacterias Gram negativas son intrínsecamente menos permeables a muchos antibióticos ya que su membrana externa forma una barrera de permeabilidad (Kojima y Nikaido, 2013; Vargiu y Nikaido, 2012). Los antibióticos hidrofílicos atraviesan la membrana externa por difusión a través de las porinas de la membrana externa. La reducción de la entrada del antibiótico al interior celular se puede conseguir reduciendo el número de porinas o reemplazándolas por canales más selectivos. Éste es un mecanismo de resistencia intrínseca bien establecido en Gram negativas (Tamber y Hancock, 2003). Datos recientes sugieren que en *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* y *Acinetobacter spp.*, la reducción de las porinas contribuye a la resistencia a carbapenemas y cefalosporinas, cuya resistencia está normalmente mediada por degradación enzimática (Baroud *et al.*, 2013; Lavigne *et al.*, 2013; Poulou *et al.*, 2013; Tamber y Hancock, 2003; Wozniak y Waldor, 2010). Por otra parte, las bombas de eflujo transportan activamente muchos antibióticos fuera de la célula. La primera descripción de este sistema como mecanismo de resistencia fue en *E. coli* con la resistencia a tetraciclina (Ball *et al.*, 1980; McMurry *et al.*,

1980). Las bombas de eflujo son un componente importante en la resistencia de las Gram negativas a muchos antibióticos que sí se pueden utilizar en Gram positivas. La sobreexpresión de estas bombas puede determinar altos niveles de resistencia a antibióticos. Estas bombas pueden tener una gran especificidad de sustrato (las bombas Tet) o un rango de sustrato amplio que incluye sustratos muy diferentes estructuralmente. Éstas son las bombas MDR (*multidrug resistance*). Ejemplos de estas bombas son AcrB en *E. coli* y MexB en *Pseudomonas aeruginosa* (Blair *et al.*, 2015).

Protección de la diana

Los genes *qnr* codifican proteínas de pentapéptidos repetidos que se unen y protegen a la topoisomerasa IV y a la ADN girasa del efecto letal de las quinolonas (Blair *et al.*, 2015). Un modelo reciente basado en la estructura de QnrB1 sugiere que esta proteína interacciona con el complejo topoisomerasa-quinolona después de la unión de la quinolona promoviendo la liberación del antibiótico (Vetting *et al.*, 2011). Esto rescataría a la topoisomerasa y le permitiría ejercer su acción normal y religar el ADN (Vetting *et al.*, 2011). La familia de genes de resistencia a quinolonas *qnr* se ha encontrado en plásmidos de varios patógenos (Blair *et al.*, 2015).

Secuestro del antibiótico

Mediante este mecanismo el antibiótico queda atrapado en otras estructuras de manera que no le es posible alcanzar su diana de acción. Es el caso de los *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a glicopéptidos, que presentan una pared celular engrosada que secuestra el antibiótico (Howden *et al.*, 2010).

Activación defectuosa del antibiótico

Algunos antibióticos no son activos en la forma química en la que se administran y precisan de una activación enzimática previa para ejercer su efecto. En caso de que esa enzima no se expresara, no fuera funcional o perdiera su afinidad por el antibiótico, éste no se activaría y no podría ejercer su acción (Roseeuw *et al.*, 1999). Por ejemplo, el metronidazol necesita ser reducido a una forma citotóxica para ejercer su acción. Cuando *Helicobacter pylori* presenta el gen *rdxA* inactivado, no hay activación del metronidazol y por tanto la bacteria es resistente (Land y Johnson, 1999).

Resistencia en el Enterococo

Importancia de las resistencias en la infección enterocócica

Confluyen tres factores que contribuyen a convertir al enterococo en un patógeno de primera línea: su capacidad intrínseca de resistir a ciertos antibióticos (por ejemplo, a clindamicina, a las cefalosporinas y a los aminoglicósidos), su

capacidad de adquirir y diseminar determinantes de resistencia (por ejemplo los grupos de genes que confieren resistencia a vancomicina) y su genoma maleable, lo que le permite adaptarse a ambientes hostiles como el de los hospitales y aumentar su capacidad de colonización del tracto gastrointestinal o de otras localizaciones orgánicas (Arias y Murray, 2012). Un posible componente importante en la evolución de cepas multirresistentes en los enterococos asociados a hospitales puede ser la ya mencionada falta de un sistema CRISPR. Así, la presencia de determinantes de resistencia tiene una correlación negativa con un sistema CRISPR funcional, y muchos de los complejos clonales asociados a hospitales no lo tienen (Palmer y Gilmore, 2010).

Además de ser intrínsecamente resistentes a un gran número de antibióticos los enterococos tienen facilidad para acumular mutaciones y genes exógenos que les van a conferir resistencia a otros antibióticos (Arias y Murray, 2008, 2012). Los enterococos tienen el potencial de resistir virtualmente a todos los antibióticos útiles en clínica (Hollenbeck y Rice, 2012) y, de hecho, estudios realizados con aislados humanos de diversos orígenes revelan que *E. faecalis* es, en conjunto, resistente a los antibióticos de uso clínico, estando estos niveles de resistencia además asociados al ámbito hospitalario (Kelesidis *et al.*, 2012; Kuch *et al.*, 2012).

Mecanismos de resistencia a diferentes antibióticos

Vamos a desgranar algunas de estas resistencias, tanto intrínsecas como extrínsecas (**Figura 8**), que hacen que el tratamiento de los enterococos en la práctica clínica sea un reto.

Resistencia a daptomicina

La resistencia frente a este antibiótico lipopeptídico cuyo mecanismo de acción es alterar la homeostasis del calcio parece deberse a cambios en la composición de fosfolípidos de membrana y/o de las propiedades de la superficie de la bacteria (Arias *et al.*, 2011; Palmer *et al.*, 2010). En la resistencia a este compuesto pueden ser importantes la proteína LiaF, que es parte de un sistema de regulación de tres componentes (LiaFSR), y una proteína de la familia glicerofosforil diester fosfodiesterasa con un posible rol en el metabolismo de fosfolípidos de membrana (Arias *et al.*, 2011).

Resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos se unen al ARNr 16S de la subunidad 30S del ribosoma e interfieren en la síntesis proteica. Los enterococos captan una baja proporción de los aminoglucósidos y por ello presentan de manera intrínseca resistencia moderada a los mismos. Son antibióticos altamente polares y su captación se puede incrementar mediante un tratamiento combinado con agentes activos frente

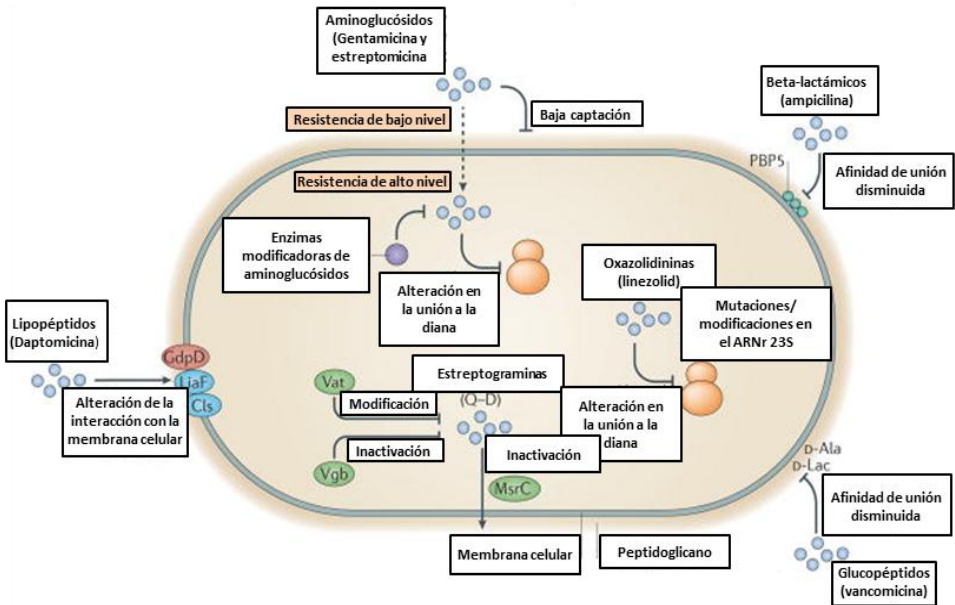


Figura 8: Principales mecanismos de resistencia a antibióticos en enterococos. Los enterococos son intrínsecamente resistentes a diferentes antibióticos y pueden adquirir mutaciones y genes exógenos que confieren resistencia a otros antimicrobianos. En esta imagen se muestran los principales mecanismos de resistencia. En *E. faecium*, la resistencia a ampicilina ocurre a través de la producción de la PBP5, que tiene baja afinidad por los beta-lactámicos. Los enterococos exhiben resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos debido a la baja captación de estas moléculas altamente polares. La resistencia de alto nivel se debe a la adquisición de enzimas modificadores de aminoácidos o, en el caso de la estreptomicina, por mutaciones en el ribosoma que alteran la unión a la diana. La resistencia a vancomicina ocurre mediante una reducción de la afinidad de unión al glicopéptido mediante la alteración de la ruta biosintética del peptidoglicano. La resistencia a quinupristina-dalfopristina implica diferentes vías, incluyendo la modificación del antibiótico (acetiltransferasa Vat), su inactivación (liasa Vgb) y su extrusión (proteína MsrC). La resistencia a oxazolidinona linezolid es rara y se suele dar por mutaciones en el punto de unión al ARNr 23S. La resistencia de *E. faecalis* a la daptomicina implica una alteración en la interacción con la membrana lipídica y requiere la proteína de membrana LiaF y enzimas implicadas en el metabolismo de los fosfolípidos, como miembros de la familia Gpd y CIs (Boucher *et al.*, 2009).

a la pared bacteriana, como son las penicilinas y la vancomicina (Moellering *et al.*, 1971). Además *E. faecium* presenta una metilasa del ARN ribosómico del 16S, EfmM, lo que aumenta su nivel de resistencia a los aminoglucósidos. La resistencia de alto nivel aparece con la adquisición de un elemento genético móvil que codifica para una enzima modificadora de aminoglucósidos, como son fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas (Kak *et al.*, 2000) de manera que disminuye su unión al ribosoma. Una alta resistencia a estreptomicina se puede deber, además de a una nucleotidiltransferasa de aminoglicósidos, a mutaciones a nivel ribosomal, principalmente en la proteína ribosomal S12 (Hollingshead y Vapnek, 1985).

Resistencia a rifampicina

La rifampicina previene el inicio de la transcripción al unirse a la subunidad beta de la ARN polimerasa (RpoB). Aunque no se ha utilizado en exceso en infecciones enterocócicas, entre el 71 y el 79% de los aislados clínicos que se estudiaron en un trabajo publicado por Andrews en el año 2000 eran resistentes a rifampicina (Andrews *et al.*, 2000).

Resistencia a quinolonas

Esta familia de antibióticos, cuyo mecanismo de acción se basa en interferir con la replicación del ADN al unirse a las topoisomerasas de tipo II (ADN girasa y

ADN topoisomerasa IV), generalmente presenta una actividad moderada contra los enterococos. La resistencia suele acontecer a través de mutaciones puntuales en los genes de las topoisomerasas de tipo II y estas mutaciones se han descrito en aislados de enterococos (Kak *et al.*, 2000; Oyamada *et al.*, 2006b; Palmer *et al.*, 2011; Werner *et al.*, 2010). Las bombas de eflujo también pueden participar en la resistencia a quinolonas de los enterococos. Por ejemplo, la bomba EmeA ha sido implicada en la resistencia a fluoroquinolonas en *E. faecalis* (Jung *et al.*, 2010). Además, en el genoma de V583 se ha encontrado un homólogo de la bomba EfrAB, que en *E. coli* aumenta la resistencia a quinolonas (Lefort *et al.*, 2000). Al clonar el homólogo de esta bomba e introducirla en *E. coli*, esta bacteria adquiere resistencia a diversos antibióticos como la norfloxacin y la ciprofloxacina (Lee *et al.*, 2003). También se ha encontrado un homólogo de Qnr que se ha relacionado con la resistencia intrínseca a fluoroquinolonas en *Enterococcus faecalis* (Arsène y Leclercq, 2007).

Resistencia a macrólidos, lincosamidas y streptograminas

Todos estos antibióticos se unen a la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas. En enterococos, la resistencia a macrólidos y lincosamidas está muy extendida (Jonas *et al.*, 2001). Dentro de las resistencias adquiridas a macrólidos destaca una enzima típicamente codificada por *ermB*, que metila una adenina en el 23S. Esta metilación también disminuye la unión al ribosoma de la

estreptogramina B y las lincosamidas. Otro mecanismo es la bomba de eflujo codificada por *mefA*, aunque da menores niveles de resistencia a macrólidos que *ermB* (Clancy *et al.*, 1996). *E. faecalis* tiene un transportador ABC en su genoma llamado Lsa que le confiere resistencia intrínseca a la combinación quinupristina-dalfopristina, el primer tratamiento aprobado en EEUU para el tratamiento de enterococos resistentes a vancomicina (Fantin *et al.*, 1997). La manera en la que confiere dicha resistencia no está del todo esclarecida (Singh y Murray, 2005).

Resistencia a linezolid

El linezolid, desarrollado para combatir bacterias Gram positivas multirresistentes, interacciona con el complejo iniciador de la traducción para interferir la síntesis proteica. Se ha correlacionado la proporción de ARNr del 23S que presentan la mutación G2576U, que afecta a la situación de nucleótidos importantes en la unión al linezolid, con el nivel fenotípico de resistencia en aislados clínicos (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). *E. faecalis* y *E. faecium* presentan 4 y 6 copias del ARNr 23S respectivamente.

Agentes activos frente a la pared

La pared de las bacterias Gram positivas consta de tres componentes. Una estructura de peptidoglicano, polímeros aniónicos (ácidos teicóicos y polisacáridos

de pared) y proteínas ancladas o asociadas a la pared. Los dos primeros componentes constituyen el 90% de la misma (Bhavsar y Brown, 2006).

El peptidoglicano se compone de subunidades de ácido-N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina unidas por enlaces β 1-4 (Navarre y Schneewind, 1999) (**Figura 9**). El tamaño de las cadenas oscila entre 5 y 30 subunidades (Archibald *et al.*, 1993) y están sobrecruzadas entre ellas mediante péptidos cortos que están unidos a los residuos de MurNAc. Los residuos de NAM se conectan mediante enlaces amida del grupo amino terminal de la L-Ala de su péptido con el grupo carboxilo del núcleo D-lactil de la cadena peptídica de otro NAM. Cuando se forma el puente interpeptídico entre el grupo ϵ -amino de la L-lisina en la posición 3 con el grupo carboxilo de D-alanina en la posición 4 de la hebra adyacente, el residuo terminal de D-alanina es eliminado. Las diferencias entre la pared de las bacterias Gram positivas radican fundamentalmente en el puente interpeptídico. En la mayoría de los enterococos, el sobrecruzamiento ocurre a través de un residuo de D-Asp (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987). En *E. faecalis*, en cambio, está formado por 2 o 3 residuos de L-Ala (Schleifer y Kandler, 1972).

Cabe mencionar un tipo de resistencia a agentes activos frente a la pared, aunque éste ocurra en *E. faecium*, debido a su potencial relevancia clínica. A través de un proceso de selección *in vitro* en varios pasos, se aisló un mutante de

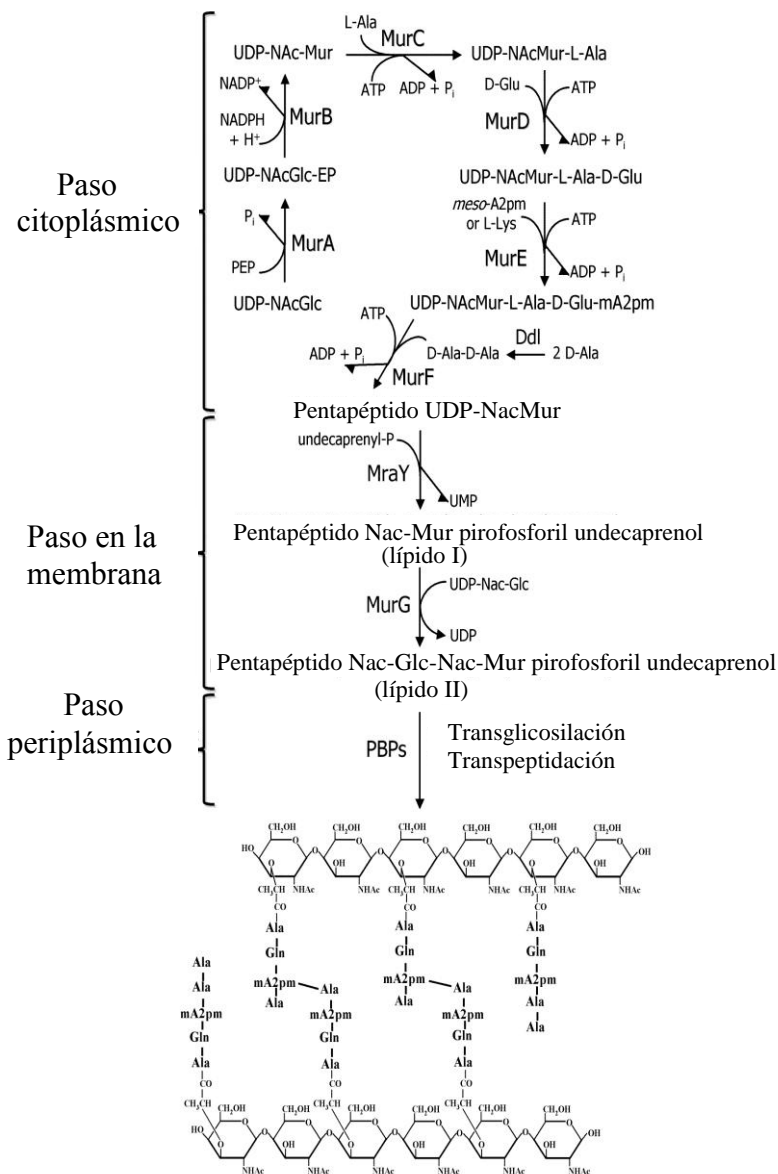


Figura 9: Representación esquemática de la ruta biosintética de la pared bacteriana. Se muestran los pasos citoplásmicos, de membrana y periplásmicos junto con la estructura del producto de la capa de pared celular, compuesta por UDP-N-acetilglucosamina y ácido UDP-N-acetilmurámico entrecruzados por cadenas peptídicas. Adaptado de Paradis-Bleau y colaboradores (Arias y Murray, 2012).

E. faecium altamente resistente a ampicilina (Mainardi *et al. et al.*, 2002). El mutante exhibía un entrecruzamiento del tipo L-Lys-3-D-Asx-L-Lys en su peptidoglicano, producto de la L,D-transpeptidación y no de la D,D-transpeptidación llevada a cabo por las PBPs, manteniéndose intacta la composición del peptidoglicano. La proporción entre D,D- y L,D-transpeptidación es un factor determinante de la resistencia a ampicilina (Manson *et al. et al.*, 2010). Para una alta resistencia a ampicilina es necesario que D,D-carboxipeptidasas muy activas y resistentes a beta-lactámicos eliminen parte del péptido de los precursores normales del peptidoglicano para crear el sustrato para la L,D-transpeptidasa. Se ha identificado la metalo-D,D-carboxipeptidasa (DdcY) como responsable de la ruptura de los precursores del peptidoglicano y a la enzima Ldt_{fm}, que parece expresarse constitutivamente en *E. faecium*, como responsable de la formación de la L,D-transpeptidación. La función biológica de Ldt_{fm} no está clara, aunque parece tener un papel en el mantenimiento de la estructura del peptidoglicano en la fase estacionaria. Resulta muy relevante tener en cuenta que la activación de la vía de la L,D-transpeptidasa puede resultar en resistencia cruzada a beta-lactámicos y glicopéptidos (Mainardi *et al.*, 2000).

Resistencia a glicopéptidos

Los glicopéptidos vancomicina, teicoplanina y sus nuevos derivados se utilizan para tratar infecciones graves causadas por bacterias Gram positivas. En el año

2007 el 5% de los aislados de *E. faecalis* eran resistentes a vancomicina (Hidron *et al.*, 2008). En *E. faecium* la resistencia pasó en EEUU del 0% a mediados de los años 80 al 80% en el año 2007 (Arias y Murray, 2008).

Los glicopéptidos interfieren con la síntesis de la pared bacteriana al formar complejos con el extremo D-Ala-D-Ala del péptido de los precursores del peptidoglicano de manera que éstos no pueden ser utilizados en la síntesis de la pared. El enterococo adquiere la resistencia a los glicopéptidos por medio de la modificación de la diana, ya que el extremo del péptido va a pasar a ser D-Ala-D-lactato (alta resistencia a glicopéptidos) o D-Ala-D-Ser (baja resistencia a glicopéptidos). Se han identificado en enterococos 9 *clusters* o conjuntos de genes que confieren resistencia a glicopéptidos con diferentes peculiaridades según el operón Van que presenten (Gilmore, 2014). El operón VanA está localizado en el transposón Tn1546 (Dworkin *et al.*, 2006). Cabe destacar que el primer aislado con una alta resistencia a vancomicina de *S. aureus* se describió en 2002 (Chang *et al.*, 2003) y contenía el operón VanA (Clark *et al.*, 1993) en el transposón Tn1546, que se encuentra frecuentemente en plásmidos de enterococos resistentes a vancomicina (Weigel *et al.*, 2003). Otro mecanismo de resistencia a los glicopéptidos es la formación de un pentapéptido acabado en D-Ala que no es reconocido por los glicopéptidos. Este sustrato, producto de la acción de D,D-dipeptidasas y carboxipeptidasas sobre los precursores de peptidoglicano

originales (Arias y Murray, 2012), puede ser utilizado para llevar a cabo el entrecruzamiento por la enzima Ldt_{fm}, una L-D transpeptidasa (Cremniter *et al.*, 2006).

Resistencia a beta-lactámicos

El entrecruzamiento de las cadenas peptídicas del peptidoglicano de la pared bacteriana se lleva a cabo por las enzimas D,D-transpeptidasas o PBPs (*penicillin binding protein*). Este paso es fundamental para la síntesis de la pared bacteriana. Los beta-lactámicos simulan la cadena peptídica, sustrato de las PBPs, y por tanto, estas enzimas se unen a ellos. Las PBPs modificadas por los antibióticos quedan inactivadas y no van a poder ejercer su papel en la síntesis de la pared bacteriana.

Los enterococos no son susceptibles a los beta-lactámicos en general, aunque el nivel de resistencia a cada antibiótico varía en cada especie (Gilmore, 2014). Las penicilinas son los más activos frente a los enterococos, siendo *E. faecalis* algo más sensible que *E. faecium*, las carbapenemas algo menos y las cefalosporinas son los que menos actividad presentan frente a los enterococos. Así, la ampicilina se puede utilizar en el caso de infecciones por enterococos susceptibles a la misma, mientras que las cefalosporinas no se utilizan en clínica. La resistencia intrínseca está mediada por PBPs codificadas en el cromosoma con baja afinidad por los antibióticos. Estas PBPs son capaces de llevar a cabo la transpeptidación del

peptidoglicano cuando las otras PBP5 están saturadas por el antibiótico (Canepari *et al.*, 1986). Esta PBP5 es necesaria para la resistencia intrínseca a cefalosporinas y para la resistencia adquirida o aumentada a beta-lactámicos como la ampicilina, ya que sin ella serían susceptibles (Arbeloa *et al.*, 2004; Rice, 2005). La adquisición de un aumento en la resistencia o resistencia “adquirida” suele tener su base en mutaciones en la PBP5 (Oyamada *et al.*, 2006a).

Resistencia intrínseca a cefalosporinas

Las cefalosporinas pertenecen a la familia de los beta-lactámicos y han sido una de las familias de antibióticos más prescritas en Estados Unidos (Kalman y Barriere, 1990). Su estructura se basa en un anillo beta-lactámico y las diferentes cadenas laterales pueden tener impacto en su espectro de acción y en sus propiedades farmacocinéticas. Así, sustituciones en C7 afectan a su espectro de actividad y a la resistencia frente a betalactamasas, mientras que modificaciones en la R2 pueden tener impacto en la farmacocinética y en su toxicidad (Kalman y Barriere, 1990). Por ejemplo, las metoximino cefalosporinas (cefepime y cefpirome, entre otras), tienen una mayor permeabilidad a través de la membrana de las bacterias Gram negativas y son más estables frente a las beta-lactamasas (Nikaido *et al.*, 1990).

Enterococcus faecalis y *Enterococcus faecium* son intrínsecamente resistentes a las cefalosporinas (**Figura 10**). Un tratamiento previo con cefalosporinas de amplio espectro ha demostrado ser un factor de riesgo para la adquisición de una infección hospitalaria causada por enterococos (Shepard y Gilmore, 2002). Ante un tratamiento de este tipo, los enterococos proliferan hasta alcanzar densidades anormalmente altas en el tracto gastrointestinal, lo que facilita su diseminación a otras localizaciones orgánicas y la subsiguiente emergencia de procesos infecciosos (Shepard y Gilmore, 2002). A pesar de que esto se conoce desde hace años, los mecanismos moleculares subyacentes a esta resistencia aún no están del todo esclarecidos. En *Enterococcus faecalis* se han descrito una serie de determinantes genéticos necesarios para dicha resistencia, tal y como se detalla a continuación.

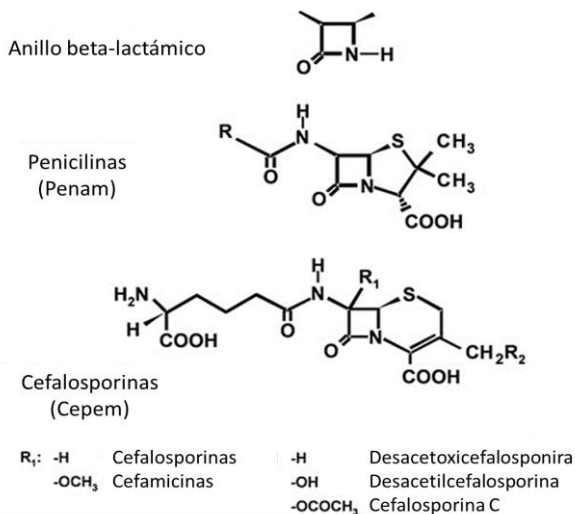


Figura 10: Estructura química del anillo beta-lactámico, de las penicilinas (núcleo penam) y de las cefalosporinas (núcleo cepem). Las diferentes penicilinas contienen cadenas laterales hidrofílicas o hidrofóbicas diferentes (R). Los grupos R1 y R2 de las cefalosporinas o cefamicinas se indican bajo la estructura de la cefalosporina. Adaptado de Martín y colaboradores, 2010 (Paradis-Bleau *et al.*, 2008).

PBP con baja afinidad por los beta-lactámicos

Estudios genéticos en cepas isogénicas han demostrado que una PBP de baja afinidad por los beta-lactámicos es necesaria para la resistencia a cefalosporinas en *E. faecalis* y en *E. faecium* (Arbeloa *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2005). Las PBPs se clasifican tradicionalmente en clase A, con un alto peso molecular y actividades transglicosilasa y transpeptidasa, y en clase B, con actividad transpeptidasa. La PBP de baja afinidad por los beta-lactámicos es de clase B, por lo que debe actuar en cooperación con una enzima con actividad transglicosilasa para que la síntesis de la pared pueda llevarse a cabo. Los candidatos son las PBPs de clase A o una transglicosilasa monofuncional, pero hasta el momento este último tipo de enzima no ha sido descrito en el enterococo. Esta PBP de baja afinidad puede actuar con una o dos de las PBPs de clase A del enterococo, PBPF o PonA, pero no con la tercera, PBPZ. Se ha visto que mutantes sin ninguna de estas PBPs de clase A son viables aunque son sensibles a cefalosporinas, por lo que parece haber al menos una enzima, no descrita hasta el momento, con actividad transglicosilasa pero incapaz de actuar en conjunto con la PBP de baja afinidad. La delección de las PBPs de Clase A en *E. faecium* reveló una disociación en la expresión de la resistencia a ceftriaxona y a ampicilina que no se observó en *E. faecalis* (Rice *et al.*, 2005), sugiriendo que la transpeptidación mediada por la PBP de baja afinidad

otorga diferente susceptibilidad a beta-lactámicos en función de la glicosiltransferasa con la que interactúe.

Sistemas de dos componentes

Además de la PBP de baja afinidad, entre los determinantes necesarios para la resistencia a cefalosporinas se encuentran dos sistemas de dos componentes.

Uno de ellos es CroRS. CroRS es un sistema de dos componentes en el que CroS se corresponde con la kinasa. CroS se autofosforila de un modo ATP dependiente y luego pasa ese grupo fosforilo al regulador de respuesta CroR, estando ambos genes codificados en el operón *croRS*. A lo largo del genoma de *E. faecalis* V583 se encuentran codificados 17 sistemas de transducción de señal de dos componentes. En un estudio llevado a cabo por Hancock en 2004 se inactivó cada uno de ellos (Hancock y Perego, 2004). Al inactivar el sistema CroRS se observó que la bacteria se volvía sensible a las cefalosporinas (Hancock y Perego, 2004). El perfil de antibiorresistencia de mutantes del sistema CroRS en JH2-2, con un entorno genético diferente, exhibía sensibilidad a cefalosporinas (Comenge *et al.*, 2003). El tratamiento de *E. faecalis* con antibióticos activos frente a la pared celular resulta en una inducción de la transcripción de un promotor dependiente de CroR. En este mismo trabajo de Comenge y col. estudiaron la estructura citoplasmática de los precursores del peptidoglicano y el muropéptido y

concluyeron que no existían diferencias a este nivel entre la cepa silvestre y la cepa $\Delta croRS$. Tampoco se veía alterada la expresión de la PBP de baja afinidad. La proteína CroR, reguladora de la respuesta, contiene un dominio de unión al ADN. Hasta ahora, se han descrito pocos genes cuya transcripción se encuentre directamente controlada por ella. Entre ellos está *salB*, que codifica para una proteína de secreción que no parece estar relacionada con la resistencia a cefalosporinas, el propio operón *croRS* (Muller *et al.*, 2006) y un operón que codifica para un transportador de glutamina del tipo ABC (Le Breton *et al.*, 2007).

Otro sistema de dos componentes implicado en la resistencia intrínseca a cefalosporinas es el conformado por las proteínas IreK e IreP. IreK es una proteína de transducción de señal de la familia de las Ser/Thr (*serine/threonine*, serina/treonina) quinasas que exhibe una arquitectura de dominio bipartito. Esta familia tiene un dominio quinasa citoplasmático separado por un segmento transmembrana de una serie de dominios PASTA que teóricamente se unen al peptidoglicano o a fragmentos del mismo (Maestro *et al.*, 2011; Mir *et al.*, 2011; Yeats *et al.*, 2002). Estos dominios podrían permitir a la bacteria dar una respuesta en consonancia con el estado del peptidoglicano (Shah *et al.*, 2008).

Un mutante de delección para esta proteína mostró que la misma era necesaria para la resistencia intrínseca a cefalosporinas y para otras moléculas que causan estrés en la envoltura celular, como son los detergentes de las sales biliares (Kuch

et al., 2012). La actividad quinasa de la enzima es necesaria para la resistencia intrínseca a cefalosporinas (Kristich *et al.*, 2007). Esta actividad quinasa permite la autofosforilación de varios residuos de treonina que se encuentran en el llamado *loop* o asa de activación, aumentando la actividad de la quinasa y consecuentemente la resistencia a cefalosporinas.

Muchas bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C presentan un homólogo de IreK en su genoma y el mismo está normalmente codificado junto a una fosfatasa del tipo PP2C, que en este caso es IreP. IreP puede defosforilar a IreK y a los sustratos de IreK. Mutantes en *ireP* son hiperresistentes a cefalosporinas, fenotipo que concuerda con el observado en el caso de la hiperactivación de IreK (Kristich *et al.*, 2007). La mutación de IreP parece tener un alto coste biológico asociado, lo que permite especular que la red que regula la resistencia a cefalosporinas sea tan compleja debido al alto coste biológico que conlleva. Se ha descrito una tercera proteína, IreB, sustrato tanto de IreK como de IreP y que parece regular negativamente la resistencia a cefalosporinas (Hall *et al.*, 2013). Al delecionar IreB e IreK, se recuperaba la resistencia a cefalosporinas por falta de inhibición en la vía.

MurAA

MurAA se describió en el año 2012 como determinante de la resistencia intrínseca a cefalosporinas. En los genomas de *E. faecalis* (Paulsen *et al.*, 2003) y de *E. faecium* (Qin *et al.*, 2012) se encuentran dos genes homólogos, *murAA* y *murAB*, que codifican para la enzima que cataliza el primer paso en la síntesis del precursor de peptidoglicano, la UDP-*N*-acetilglucosamina-1-carboxivinil-transferasa (**Figura 11**). Esta enzima cataliza la conversión de UDP-*N*-acetilglucosamina en UDP-*N*-acetilglucosamina-enolpiruvato en presencia de fosfoenolpiruvato. El mutante de delección de *murAA*, pero no de *murAB*, presenta aumentada la susceptibilidad del enterococo a cefalosporinas, mientras que su sobreexpresión en un mutante para *ireK* incrementa la resistencia de éste a cefalosporinas. La actividad enzimática de MurAA es necesaria pero no suficiente para este papel y también otorga a MurAA un rol por debajo al de IreK en la red de regulación de la resistencia intrínseca a cefalosporinas (Vesić y Kristich, 2012). Al expresar *murAA* en mutantes de delección de *croR* o de *pbp5* no se recuperaba la resistencia a ceftriaxona de estos últimos mutantes.

RNA polimerasa

En un estudio realizado por Kristich y Little en 2012 (Kristich y Little, 2012) probaron que mutaciones en la subunidad beta de la ARN polimerasa alteran el

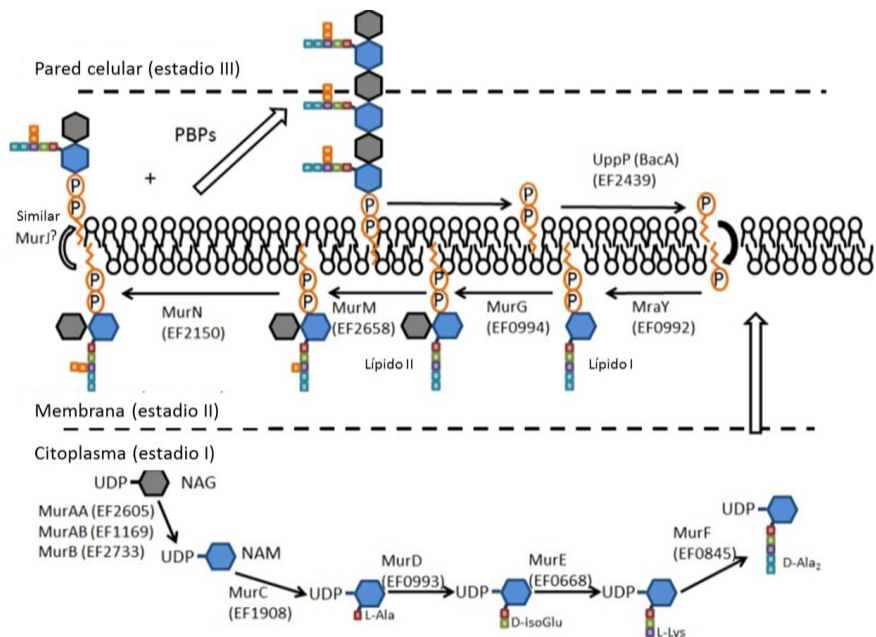


Figura 11: Biosíntesis del peptidoglicano. Están indicados el nombre común de cada enzima y el gen que lo codifica en *E. faecalis*. Adaptado de Gilmore y col., 2014 (Gilmore, 2014).

fenotipo de resistencia a cefalosporinas de manera alelo específica, sin afectar a la susceptibilidad a otros antibióticos. Estos mutantes fueron seleccionados por ser resistentes a rifampicina, pero algunos de esos alelos han probado incrementar la resistencia a cefalosporinas en varios linajes de *Enterococcus faecalis* y en dos linajes de *Enterococcus faecium*. El alelo que mayor resistencia confería fue introducido en mutantes de delección para *ireK* o *pbp5*, de tal manera que la bacteria mantenía el fenotipo de susceptibilidad a cefalosporinas propia de los mutantes de delección mencionados, lo que sugiere que este alelo no puede

contrarrestar el efecto de la delección de dichos genes. El mecanismo sugerido para la resistencia a cefalosporinas mostrada por los mutantes en *rpoB* es la alteración en la transcripción de genes importantes para la adaptación al estrés causado por cefalosporinas. Estos genes aún se desconocen.

Sistema SOS

Descubrimiento

Todos los organismos poseen una serie de programas genéticos que se utilizan para alterar la fisiología celular en respuesta al estrés ambiental (Simmons *et al.*, 2008). La respuesta SOS es una red de regulación global dirigida a sobrellevar un daño en el ADN (Erill *et al.*, 2007).

El término SOS lo acuñó Miroslav Radman en 1974 a la luz de varias observaciones realizadas en células de *E. coli* irradiadas con luz ultravioleta. Jean Weigle en 1953 (Weigle, 1953) demostró que la reactivación del fago lambda irradiado era mayor en células de *E. coli* irradiadas; Borek y Ryan en 1958 (Borek y Ryan, 1958) y Hertman y Luria en 1967 (Hertman y Luria, 1967) constataron la inducción al ciclo lítico de profagos y la muerte bacteriana al irradiar *E. coli* y, por último, Green y colaboradores vieron en 1969 (Green *et al.*, 1969) el crecimiento en filamentos de *E. coli* en respuesta a la luz ultravioleta. Radman propuso entonces su hipótesis de la respuesta SOS como respuesta global al daño en el

ADN (Radman, 1975). Los fenómenos descritos se relacionaron luego con la susceptibilidad a la irradiación de mutantes de LexA y RecA (Gudas y Pardee, 1975), los principales reguladores de la respuesta (Little y Mount, 1982).

Este sistema es una respuesta global de la bacteria ante la exposición a agentes que dañan el ADN (Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000). Esta vía está conformada por una serie genes, unos 40 en *E. coli* (Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000), cuyas funciones abarcan la reparación del ADN (reparación por excisión de nucleótido, replicación por translesión, recombinación) y la inhibición de la división celular mediante la inducción de la proteína SulA a fin de evitar la multiplicación bacteriana cuando hay un daño en el ADN (Trusca *et al.*, 1998). La transcripción de los genes englobados en este regulón se rige principalmente por dos proteínas, RecA y LexA, que constituyen, respectivamente, el activador y el represor del sistema (Little y Mount, 1982).

Mecanismo general: Regulación básica, objetivos y estrategias

El estudio de esta respuesta en *E. coli* ha sido una referencia de los sistemas de respuesta al estrés en bacterias (Erill *et al.*, 2007). Por ello, vamos a describir el sistema SOS en esta bacteria (**Figura 12**). Para ello nos vamos a basar en diversas revisiones que se han hecho sobre el tema por Walker en 1984 (Walker, 1984), d'Ari en 1985 (d'Ari, 1985) y Shinagawa en 1995 (Shinagawa, 1996). En ausencia

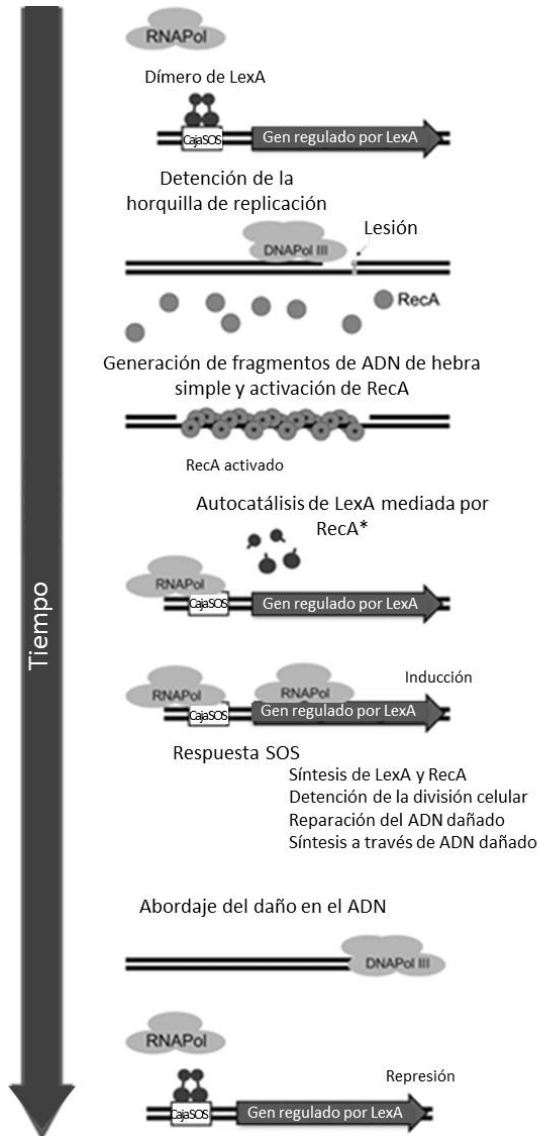


Figura 12: LexA está inicialmente unida a las cajas SOS aguas arriba de los genes SOS y bloquea su transcripción al impedir la actividad de la ARN polimerasa. Las lesiones en el ADN activan RecA, y RecA activado induce la autocatálisis de LexA de manera que LexA ya no puede formar dímeros y unirse a las cajas SOS, desreprimiéndose el sistema. Adaptado de Erill *et al.*, 2007 (Erill *et al.*, 2007).

de daño en el material genético, los genes del regulón se encuentran reprimidos por la unión de LexA a la región promotora de dichos genes. La proteína LexA se une a través de su extremo N-terminal en forma de dímeros a una secuencia consenso palindrómica de 16 pares de bases, la cual en *E. coli* se corresponde con CTGTATATATACAG. Estas secuencias de unión son las cajas SOS o cajas LexA y se encuentran en la región promotora u operadora de los genes (Horii *et al.*, 1981; Lewis *et al.*, 1994; Schlacher *et al.*, 2006a; Walker, 1984).

La unión del dímero de LexA a la caja SOS interfiere físicamente con la unión de la ARN polimerasa, bloqueando el inicio de la transcripción y reprimiendo la expresión del gen. La mayoría de los genes se transcriben de manera independiente pero hay también operones de dos genes, como por ejemplo *umuDC* o *ruvAB*. Hay genes que presentan más de una caja LexA. *lexA* e *ydjM* tienen dos cajas separadas por una y dos pares de bases respectivamente, y *recN* tiene tres cajas (Janion, 2008).

La autocatálisis de LexA va a dar lugar a una expresión programada de una serie de genes (Crowley y Courcelle, 2002) enfocados a lidiar con el daño en el ADN y su efecto sobre la célula. El momento de la expresión de los genes del regulón va a venir determinado por diferentes factores: i) secuencia de la caja LexA, que va a determinar la intensidad de la unión del represor y cómo de fácil

va a ser eliminarlo tras su autocatálisis, ii) su posición en la región promotora y iii) si el promotor es fuerte o débil (Michel, 2005).

Cuando se detiene la horquilla de replicación, uno de los principales desencadenantes de la inducción del sistema SOS (Erill *et al.*, 2007), RecA y SSB (*Single Strand Binding protein*, proteína de unión a hebra simple) se inducen rápidamente para proteger y estabilizar el ADN. Una vez estabilizado el ADN, se expresan una serie de genes, *uvrA*, *uvrB*, *ydjQ*, *uvrD*, *recN* y *ruvAB* entre otros, cuyo objetivo va a ser la reparación del material genético a través de procesos de recombinación y de la escisión de nucleótidos (Walker, 1984). En caso de lesiones que no son fáciles de reparar y para permitir el avance de la replicación, el sistema SOS regula tres polimerasas especiales, codificadas por los genes *polB*, *dinB* y *umuDC*. Estas polimerasas tienen la capacidad de sintetizar ADN teniendo como molde una hebra dañada, siendo capaces sobrepasar la lesión del material genético (*translesion DNA synthesis*) (Jarosz *et al.*, 2007; Napolitano *et al.*, 2000). Estas polimerasas son de baja procesividad y fidelidad, pero su capacidad para trabajar a través de bases dañadas del ADN permite que la replicación continúe. La célula sacrifica la fidelidad genética a largo plazo por la viabilidad a corto plazo (Erill *et al.*, 2007).

La respuesta SOS actúa en la división celular de *E. coli* regulando varios genes implicados en la formación del septo (Erill *et al.*, 2007). La inducción de *sulA*

inhibe la formación del septo mediante la interacción del producto de *ftsZ*, dando lugar a filamentación (Trusca *et al.*, 1998).

Una vez que se ha reparado el ADN, RecA va a dejar de activarse porque ya no hay ADN de hebra simple. Como RecA y LexA se van a despreimir durante la respuesta SOS (Walker, 1984), los dímeros de LexA van a aumentar rápidamente a medida que aumentan los niveles de RecA sin activar, volviendo el sistema a su estado silenciado (Erill *et al.*, 2007).

Estímulos desencadenantes de la respuesta SOS

En la inducción del sistema SOS es importante el aumento de la cantidad de ADN de hebra sencilla en la célula. No obstante, ésta no es su única vía de activación. Esto puede ocurrir bajo diferentes estímulos, tanto externos o como internos (**Figura 13**).

La primera vez que se vieron evidencias de la respuesta SOS fue tras la irradiación de células de *E. coli* con luz ultravioleta. Pronto se identificaron otros agentes que también causaban daño en el ADN como desencadenantes de la misma, como por ejemplo la mitomicina C, que causa roturas en el ADN al ser un agente alquilante (Costa de Oliveira *et al.*, 1987). De este modo, se hizo patente que era una respuesta general ante un material genético dañado. La exposición de *E. coli* a mitomicina C altera la expresión de más de 1000 genes (Courcelle *et al.*,

2001; Khil y Camerini-Otero, 2002; Quillardet *et al.*, 2003). Dentro de esta amplia respuesta celular ante un daño en el material genético es donde se encuentra enmarcado el sistema SOS.

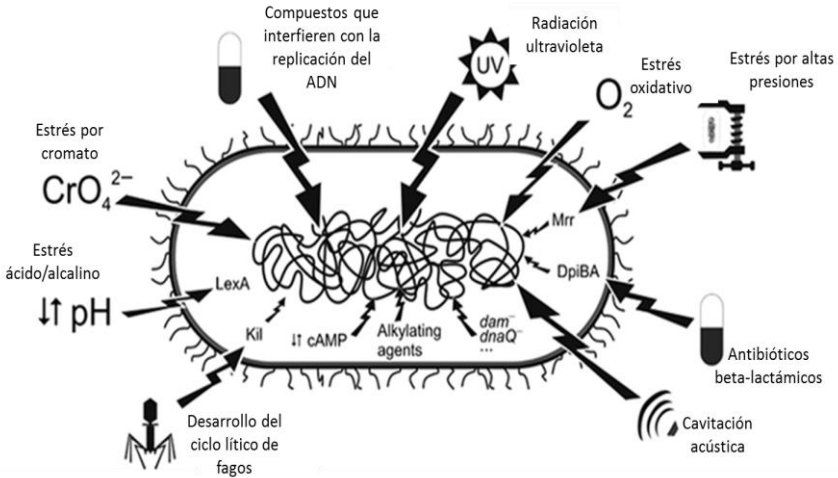


Figura 13: Estímulos inductores directos e indirectos de la respuesta SOS. Las moléculas intermediarias están dentro de sus respectivas vías. Los estímulos endógenos se encuentran designados por el nombre de las moléculas o mutaciones sin flechas externas. Adaptado de Erill *et al.*, 2007(Erill *et al.*, 2007).

Estímulos externos

El estrés oxidativo (Imlay y Linn, 1987), un shock de cromato (Ackerley *et al.*, 2006) o la cavitación acústica (Vollmer *et al.*, 1998) desencadenan la activación

del regulón al dañar el ADN. Un pH alto puede desencadenar *in vitro* la autodigestión de LexA, lo que constituye un mecanismo independiente de RecA (Smith *et al.*, 1991). *In vivo*, un pH intracelular bajo cambia la conformación de LexA y aumenta su afinidad por regiones inespecíficas del ADN. Esto genera una desrepresión gradual del sistema SOS independiente de la proteína RecA (Sousa *et al.*, 2006). En *Salmonella enterica* la respuesta SOS se activa durante el ciclo lítico de bacteriófagos infectivos. En este proceso parece tener importancia la proteína codificada por el gen *kil* de los bacteriófagos (Campoy *et al.*, 2006). Las altas presiones van a promover la activación de una endonucleasa de restricción críptica de tipo IV, Mrr, lo que produce roturas en el ADN de doble hebra desencadenando la respuesta SOS (Aertsen y Michiels, 2005).

Estímulos internos

El primer inductor intracelular identificado fue el aumento de AMPc en situaciones de falta de nutrientes en *E. coli* (Taddei *et al.*, 1995). Esto relaciona la respuesta SOS al metabolismo celular y a la mutación adaptativa (Erill *et al.*, 2007). Productos del metabolismo celular como las aminos nitrosadas o la S-adenosilmetionina son agentes alquilantes que inducen la respuesta SOS de manera eficiente (Drabløs *et al.*, 2004; Mizrahi y Andersen, 1998; Volkert *et al.*, 1989). Las mutaciones en genes relacionados con las rutas de reparación o replicación del ADN pueden provocar la inducción constitutiva del sistema SOS.

Se han identificado hasta 42 genes cuya inactivación tiene este efecto (O'Reilly y Kreuzer, 2004).

Los antibióticos y la respuesta SOS

Existen vías por las que los antibióticos beta-lactámicos inducen la respuesta SOS (Miller *et al.*, 2004). Este grupo de antibióticos va a causar un estrés en la pared celular, lo que va a ser detectado por el sistema de transducción de señal de dos componentes DpiAB. En el modelo propuesto, la proteína DpiB detectaría el estrés de la pared mientras que DpiA se induciría y se uniría a las regiones ricas en AT del origen de replicación del cromosoma. DpiA compete con las proteínas de la replicación DnaA y DnaB por la unión al cromosoma y detiene la replicación. La detención de la replicación induciría la respuesta SOS (Miller *et al.*, 2003). Solo las bacterias que se están dividiendo son susceptibles a los antibióticos bactericidas, por lo que la detención de la replicación puede ser un arma frente al ataque de los antibióticos (Amoils, 2004). Esto hace del sistema SOS una posible nueva diana terapéutica para aumentar la eficacia de los beta-lactámicos (Miller *et al.*, 2004). La inducción de la respuesta SOS por beta-lactámicos también se ha descrito en *S. aureus*, promoviendo por medio de la inducción del regulón SOS la diseminación de islas de patogenicidad (Maiques *et al.*, 2006). Se han descrito vías independientes a RecA y LexA por las que los antibióticos pueden promover la mutación y la recombinación: hay beta-lactámicos (ceftazidima, aztreonam o

imipenem) capaces de inducir la proteína DinB en *E. coli* promoviendo la síntesis por translesión y las mutaciones en el material genético (Pérez-Capilla *et al.*, 2005). Así mismo, se ha visto que las fluoroquinolonas son capaces de promover la recombinación intra e intercromosómica en *E. coli* a través de los sistemas RecBCD y RecFOR (López *et al.*, 2007).

Hay una relación entre el sistema SOS y la mutagénesis adaptativa (Yeiser *et al.*, 2002) ya que dentro del regulón SOS están *umuD*, *polB* y *dinB*, genes de polimerasas propensas al error (*error prone polymerases*) (Bagg *et al.*, 1981; Bonner *et al.*, 1988; Erill *et al.*, 2007; Iwasaki *et al.*, 1990; Reuven *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999). Este hecho ha cobrado más importancia al constatar que para el desarrollo de resistencia a ciprofloxacina y a rifampicina en modelos animales es necesaria la mutagénesis inducida por SOS (Cirz *et al.*, 2005; Cirz *et al.*, 2006). A este mecanismo evolutivo hay que sumarle otra polimerasa tendente al error, ya que el gen *dnaE2*, codificante de una subunidad alfa tendente a error de la ADN polimerasa III, también está bajo la regulación de LexA (Abella *et al.*, 2004).

Por tanto, a la hora de hacer un uso racional de los antibióticos hay que tener en cuenta que la habilidad de los mismos para inducir la respuesta SOS o genes que pertenecen a la misma y la conexión entre la respuesta SOS y la movilización

de elementos genéticos móviles que portan genes de resistencia pueden constituir un mecanismo evolutivo (Erill *et al.*, 2007).

Funcionamiento del regulón SOS

RecA: importancia, función y modulación

La proteína RecA forma parte del regulón SOS (Little y Mount, 1982) y actúa sobre él como un sensor del mismo. RecA va a desencadenar la inducción del sistema en presencia de ADN de hebra sencilla, ya sea por daño en el ADN, por un bloqueo en la replicación o por el procesamiento enzimático de los extremos de ADN tras una rotura del mismo, caso en el que la exonucleasa codificada por *recBC* juega un papel esencial (Barbé *et al.*, 1985). La proteína RecA se va a unir de manera inespecífica al ADN de cadena sencilla y va a formar nucleofilamentos pasando a su forma activa, RecA*. RecA* tiene función de coproteasa facilitando y promoviendo la ruptura autocatalítica de LexA (Little, 1991), de UmuD y del represor CI del fago lambda. La actividad coproteasa dota a RecA de un papel regulador ya que la ruptura autocatalítica de LexA es una condición necesaria para la activación del sistema por la vía clásica (Walker, 2000) y UmuD es un punto de control del daño en el material genético. La proteína RecA también participa en los procesos de recombinación, alineamiento y apareamiento de dos moléculas de ADN para promover el intercambio de hebras y la posterior migración de rama (Cox *et al.*, 2002; Cox, 1999, 2003; Lusetti y Cox, 2002) y parece facilitar

directamente la replicación mediada por la polimerasa V a través de lesiones en el ADN (Echols y Goodman, 1991; Pham *et al.*, 2002; Schlacher *et al.*, 2006a).

La dinámica básica que hemos descrito se encuentra luego más finamente regulada y sus tiempos más definidos por una serie de elementos que modulan la respuesta SOS. Algunos de estos elementos están incluidos en el propio regulón. Muchos de ellos ejercen su acción a través de la regulación de la proteína RecA y su unión al ADN. Aunque en principio cualquiera de las diferentes funciones de RecA puede ser regulada, la que más se ha estudiado ha sido la regulación de la recombinación, función importante en la regresión de la horquilla de replicación.

La estructura de la proteína RecA fue descrita por primera vez por Story y colaboradores en 1992 (Story *et al.*, 1992). Para que RecA pueda ejercer sus diferentes funciones tiene que formar un nucleofilamento y los factores que afectan a la formación del mismo pueden estar bajo el control del propio regulón SOS. Tanto el ensamblamiento como el desensamblamiento del nucleofilamento van a afectar directamente a la inducción del sistema SOS, ya que éste es necesario para que RecA se active y pueda actuar como coproteasa de LexA. En primer lugar cabe destacar que existe una autorregulación de la función de la proteína RecA, ya que en su extremo C-terminal hay una serie de residuos que actúan como una pestaña autorreguladora y que es con la que interactúan los distintos elementos reguladores (Eggler *et al.*, 2003). El ensamblamiento precisa de dATP o ATP y

consta de una fase de nucleación, lenta y por tanto limitante, y de una fase de extensión, que suele ocurrir de forma rápida. La disociación, por otra parte, precisa de actividad ATPasa y es mucho más lenta (Galletto *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2006). SSB (*Single Strand Binding Protein*), proteína de unión a hebra sencilla, forma parte del regulón SOS (Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000) y cumple una función reguladora, pudiéndose entender como una proteína que sirve de marco en la organización del ensamblaje de los complejos metabólicos en los que participa el ADN (Cox, 2007). La nucleación ocurre más rápidamente en ADN de cadena sencilla que en cadena doble, y es ralentizada si SSB ya se encuentra unida a dicha hebra. La nucleación del filamento de RecA es inhibida, y a veces incluso completamente bloqueada, si se permite que SSB recubra la hebra simple de ADN antes de la adición de RecA (Bork *et al.*, 2001; Shan *et al.*, 1997), inhibición abolida por las proteínas mediadoras RecO y RecR (Bork *et al.*, 2001). SSB cumple otro papel en la formación del filamento ya que RecA no es capaz de unirse bien a la estructura secundaria de la hebra de cadena simple, de tal manera que la adición posterior a RecA de SSB desestabiliza la estructura secundaria de dicha hebra permitiendo la formación de un filamento contiguo por parte de RecA en el ADN (Bork *et al.*, 2001; Kowalczykowski *et al.*, 1987).

La helicasa/nucleasa RecBCD, por su parte, va a cargar activamente la proteína RecA en la hebra simple de ADN que ella misma va a crear (Anderson *et al.*,

1999) a través de un lugar de interacción en RecB (Churchill y Kowalczykowski, 2000). Así, participa en la activación de RecA.

Las proteínas mediadoras RecFOR también parecen tener un papel en la interacción entre RecA y la hebra simple de ADN. Se ha propuesto que RecF dirige directamente la carga de RecA en los límites de las secciones de hebra simple en el ADN de cadena doble (Hegde *et al.*, 1996a). El conjunto de las tres proteínas parece tener un papel en el desplazamiento de la SSB del ADN de hebra simple y en la modulación de la formación del nucleofilamento de RecA. Esto se ve reflejado en que los mutantes en cualquiera de estas tres proteínas presentan un retraso en la activación del sistema SOS, que puede reflejar una formación más lenta del nucleofilamento y, por tanto, una autoproteólisis más lenta de LexA (Madiraju *et al.*, 1988).

Dentro del regulón SOS, hay otras dos proteínas cuyas funciones son antagónicas. Estas proteínas son DinI y RecX.

RecX en *E. coli* se encuentra aguas abajo de RecA y se expresa desde el mismo promotor (Pagès *et al.*, 2003). Es un modulador negativo de la proteína RecA (Papavinasundaram *et al.*, 1998) y su sobreexpresión puede reducir la inducción de la respuesta SOS (Stohl *et al.*, 2003). RecX actúa como inhibidor de RecA bloqueando la extensión de los filamentos de RecA durante su ensamblaje o

propiciando el desensamblamiento del mismo mediante el modelo de encapuchamiento del filamento (*filament capping model*) (Drees *et al.*, 2004). En la interacción entre RecX y RecA es importante el extremo C-terminal de RecA.

Por su parte, DinI se induce muy pronto en la respuesta SOS (Kenyon y Walker, 2005), es un modulador positivo de RecA e inhibe la catálisis mediada por RecA de la proteína UmuD (Yasuda *et al.*, 2001), a pesar de que *in vitro* tiene un efecto limitado sobre la autocatálisis de LexA (Yasuda *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 2001). Ejerce un control positivo sobre la estabilidad del nucleofilamento pudiendo inhibir fuertemente el desensamblamiento del mismo, y, por otra parte, retrasa pero no bloquea el intercambio de hebra en la recombinación. Su interacción con RecA también se modula por el extremo C-terminal de RecA. Debido a estos efectos, ha surgido una hipótesis sobre la acción de DinI como modulador selectivo. De este modo, durante la respuesta SOS, DinI se induce con una cinética más rápida que RecA (Voloshin *et al.*, 2001), consistente con una función activadora. La única función de RecA que se inhibe consistentemente es la del clivaje de UmuD, lo que está en consonancia con los tiempos de activación del regulón. Aunque se ampliará más adelante, la regulación temporal del SOS contempla una inducción rápida de los procesos reparadores del ADN no mutagénicos, mientras que las enzimas DNA polimerasas de translesión aparecen más tarde en esta respuesta (Nohmi *et al.*, 1988; Sutton *et al.*, 1999; Sutton *et al.*,

2000). Así, DinI inhibiría la activación por parte de RecA de la Polimerasa V sin afectar a las otras funciones de RecA. RecX y DinI, de funciones opuestas, van a competir por su unión a RecA. Además, RecX, en presencia de RecF, pierde su poder inhibitor del SOS (Lusetti *et al.*, 2006).

Además de estas proteínas y de las complejas interacciones que se dan entre las mismas, existen otros componentes que participan en la regulación de sistema SOS. Uno de ellos es PsiB, codificado en plásmidos conjugativos. PsiB inhibe la inducción del SOS cuando tiene lugar la conjugación, al parecer por interacción directa con RecA o por inhibir la formación del nucleofilamento (Bagdasarian *et al.*, 1986). También suprime la respuesta SOS en casos de estrés por falta de nutrientes (McKenzie *et al.*, 2000), por lo que inhibe la mutación adaptativa (McKenzie *et al.*, 2000). La proteína RdgC (*Recombination Dependent Growth*) es una proteína de unión al ADN que se encuentra en cantidades abundantes y tiene capacidad de unirse a ADN de hebra sencilla y de doble hebra. Parece afectar a la función de RecA y a la de RecFOR. Existen evidencias de que RdgC puede tener un papel en la prevención de la carga o función inadecuada de RecA (Moore *et al.*, 2003) y compite con ella por los sitios de unión al ADN, especialmente al de cadena doble. *In vitro* es un potente inhibidor de RecA (Drees *et al.*, 2006). Dentro del regulón SOS hay otra proteína que también participa en la modulación de la respuesta, y es la helicasa UvrD, que parece estar implicada en los procesos de

reparación por recombinación de la bacteria (Mendonca y Matson, 1995). Podría tener un rol en el desmantelamiento de los filamentos de RecA.

Todas estas proteínas participan de alguna manera en la regulación de la proteína RecA, y el mecanismo por el que lo hacen algunas de ellas no está del todo claro. Incluso es posible que más proteínas se añadan a esta lista, lo que pone en evidencia el complejo mecanismo que subyace tras las diferentes funciones que desempeña RecA y su importancia.

Funciones codificadas en el regulón SOS para sobreponerse a un daño en el material genético

De los más de 50 genes que componen el regulón SOS, la mayoría de ellos van a estar directamente relacionados con la reparación del ADN, la tolerancia al daño en el mismo o a sopesar este daño para detener la división celular (Simmons *et al.*, 2008). Algunos de los genes que participan en el regulón ya han sido revisados al participar en la regulación de la proteína RecA, por lo que nos vamos a limitar a ampliar la función de otros genes del regulón.

Reparación del ADN

Recombinación

Dentro del regulón hay que destacar la proteína RecA que cumple, como hemos visto, diferentes funciones, entre las cuales están el intercambio genético, la

reparación por recombinación del ADN dependiente de RecFOR, RecN y RuvABC, y la regulación, junto con LexA, del sistema SOS (Janion, 2008). Tiene mucha más afinidad por el ADN de cadena simple que doble, y es abundante en la célula (aproximadamente 10000 moléculas si el sistema no está activado y 10 veces más cuando la respuesta SOS esta inducida (Kuzminov, 1999). Para activarse debe formar un nucleofilamento con el ADN, ocurriendo su ensamblaje en la dirección 5'-3' con un ratio de 1 molécula de RecA por cada 3 pares de bases. Como ya se ha comentado este proceso precisa de dATP o ATP pero no de actividad ATPasa, actividad necesaria para el proceso de desensamblaje, mucho más lento (Janion, 2008). Una vez formado el nucleofilamento, RecA está en su forma activa, RecA*. Su acción como coproteasa modula la expresión del sistema SOS. Promueve la autocatálisis de LexA en el lugar Ala84-Gly85, la del represor CI del fago lambda y la de UmuD, que pasa a ser UmuD'. Esto ocurre al catalizarse la lisis de UmuD en el sitio Cys24-Gly25, requisito previo para el ensamblaje de la ADN polimerasa de translesión Pol V. El factor limitante para este ensamblaje es precisamente el procesamiento de UmuD a UmuD', lo que ocurre mucho más lentamente que la autocatálisis de LexA. Así, RecA ejerce un control temporal en el desencadenamiento de la respuesta.

Los genes RuvAB participan en los procesos de reparación por recombinación catalizando la “migración de rama o de cadena” (*branch migration*) en las uniones de Holliday (*Holliday junctions*).

Reparación por escisión de nucleótidos

La exciproteasa UvrABC está implicada en la reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*). Este sistema está especializado en la reparación de aductos voluminosos o lesiones que afectan a la estructura del ADN, como dímeros de pirimidina o fotoproductos de pirimidina (Witkin, 1969). Los genes *uvrA* y *uvrB* forman parte del regulón SOS, con ratios del número de moléculas en la célula sin y con el sistema SOS activado de 20:250 y 250:1000 respectivamente, así como el gen que codifica para la proteína Cho (*UvrC homolog*), cuyo extremo N-terminal es homólogo a UvrC y que aumenta el rango de sustratos en la reparación del ADN (Moolenaar *et al.*, 2002).

UvrD, junto con RecA, es una de las proteínas inducida por daño en el ADN que más abundantemente encontramos, con un nivel basal de 8000 moléculas y diez veces más con el sistema activado. Participa en la reparación de emparejamientos erróneos (Modrich y Lahue, 1996) y también en la reparación por escisión dependiente de UvrABC y de Cho (Moolenaar *et al.*, 2002; Selby y Sancar, 1994). Esta enzima no se encuentra en *Enterococcus faecalis*. Es

homóloga a la proteína Rep, que elimina las proteínas del ADN (Yancey-Wrona *et al.*, 1992) y se ha propuesto que pueda hacer lo mismo en las horquillas de replicación del ADN facilitando la progresión del proceso (Lane y Denhardt, 1975). UvrD podría realizar esta función en los procesos recombinación y reparación del ADN. Esta helicasa participa en numerosos aspectos del metabolismo del ADN además de en la reparación de errores debidos a grupos metilo (Lahue *et al.*, 1989; Lahue *et al.*, 1987) y en la ya mencionada reparación del ADN por escisión (Kumura *et al.*, 1985). Podría tener un papel en la replicación del ADN (George *et al.*, 1994) y en la inhibición de la recombinación (Petranović *et al.*, 2001), una de las funciones más importantes en las que está implicada.

ADN polimerasas mutagénicas inducidas por el SOS

En la reparación del ADN las vías de escisión y de recombinación se consideran “libres de error” al no aumentar la tasa de mutación basal de la bacteria (Friedberg *et al.*, 1995). En cambio, en determinadas lesiones del ADN o cuando las lesiones no se pueden reparar por mecanismos libres de error, entran en juego una serie de polimerasas (*translesion polymerases*) capaces de llevar a cabo la síntesis de ADN directamente a través de las lesiones a menudo a coste de la fidelidad en dicha replicación.

Así, en *E. coli* se expresa constitutivamente la ADN polimerasa III (Pol III), pero, con la inducción del sistema SOS, las polimerasas potencialmente mutagénicas aumentan su presencia, como la polimerasa II (Pol II), que pasa de 40 a 300 moléculas, y la polimerasa IV (Pol IV) (de 250 a 2500 moléculas) o polimerasas que están ausentes si el sistema SOS no está inducido, como la polimerasa V (Pol V), con menos de 15 moléculas en la célula sin inducir. Esto no quiere decir que no haya ni UmuC ni UmuD en la célula, las proteínas que la conforman y que forman parte del regulón SOS (Burckhardt *et al.*, 1988; Woodgate y Ennis, 1991).

Tanto la ADN polimerasa II como la ADN polimerasa IV aparecen en las primeras fases de la respuesta SOS, mientras que la polimerasa V aparece posteriormente en la cascada de inducción del SOS (Schlacher *et al.*, 2006b). Esta polimerasa es la que mayor tasa de error comete y la más importante en la mutagenicidad de las bacterias con el SOS inducido (Janion, 2008). La presencia de varias polimerasas capaces de llevar a cabo la síntesis de translesión parece responder a que, según la naturaleza de la lesión, pueden ser necesarias una o dos de las mismas para, si no reparar, al menos reducir el daño en el ADN (Napolitano *et al.*, 2000). Pol IV parece una polimerasa especial para diferentes situaciones más específicas mientras que UmuD₂C parece trabajar con menor fidelidad con una especificidad de sustratos más amplia (Jarosz *et al.*, 2006).

De las tres polimerasas del regulón SOS, la DNA Pol II, que pertenece a la familia de las B-polimerasas, es la única con actividad exonucleasa 3´-5´ y prueba de lectura (Janion, 2008). Tiene por tanto menos tendencia a introducir mutaciones y está implicada en la recuperación del ADN degradado en las horquillas de replicación (Rangarajan *et al.*, 1999), sobrepasándose el daño sin incurrir en errores. Tras el estímulo desencadenante de la respuesta SOS, la replicación se para. Pero esta replicación se reinicia 30 segundos después, y en este proceso es en el que parece estar implicada la Pol II, ya que sin ella la replicación se reinicia a los 50 minutos (Rangarajan *et al.*, 1999). Para su acción es necesaria la formación de un nucleofilamento de RecA activo. Aunque el mecanismo molecular preciso del reinicio de la replicación mediado por Pol II no está del todo esclarecido, éste parece ocurrir en conjunción con las proteínas RecFOR y la proteína PriA (Kuzminov, 1999; Pham *et al.*, 2001). Parece participar también en una vía de recombinación mediada por RecA (Nohmi, 2006). Esta polimerasa está ausente en *E. faecalis*.

Las ADN polimerasas IV y V pertenecen a la familia Y de las polimerasas y son capaces de sintetizar ADN a través de lesiones capaces de detener la replicación (Jarosz *et al.*, 2006). Sus funciones especializadas vienen habitualmente acompañadas de una disminución en la fidelidad. Tienen poca actividad y fidelidad sobre ADN intacto en comparación a las ADN polimerasas

replicativas, pero funcionan mucho mejor que éstas sobre ciertos tipos de lesión en el ADN. Así, UmuD₂C tiene una tasa de mutación de 10^{-3} - 10^{-4} sobre moldes intactos y una de 10^{-2} para el fotoproducto de dímeros de ciclobutanos de T^AT (Maor-Shoshani *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000). Por su parte, Pol IV replica sobre moldes intactos y sobre un aducto en la posición N² de la guanina con una tasa de error de 10^{-3} - 10^{-5} .

La ADN Pol IV esta codificada por el gen *dinB* y ha sido implicada en la recombinación estimulada por la detención de la replicación (Lovett, 2006). A pesar de formar parte del regulón SOS, agentes que no dañan el material genético pueden inducir la transcripción de este gen, como por ejemplo los beta-lactámicos (Miller *et al.*, 2004) a través del sistema de transducción de DpiBA (Pérez-Capilla *et al.*, 2005). Para alcanzar su máxima transcripción en fase estacionaria requiere un gen *rpoS* funcional, un efecto también independiente de LexA (Layton y Foster, 2003). Existen evidencias de que el producto de *dinB* es capaz de lidiar con ADN lesionado por ciertos agentes con una fidelidad comparable a la de otros mecanismos presentes en *E. coli* (Jarosz *et al.*, 2006). Recordemos que esta polimerasa se expresa en los momentos iniciales de la inducción de la respuesta SOS (Janion, 2008). Esta polimerasa tampoco está presente en *E. faecalis*.

La ADN polimerasa V está compuesta por un heterotrímero de proteínas que forman parte del regulón SOS, UmuC y UmuD, que se combinan para dar

UmuD₂C. En el proceso de copia sobre lesiones que bloquean la progresión normal de la horquilla de replicación, las mutaciones causadas por Pol V se dirigen de manera primaria a las posiciones opuestas a los lugares dañados de la hebra molde (mutación dirigida). Se ha visto que el complejo de la Pol V es 50 veces más eficiente que la Pol III y la Pol IV copiando fotoproductos (Tang *et al.*, 2000). Aún así, esta polimerasa también es responsable de mutaciones no dirigidas sobre moldes intactos (Fijalkowska *et al.*, 1997). Parece haber un par de genes que codifican para análogos de UmuC en *E. faecalis*, EF1078 y EF1080.

Existen diferentes modelos que intentan aclarar el funcionamiento de esta polimerasa y las proteínas necesarias para llevar a cabo la síntesis por transección. Algunos modelos proponen la ADN Pol III como parte necesaria, mientras que otros no. Parece que siempre es necesaria la presencia de RecA y de SSB, y que su función se ve potenciada con la abrazadera deslizante beta y la abrazadera de carga gamma (Tang *et al.*, 1998). La presencia de un filamento de RecA proximal a la lesión de la hebra molde no solo es necesaria para la síntesis de transección catalizada por la Pol V (Tang *et al.*, 2000), sino que además parece hacerla más activa. Se ha propuesto un modelo en el que la Pol V, junto con SSB, elimina RecA de la hebra para permitir la progresión de la replicación (Schlacher *et al.*, 2006a; Schlacher *et al.*, 2006b). Una función importante que desempeña esta enzima es la de punto de control del daño en el material genético, en la que

UmuD₂C detiene la reanudación de la síntesis de ADN después del daño celular para permitir que tengan lugar los procesos de reparación libre de error. Puede que esto lo haga interaccionando con la abrazadera beta. Esta respuesta está regulada temporalmente por el clivaje de UmuD a UmuD' (Opperman *et al.*, 1999; Sutton y Walker, 2001).

Detención de la división celular

Ante un daño en el material genético, SulA, o su homólogo en *B. Subtilis*, YneA, va a impedir el ensamblamiento del anillo de FtsZ mediante su interacción con la misma imposibilitando la división celular y por tanto la segregación del material genético dañado (Bi y Lutkenhaus, 1993). SulA se expresa en los estadios finales de la inducción del sistema. Esta proteína no está presente en *Enterococcus faecalis*.

Desarrollo temporal de la respuesta SOS

El orden en el que estos genes se expresan tras la señal inductora del SOS sigue una escala temporal. La inducción del sistema SOS tiene lugar durante los 45 o 60 minutos posteriores al estímulo inductor para luego cesar abruptamente. El momento en el que cada gen es desreprimido depende de la fuerza con la que esté unido el dímero de LexA y a la facilidad con la que éste es eliminado una vez que ha autocatalizado su ruptura (Janion, 2008).

Jerarquía temporal del sistema

Los genes que se desreprimen mas rápidamente, menos de un minuto después de la señal desencadenante de la respuesta, son *lexA*, que codifica el represor del sistema, *uvrAB*, *cho* y *uvrD*, genes implicados en la reparación por escisión del nucleótido, y *ruvAB*, implicados en la recombinación. También *polB* y *dinB*, que codifican respectivamente para la Pol II y la Pol IV (Bonner *et al.*, 1990; Iwasaki *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1999), además de *dinI*, cuyo producto impide el paso de UmuD a UmuD' (Yasuda *et al.*, 1998), proteína necesaria para la síntesis de Pol V (Tang *et al.*, 1999). La expresión de los genes *recA* y *recN*, que codifican respectivamente proteínas para la recombinación y para la reparación por recombinación, ocurre 5 minutos tras la inducción de la respuesta, mientras que la de *sulA* y *umuDC* ocurre al final de la misma. Como ya se ha mencionado, SulA es un inhibidor de la división celular, causando un crecimiento filamentosos y prolongando así el tiempo en el que el ADN puede ser reparado (Kuzminov, 1999).

Desarrollo de la respuesta SOS a nivel individual

La coordinación temporal de estos eventos (reparación por escisión de nucleótido, síntesis de ADN por translesión, recombinación homóloga, detención de la división celular) durante la respuesta SOS y su silenciamiento posterior no estaba del todo esclarecida. Para entender mejor el proceso, Nir Friedman y sus

colaboradores estudiaron la modulación temporal en la respuesta SOS de la red de reparación del ADN a nivel de célula bacteriana individual (Friedman *et al.*, 2005). Para ello, midieron la actividad de los promotores reprimidos por LexA de los genes *recA*, *lexA* y el operon *umuDC*. Estas mediciones revelaron que la respuesta SOS está altamente estructurada y con una modulación temporal muy precisa. A mayor daño en el ADN, se observa una repetición en la activación del sistema SOS identificándose hasta tres picos del mismo, mientras que la amplitud de la inducción de los promotores se satura. Los picos que se observan se presentan con una gran precisión temporal. El operon *umuDC* está implicado en el mantenimiento del patrón en la activación de los promotores y en el mencionado control temporal. Parece que la proteólisis de UmuD a UmuD' es importante en la reactivación del sistema SOS 60 minutos después de que se dé el estímulo inductor.

El sistema SOS en bacterias Gram positivas

El sistema SOS en bacterias Gram positivas presenta una caja LexA cuya secuencia consenso por el momento es GAAC-N4_GTTC (Erill *et al.*, 2007). Se corresponde con la descrita para firmicutes (Janky y van Helden, 2008) (**Figura 14**). Hasta la fecha no existen estudios sobre el sistema SOS en *Enterococcus faecalis*, por lo que las peculiaridades sobre el mismo no van más allá de la ausencia de ciertos genes, como son *sulA*, *dinI*, *dinA* y *dinB*.



Figura 14: Caja LexA descrita para firmicutes (Erill *et al.*, 2007).

Importancia del sistema SOS en la virulencia

Se ha visto la implicación de este sistema en la virulencia de las bacterias y en la transferencia horizontal de genes. La inducción del sistema SOS mediada por antibióticos promueve la replicación y una alta tasa de transferencia horizontal de la isla de patogenicidad SaPIbov1, la cual codifica factores de virulencia en la bacteria *Staphylococcus aureus* (Maiques *et al.*, 2006). En *Vibrio cholerae* el profago CTXphi, en el que está codificada la toxina del cólera, se induce con el sistema SOS (Quinones *et al.*, 2005), y además SXT, un elemento conjugativo integrativo, posee un represor que RecA puede lisar, lo que induce la transferencia de SXT durante la respuesta SOS (Beaber *et al.*, 2004). En el caso de los *E. coli* enterohemorrágicos productores de la toxina shiga, ésta parece estar corregulada con el bacteriófago integrado que la codifica. Al estar la producción de fagos ligada a la respuesta SOS, la inducción de la síntesis de la toxina puede ser mediada por el sistema SOS. Este efecto también se ha visto cuando el sistema SOS se induce con algunos antibióticos como las quinolonas (Kimmitt *et al.*, 2000).

Debido a la inducción del sistema SOS en respuesta a agentes genotóxicos la bacteria puede reorganizar y mutar su genoma, propiciar diferentes cambios fenotípicos a través de un ajuste en la regulación génica y en ocasiones adquirir características que potencien la supervivencia y la adaptación de la bacteria a ambientes cambiantes (Baharoglu y Mazel, 2014). Esto puede dejar espacio a la adquisición y expresión de diferentes factores de virulencia. Se ha visto que en los integrones la inducción del sistema SOS aumenta la reorganización de casetes y su captura bajo condiciones estresantes, mientras que el integrón no sufre cambios organizativos bajo condiciones ambientales constantes. Esto se debe a que algunas integrasas se encuentra bajo el control del regulón SOS (Cambray *et al.*, 2011), lo que supone una potente herramienta adaptativa.

No olvidemos sumarle a esto que el sistema SOS promueve por sí mismo mecanismos de recombinación y mutación, aumentando la variabilidad genética en las poblaciones y por tanto la probabilidad de supervivencia en condiciones hostiles.

Justificación y Objetivos

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los enterococos son patógenos nosocomiales circunscritos habitualmente al ámbito hospitalario. La incidencia de las infecciones nosocomiales va a ir en aumento (Gilmore, 2014). Son bacterias robustas que exhiben diversos mecanismos de resistencia intrínseca frente a antibióticos de diversa naturaleza (Arias y Murray, 2012). Su plasticidad genómica les permite adquirir y diseminar resistencias a antibióticos y factores de virulencia a otras bacterias.

Esas resistencias favorecen su sobrecrecimiento tras un tratamiento antibiótico. Se ha demostrado que un tratamiento con cefalosporinas supone un riesgo para las infecciones causadas por enterococos (Shepard y Gilmore, 2002). Las cefalosporinas de tercera generación están consideradas de importancia crítica por la guía 152 de la FDA (*Food y Drug Administration*).

Resulta por tanto vital entender mejor la virulencia de esta bacteria y los mecanismos de resistencia a antibióticos que exhibe. La relación entre virulencia y el sistema SOS se ha evidenciado en diferentes especies bacterianas.

El objetivo de la presente tesis es por tanto conocer la implicación del sistema SOS en la virulencia del enterococo y en la resistencia a antibióticos, así como profundizar en la resistencia intrínseca a cefalosporinas de esta especie.

Resultados

RESULTADOS

Capítulo primero: Caracterización de la relación entre la respuesta SOS y la resistencia a antibióticos en *Enterococcus faecalis*

El sistema SOS en la bacteria *Enterococcus faecalis* no está caracterizado. Teniendo en cuenta la importancia creciente de este patógeno nosocomial, se quiso estudiar el papel que juega el sistema SOS en la virulencia del mismo. Para ello, la doctora Matrat construyó una serie de mutantes en dos entornos genéticos diferentes, siendo uno de ellos la cepa V583, el primer aislado clínico resistente a vancomicina en EEUU (Sahm *et al.*, 1989), y el otro la cepa JH2-2 (Jacob y

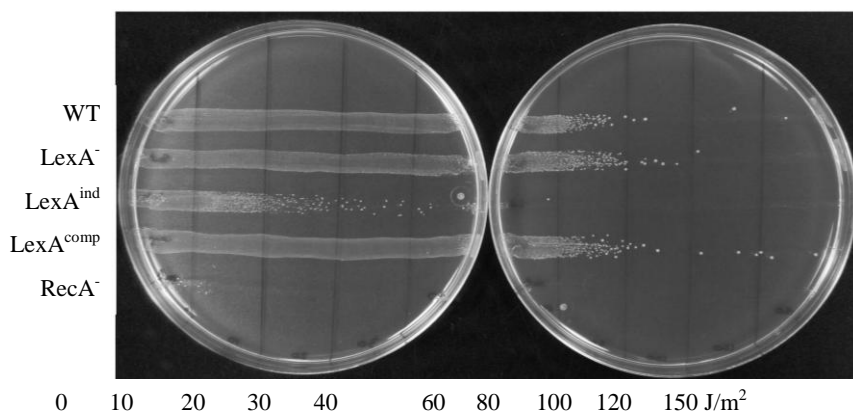


Figura 15: Resistencia a diferentes intensidades de luz ultravioleta de mutantes para componentes clave del sistema SOS realizados en la cepa *E. faecalis* V583 WT. WT, cepa V583 WT; LexA⁻, mutante de inserción en el gen *lexA* en V583 WT; LexA^{ind}, cepa V583 WT con un alelo de *lexA* que no puede llevar a cabo su autocatálisis; LexA^{comp}, V583 LexA⁻ en el que se ha perdido el plásmido que interrumpía el gen *lexA*; RecA⁻, mutante de inserción en el gen *recA* de la cepa V585 WT. La intensidad de la radiación UV a la que se han sometido está en julios por metro cuadrado.

Hobbs, 1974), ambas ampliamente utilizadas en investigación (en Pubmed, V583 rinde 786 resultados y JH2-2 528).

En estas dos cepas se construyeron una serie de mutantes para las proteínas LexA y RecA de manera que se obtuvieran cepas con la respuesta SOS constitutivamente inducida o constitutivamente inhibida. En los mutantes LexA⁻ un plásmido interrumpe el gen *lexA* de tal manera que la bacteria tiene constitutivamente inducido el operón SOS. En los mutantes LexA^{ind} el sistema SOS está constitutivamente silenciado ya que hay una mutación en la proteína LexA que impide su autocatálisis y su consiguiente eliminación de las regiones promotoras. Así, el represor LexA no puede ser eliminado de las cajas LexA. En los mutantes RecA⁻ el sistema SOS está constitutivamente reprimido ya que el gen está interrumpido por un plásmido y no hay proteína RecA que promueva la autocatálisis de LexA.

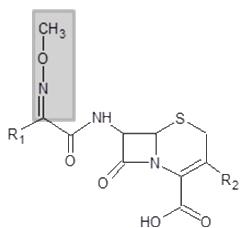


Figura 16: Estructura de las metoxi-iminocefalosporinas. El grupo metoximino se encuentra sombreado.

Se caracterizaron estos mutantes respecto a, entre otras cosas, su resistencia a las radiaciones ultravioletas, un inductor del sistema SOS. Los resultados de este experimento arrojan luz sobre la funcionalidad del sistema SOS.

Así, los mutantes LexA^{ind} y RecA⁻ no pueden inducir su sistema SOS y presentan una menor resistencia a las radiaciones ultravioletas al no poder reparar los daños en el material genético causados por la luz ultravioleta (**Figura 15**). En cambio, el mutante LexA⁻, al tener su sistema SOS constitutivamente inducido, presenta una resistencia similar a la cepa silvestre. Estos resultados sugieren un sistema SOS funcional en *Enterococcus faecalis* con una respuesta frente al daño en el material genético controlada por las proteínas RecA y LexA. Tras esto procedimos a caracterizar su perfil de antibiorresistencia. Esta caracterización forma parte de la presente tesis. Al analizar la resistencia a antibióticos de estos mutantes, vimos que mientras que las cepas silvestres eran resistentes a las cefalosporinas, los mutantes LexA⁻ eran susceptibles frente a algunas de las mismas que contenían un grupo metoxi-imino en su estructura química (**Figura 16**). Se procedió a caracterizar este fenómeno en ésta y otras especies bacterianas, tanto *in silico* como *in vitro*.

Efecto de la inducción del sistema SOS en el perfil de antibiorresistencia

A fin de estudiar la relación entre la resistencia a antibióticos y la respuesta SOS, se estudió el perfil de antibiorresistencia en bacterias con la respuesta SOS fisiológica, en bacterias con el sistema SOS inducido (las cepas LexA⁻, que son mutantes de inserción para *lexA*, y las cepas silvestres en presencia de inductores de la respuesta SOS) y en bacterias con el sistema SOS reprimido (las cepas

LexA^{ind}, con el alelo de *lexA* que no se puede lisar y las cepas RecA⁻, mutantes de inserción en *recA*). El estudio de las cepas silvestres y de los mutantes descritos genes se realizó en presencia y en ausencia de compuestos que provocan daño en el ADN y que por tanto producen una inducción del regulón SOS. En los mutantes LexA^{-comp} el plásmido que interrumpía el gen *lexA* se ha perdido y por tanto presentan el alelo silvestre de *lexA*. Se realizaron ensayos de difusión por disco con diferentes antibióticos y ensayos cuantitativos mediante E-test para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) a algunas metoxi-imino cefalosporinas. La resistencia a cefotaxima y a ceftriaxona, metoxi-iminocefalosporinas, disminuye del orden de 100 veces cuando los genes del regulón SOS se están expresando, ya sea en los mutantes LexA⁻ como en presencia de mitomicina C, agente alquilante del ADN que induce la respuesta SOS. La concentración de mitomicina C utilizada se corresponde con la mitad de la CMI de este compuesto.

		Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)								
		V583					JH2-2			
Antibiótico	Medio	V583 WT	LexA ⁻	LexA ^{ind}	LexA ^{-comp}	JH2-2	LexA ⁻	LexA ^{ind}	LexA ^{-comp}	RecA ⁻
Cefotaxima	BHI	512	0,047	512	512	512	0,032	512	512	512
	BHI+Mitomicina	0,38	0,125	-	1	0,19	0,032	-	0,094	-
Ceftriaxona	BHI	1024	1	1024	1024	512	0,75	512	1024	≥256
	BHI+Mitomicina	1,5	1	-	1,5	1,5	0,5	-	3	-

Tabla 1: CMI determinada para las cepas de *E. faecalis* V583 y JH2-2 y los diferentes mutantes construidos en ellas mediante E-test a cefotaxima y a ceftriaxona. Las CMIs a cefotaxima y ceftriaxona están en µg/ml. Los medios utilizados han sido BHI y BHI con mitomicina C, un inductor del sistema SOS, para V583 a una concentración de 0,05 µg/ml y para JH2-2 a 0,02 µg/ml.

En el caso de las cepas LexA^{comp}, las bacterias recuperan el fenotipo de resistencia a cefalosporinas observado en las cepas silvestres. Los mutantes RecA⁻ no crecen en medio con mitomicina C, ya que estos mutantes no pueden expresar las proteínas implicadas en la reparación del daño en el ADN y la mitomicina C provoca roturas en el material genético. Para determinar la concentración de mitomicina C que revertía la resistencia a cefalosporinas mediante la inducción del sistema SOS se realizó el test de difusión por disco con diversas cefalosporinas en placas de BHI con diferentes concentraciones de mitomicina C. La concentración de la misma que reproducía mejor el fenotipo de los mutantes LexA⁻ respecto al perfil de antibiorresistencia fue de 0,05 µg/ml para V583 WT y de 0,02 µg/ml para JH2-2 (**Tabla 1 y Figura 17**).

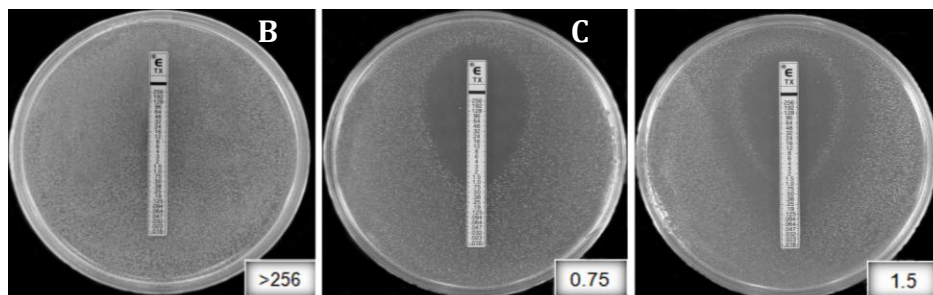


Figura 17: Efecto de la inducción del sistema SOS en la concentración mínima inhibitoria de ceftriaxona en el entorno genético de JH2-2 determinada mediante E-test. Los resultados están indicados en µg/ml. A: JH2-2 en BHI. B: JH2-2 LexA⁻ en BHI. C: JH2-2 en BHI con 0,02 µg/ml de mitomicina c en el medio.

Diferentes moléculas inductoras del SOS pueden afectar a la resistencia intrínseca a cefalosporinas

Compuestos	V583 WT		JH2-2 WT		Calidad de la inducción
	Concentración de Inducción	CMI	Concentración de Inducción	CMI	
Quinolonas					
Levofloxacin	0,3*	1	0,5*	2	+++
Ciprofloxacina	0,3*	> 0,5	0,5-1*	2	+++
Ác. Nalidíxico	-	> 200	No	> 200	-
Flumequina	20	50	50	> 200	+
Norfloxacin	-	< 2	4*	8	-/+
Enrofloxacin	-	< 0,3	0,3*	0,5	-/+
Moxifloxacin	0,05*	0,1	0,05*	0,5	+++
Cumarinas					
Novobiocina	2**	5	2**	10	-
B-lactámicos					
Ampicilina	0,5**	1	0,1	> 0,5	++
Otros					
Mitomicina C	0,05	0,1	0,02	0,1	+++++
Trimetoprim	0,05**	0,1	0,03**	0,1	+

Tabla 2: Concentración y calidad de la reversión de la resistencia inducida por diferentes compuestos. La concentración de inducción es la concentración mínima en µg/ml a la que se produce una reversión de la resistencia a ceftriaxona (CRO30) y a cefotaxima (CTX30) evaluada por el método de difusión por discos. Los discos de antibiótico con los que se ha llevado a cabo el ensayo llevan 30 µg de antimicrobiano. *, presencia de mutantes dentro del halo; -, no hay diferencias en la susceptibilidad en presencia del compuesto correspondiente.

Tras ensayar concentraciones de diferentes compuestos para ver su papel y su eficiencia como inductores del SOS y agentes sensibilizantes a las cefalosporinas en *E. faecalis*, la mitomicina C ha resultado ser el compuesto más efectivo. La mitomicina C provoca la aparición de halos de sensibilidad más limpios y definidos en la técnica de antibiograma a las metoxi-iminocefalosporinas mencionadas. Dentro de las quinolonas, las hay que producen inducción de la

sensibilidad, como la levofloxacin, la ciprofloxacina y la moxifloxacina, mientras que otras, como el ácido nalidíxico o la norfloxacina, no producen ningún efecto en las condiciones en las que han sido ensayadas. La ampicilina da lugar una inducción poco intensa (**Tabla 2**).

El fenómeno de inducción a la sensibilidad ocurre en *E. faecalis*, *E. faecium* y en *Listeria ivanovii*

Para ver hasta que punto la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas tenía lugar, se caracterizó el perfil de antibiorresistencia mediante la



Figura 18: Efecto de la inducción del sistema SOS en la CMI de ciertas cefalosporinas en *L. ivanovii*. Los resultados están en µg/ml. A: CMI de cefotaxima en BHI a la izquierda y en BHI con 0,02 µg/ml de mitomicina C a la derecha. B: CMI de ceftriaxona en BHI a la izquierda y en BHI con 0,02 µg/ml de mitomicina C a la derecha.

técnica de difusión en disco para 20 cepas y en presencia y en ausencia de mitomicina C y se observó la reversión de la resistencia en las cepas de *E. faecalis* V583 y JH2-2 y en la especie *L. ivanovii* (**Tabla 3** y **Figura 18**). Se observó una reversión de la resistencia para la cefuroxima, cefalosporina de segunda generación, y para cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima y ceftizoxima, cefalosporinas de tercera generación. Todas estas cefalosporinas se engloban dentro del subgrupo de las metoxi-iminocefalosporinas. La CMI de cefotaxima para *L. ivanovii* pasa de ser mayor de 256 µg/ml a ser 0,064 µg/ml en presencia de 0,02 µg/ml de mitomicina C. En el caso de la ceftriaxona también se reduce considerablemente la CMI en presencia de mitomicina C, reduciéndose de 256 µg/ml a 0,38 µg/ml (**Figura 18**).

Se estudió igualmente el perfil de antibiorresistencia en la bacteria *E. faecium* mediante las técnicas de test de difusión por disco y de E-test en presencia y en ausencia de 0,05 µg/ml de mitomicina C en el medio para ver si había diferencias cuando el sistema SOS está inducido. En *E. faecium* la resistencia a las metoxi-iminocefalosporinas se ve reducida en presencia de mitomicina C y este efecto se puede observar también en otras cefalosporinas (**Tabla 4**). La CMI de *E. faecium* a cefuroxima pasa de mayor de mayor de 128 µg/ml a un valor de 0,25 µg/ml en presencia de 0,05 µg/ml de mitomicina C (**Figura 19**).

Cepema Cefalosporinas		V583 WT		JH2-2		<i>L. ivanovii</i>	
Generación	Nombre	BHI	BHI Mito 0,05µg/ml	BHI	BHI Mito 0,02µg/ml	BHI	BHI Mito 0,02µg/ml
1	Cefalexina (CN30)	6	9	6	13	8	10
1	Cefalotina (CF30)	12	17	15	17	22	28
1	Cefazolina (CZ30)	12	17	16	26	40	>50
1	Cefadroxilo (CFR30)	11	12	9	15	20	24
1	Cefradina (CE30)	11	11	12	15	17	18
2	Cefuroxima (CXM30)	6	26	6	34	6	28
2	Cefamandol (MA30)	11	12	20	20	35	37
2	Cefprozil (CPR30)	20	28	25	28	33	38
2	Cefaclor (CEC30)	6	6	14	15	28	26
3	Cefoperazona (CFP30)	15	20	14	20	16	20
3	Cefotaxima (CTX30)	6	26	6	32	6	32
3	Ceftazidima (CAZ30)	6	6	6	15	6	6
3	Ceftriaxona (CRO30)	6	21	6	27	9	29
3	Cefpodoxima (CPD10)	6	23	6	25	6	25
3	Cefsulodina (CFS30)	6	6	6	6	6	16
3	Ceftizoxima (ZOX30)	6	30	6	35	6	42
4	Cefepima (FEP30)	9	15	6	16	6	11
4	Cefpiroma (CPO30)	18	25	19	23	14	32
Cefamicinas							
	Cefoxitina (FOX30)	6	6	6	6	9	11
	Cefotetán (CTT30)	6	6	6	6	6	6

Tabla 3: Efecto de la inducción del sistema SOS en el perfil de antibiorresistencia a cefalosporinas en *E. faecalis* V583 y JH2-2 y en *L. ivanovii*. El test de difusión por disco se realizó en BHI y en BHI con mitomicina C, a la concentración indicada en cada caso. La concentración de los discos de antibiótico utilizados y su nombre abreviado se indican entre paréntesis. Los resultados de los halos de inhibición se encuentran expresados en mm.

Cepema

Cefalosporinas		V583 WT		<i>E. faecium</i>	
Generación	Nombre	BHI + Mitomicina C		BHI + Mitomicina C	
		BHI	0,05 µg/ml	BHI	0,05 µg/ml
1	Cefalexina (CN30)	6	6	<u>6</u>	<u>15</u>
1	Cefalotina (CF30)	14	16	13	23
1	Cefazolina (CZ30)	13	17	<u>13</u>	<u>27</u>
1	Cefadroxilo (CFR30)	9	12	10	18
1	Cefradina (CE30)	11	11	12	15
2	Cefuroxima (CXM30)	6	28	6	29
2	Cefamandol (MA30)	13	14	<u>13</u>	<u>29</u>
2	Cefprozil (CPR30)	20	24	20	27
2	Cefaclor (CEC30)	14	14	<u>19</u>	<u>26</u>
3	Cefixime (CFM5)	6	19	6	16
3	Cefotaxima (CTX30)	6	35	20	35
3	Ceftazidima (CAZ30)	6	19	6	13
3	Ceftriaxona (CRO30)	6	25	21	30
3	Cefpodoxima (CPD10)	6	24	6	30
3	Ceftizoxima (ZOX30)	6	29	6	23
4	Cefepima (FEP30)	15	19	15	22
4	Cefpiroma (CPO30)	20	27	<u>20</u>	<u>32</u>
Cefamicinas					
	Cefoxitina (FOX30)	6	6	14	18
	Cefotetán (CTT30)	6	6	6	6

Tabla 4: Efecto de la inducción del sistema SOS en los antibiogramas realizados frente a algunas cefalosporinas en *E. faecalis* V583 y en *E. faecium*. El test de difusión por disco se realizó en BHI y en BHI con mitomicina C, un inductor del sistema SOS, a la concentración indicada en cada caso. La concentración de los discos de antibiótico utilizados y su nombre abreviado se indican entre paréntesis. Los resultados de los halos de inhibición se encuentran expresados en mm. En rojo se encuentran indicados los resultados de las cefalosporinas cuya sensibilidad se induce sin ser metoxi-iminocefalosporinas. Se encuentran subrayados los resultados de *E. faecium* en los que se observa una inducción de la sensibilidad en esta especie y no en *E. faecalis* V583.



Figura 19: Efecto de la inducción del sistema SOS en la CMI de cefuroxima en la especie *E. faecium* determinada mediante E-test. La concentración mínima inhibitoria está indicada en $\mu\text{g/ml}$. A la izquierda, CMI determinada en BHI. A la derecha, CMI determinada en BHI con $0,05 \mu\text{g/ml}$ de mitomicina C, un inductor del sistema SOS.

Estudio de la resistencia a cefalosporinas en aislados clínicos

Para ver si el fenómeno de la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas ocurría en cepas clínicas, se estudió la resistencia a cefalosporinas mediante la técnica de difusión por disco en dos aislados clínicos de *E. faecium* de origen indio en presencia y en ausencia de mitomicina C. Al estudiar su sensibilidad a otros antibióticos mediante la misma técnica, se observó que la cepa CM54 es resistente a antibióticos de diversas familias. En estas dos cepas no se observó una inducción de la susceptibilidad a las metoxi-iminocefalosporinas con las concentraciones de mitomicina C ensayadas, que se detallan en la tabla 5 (Tabla 5).

Cepa	Ceftriaxona (CTX30)				Cefaclor (CEC30)				Cefuroxima (CXM30)				Ceftizoxima (ZOX30)				Cefotetan (CTT30)											
	BHI	M	0,02	M	0,04	M	0,06	BHI	M	0,02	M	0,04	M	0,06	BHI	M	0,02	M	0,04	M	0,06	BHI	M	0,02	M	0,04	M	0,06
CM 54	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
CM 80	6	6	6	6	6	6	6	10	12	14	18	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Cepa	Ampicilina (AMP10)	Amoxicilina clavulánico (AMC30)	Amoxicilina (AMX25)	Imipenem (IPM10)	Ertapenem (ETP10)	Estreptomicina (S10)
	CM 54	6	8	8	6	6
CM 80	32	31	32	27	11	6

Tabla 5: Resistencia a antibióticos de dos cepas clínicas de *E. faecium* de la India. Los discos de antibiótico empleados se encuentran en la primera fila de la tabla y entre paréntesis está su nombre abreviado y la concentración de cada uno de ellos en µg. Arriba, test de difusión por discos a varias cefalosporinas en BHI y en BHI con mitomicina C (M), cuya concentración se indica en µg/ml. Los resultados del diámetro del halo de inhibición se indican en mm. Abajo, test de difusión por disco a diferentes antibióticos. Los diámetros de los halos de inhibición están expresados en mm y la concentración de mitomicina C en µg/ml.

Se realizó un estudio más amplio de la reversión de la resistencia a cefalosporinas en un grupo de 39 aislados clínicos de *E. faecalis* y 40 aislados clínicos de *E. faecium*. Se determinó en placa la sensibilidad orientativa de los aislados clínicos a cefotaxima y a mitomicina C para diseñar el experimento. Para estudiar la reversión de la resistencia a cefalosporinas, se realizaron placas cuadradas a una concentración de cefotaxima determinada y con un gradiente de concentración del inductor, mitomicina C. Se sembraron los aislados clínicos a lo largo del gradiente de mitomicina C de la placa formando una línea mediante un hisopo empapado en la suspensión de la bacteria a testar. En paralelo se sembraron de igual manera placas sin cefotaxima para comprobar que la bacteria era capaz de crecer en presencia de las diferentes concentraciones de mitomicina C. Se consideró reversión de la resistencia cuando las cepas crecían a lo largo de toda la línea sembrada en las placas de control que solo tenían mitomicina C mientras que

la línea se interrumpía en las placas con mitomicina C y cefotaxima. A las concentraciones de mitomicina C y cefotaxima probadas, el 76,9% los aislados de *E. faecalis* y el 30% de los aislados de *E. faecium* mostraron cierta reversión de la resistencia. Todos los aislados cuya resistencia se revirtió presentaban una CMI igual o mayor de ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$. Si tenemos en cuenta únicamente las cepas con una CMI de cefotaxima igual o mayor a 128 $\mu\text{g/ml}$, el porcentaje de inducción aumenta al 41,67% en *E. faecium*. En *E. faecium* el 37,5% se mantuvieron resistentes mientras que el 32,5% eran sensibles en las condiciones ensayadas. En *E. faecalis* el 23,1% de los aislados eran sensibles a la concentración de cefotaxima utilizada. Todos los aislados de *E. faecalis* que no eran de base sensibles a cefalosporinas revertieron su resistencia en presencia de mitomicina C (**Tabla 6**).

La inducción del sistema SOS permite el tratamiento con cefalosporinas *in vivo*

La resistencia intrínseca a cefalosporinas impide su uso clínico en infecciones causadas por enterococos. Debido a la resistencia a múltiples antibióticos que ha menudo se observa en *E. faecalis*, el poder incluir la familia de las cefalosporinas en los antibióticos disponibles para su tratamiento incrementaría las alternativas terapéuticas disponibles actualmente en las infecciones enterocócicas. Se estudió si la inducción de la respuesta SOS permitía el tratamiento *in vivo* con cefalosporinas de una infección causada por enterococos.

E. faecium

Cepa	Fenotipo	Cepa	Fenotipo	Cepa	Fenotipo	Cepa	Fenotipo
M1	+	M11	S	M21	S	M31	+
M2	R	M12	+	M22	+	M32	S
M3	+	M13	S	M23	R	M33	+
M4	+	M14	S	M24	S	M34	R
M5	S	M15	S	M25	S	M35	R
M6	+	M16	S	M26	S	M36	R
M7	+	M17	R	M27	R	M37	R
M8	R	M18	+	M28	R	M38	+
M9	R	M19	S	M29	R	M39	R
M10	R	M20	+	M30	S	M40	R

E. faecalis

Cepa	Fenotipo	Cepa	Fenotipo	Cepa	Fenotipo	Cepa	Fenotipo
S1	+	S11	+	S21	S	S31	+
S2	+	S12	S	S22	+	S33	+
S3	+	S13	+	S23	S	S34	S
S4	+	S14	+	S24	G+	S35	S
S5	+	S15	S	S25	G+	S36	+
S6	+	S16	S	S26	G+	S37	+
S7	S	S17	S	S27	+	S38	S
S8	S	S18	+	S28	+	S39	+
S9	+	S19	S	S29	+	S40	+
S10	+	S20	+	S30	+		

Tabla 6: Fenotipo de inducción de cepas clínicas de *E. faecium* y *E. faecalis* en presencia de mitomicina C. Es estudio se realizó en placas con cefotaxima y un gradiente de mitomicina C. Se indica el nombre de cada cepa y el fenotipo de reversión a la resistencia a cefalosporinas observado. +, cepa resistente en la que se observa una inducción de la sensibilidad a cefotaxima; R, cepa resistente que mantiene la resistencia a cefotaxima en presencia de mitomicina C; S, cepa sensible a la concentración de cefotaxima probada; G, inducción de la sensibilidad a cefalosporinas pero se observa la presencia de colonias grandes.

Para ello se comparó la carga bacteriana presente en los riñones en diferentes grupos de animales. Se inocularon grupos de ratones con la bacteria JH2-2 silvestre y con la cepa JH2-2 LexA⁻, que presenta el sistema SOS

constitutivamente inducido. En los ratones inoculados con la cepa JH2-2 WT, se impusieron diferentes tratamientos que se administraban cada 8 horas. En un grupo se administró solución salina (grupo control), en otro grupo ceftriaxona, en otro levofloxacin y en otro una combinación de levofloxacin con ceftriaxona. A los ratones a los que se les inoculó con la cepa JH2-2 LexA⁻, a unos se les administró solución salina como tratamiento y a otros ceftriaxona cada 8 horas. En los experimentos *in vivo*, se decidió utilizar ceftriaxona debido a que este compuesto presenta una vida media más prolongada (7-8h) que otras aminotiazolidinonas como las aminopenicilinas al tener un radical de mayor tamaño y de carácter ácido en R2 (un anillo heterocíclico) (Neu, 1983, 1986; Neu *et al.*, 1985). Aumentamos la dosis más frecuente en humanos de 20mg/kg a 200mg/kg. La levofloxacin tiene una vida media de 6-8 horas (Fish y Chow, 1997).

En nuestro modelo murino la carga bacteriana en los riñones disminuye a los 7 días de la inoculación cuando la cepa presenta el sistema SOS inducido y es tratada con ceftriaxona. El resultado es más significativo en la bacteria JH2-2 LexA⁻. La carga bacteriana del grupo de ratones inoculados con la cepa JH2-2 LexA⁻ y tratado con ceftriaxona presentó una diferencia significativa respecto a la carga bacteriana de los demás grupos con una $p \leq 0,001$. El grupo inoculado con la cepa JH2-2 tratado con levofloxacin y ceftriaxona mostró una diferencia

significativa con el grupo JH2-2 tratado con solución salina con una $p \leq 0,05$ aplicando el test de Mood de medianas de dos colas con un $\alpha=0,05$ (Figura 20).

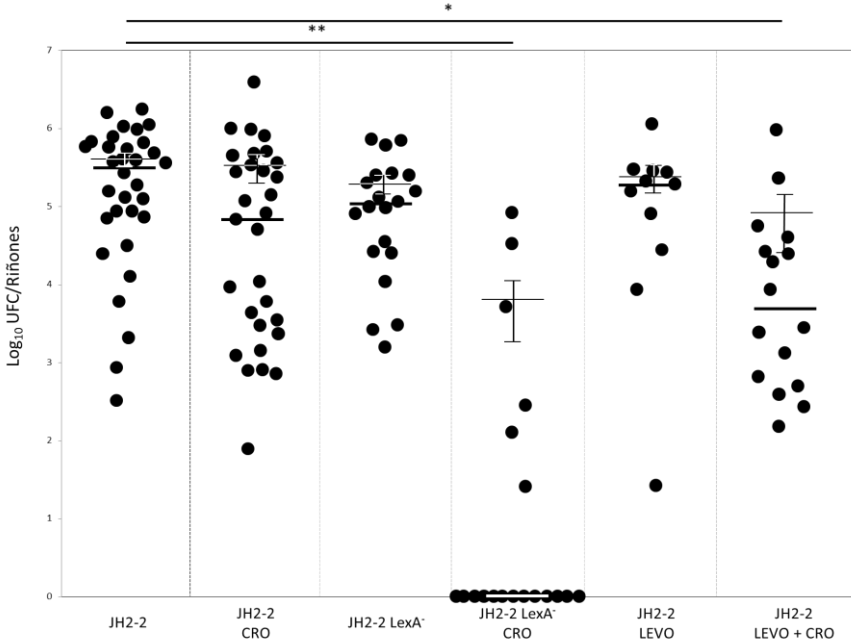


Figura 20: Log₁₀ de las UFC presentes en cada par de riñones. La línea fina indica la media con la desviación típica correspondiente y la línea gruesa indica la mediana. Se indican las cepas con las que se inoculó cada grupo y el tratamiento administrado. Cada punto se corresponde con la carga bacteriana presente en cada par de riñones correspondiente a un individuo. Las comparaciones de interés fueron las de la cepa JH2-2 con el tratamiento de solución salina con JH2-2 LexA⁻ con el tratamiento de ceftriaxona (**, $p \leq 0,001$) y la de la cepa JH2-2 con el tratamiento de solución salina con la cepa JH2-2 WT con el tratamiento de levofloxacina y ceftriaxona simultáneamente (*, $p \leq 0,05$) aplicando el test de Mood de medianas de dos colas con un nivel de alfa de $\alpha=0,05$. CRO, grupo tratado con ceftriaxona 200 mg/kg/8h; LEVO, grupo tratado con levofloxacina 30mg/kg/8h; a los grupos en los que no se especifica tratamiento se les administró solución salina cada 8 horas.

Capítulo segundo: Estudio del regulón SOS y de los determinantes de resistencia a cefalosporinas

Tras caracterizar el perfil de antibiorresistencia que mostraba la bacteria *E. faecalis* cuando el sistema SOS está activado, se realizaron una serie de ensayos para averiguar la base genética subyacente al fenómeno de la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas.

Caracterización del regulón SOS en *E. faecalis*

La inducción del sistema SOS da lugar a una reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas. La respuesta SOS en esta bacteria no ha sido caracterizada. A fin de diseccionar el regulón SOS en *E. faecalis*, se estudió la expresión genética de esta bacteria con un *microarray*. Se estudiaron las diferencias en el patrón de transcripción de la cepa silvestre respecto al mutante LexA⁻ en la cepa de *E. faecalis* V583 para identificar, además de los genes que integran el regulón SOS, los posibles genes implicados en la reversión de la resistencia.

Se estudió la expresión génica de: i) V583 WT; ii) V583 WT en presencia de mitomicina C; iii) V583 LexA⁻; iv) V583 LexA⁻ en presencia de mitomicina C; V583 LexA^{ind}; vi) V583 LexA^{ind} en presencia de mitomicina C. De todas las

comparaciones realizadas, las únicas cepas que mostraron una diferencia significativa entre ellas en su expresión génica fueron la cepa silvestre (V583 WT) y el mutante LexA⁻ (V583 LexA⁻). Al comparar la expresión de sus genes, 969 de ellos habían aumentado o disminuido su expresión con una $p < 0,05$. Estos resultados se muestran en la **Tabla 16**.

El regulón SOS se determinó mediante la búsqueda de cajas LexA en la región promotora de los genes cuya expresión es diferente entre las cepas silvestre y el mutante LexA⁻. Como secuencia consenso se utilizó la descrita para Firmicutes.

Una vez identificados los genes que presentaban una diferencia de expresión significativa entre las cepas V583 WT y V583 LexA⁻ y que presentaban la caja LexA descrita para Firmicutes, se utilizaron estas secuencias de las cajas LexA para definir la secuencia consenso propia de *E. faecalis* (**Figura 21**).

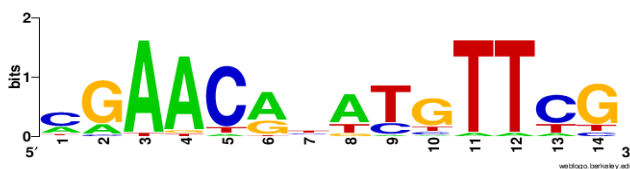


Figura 21: Logo de la caja de unión LexA identificada para *Enterococcus faecalis* V583.

En este trabajo hemos encontrado 46 genes que se encuentran directamente regulados por el sistema RecA-LexA, ya que en su región promotora presentan una

caja LexA o forman parte de un operón que la tiene. Alinear las secuencias de las cajas LexA⁻ identificadas nos ha permitido identificar la caja LexA⁻ consenso para esta especie.

En el regulón SOS identificado hay 32 genes cuya expresión está aumentada (**Tabla 7**) y 14 genes cuya expresión está reprimida (**Tabla 8**).

Entre los genes cuya expresión está aumentada en la cepa V583LexA⁻ se encuentran los reguladores principales del sistema SOS, *recA* y *lexA*, y genes que codifican proteínas implicadas en la reparación del ADN, como exonucleasas y genes homólogos a los de las polimerasas de síntesis a través de lesión. Asimismo, se encuentran sobreexpresados algunos de los genes de un transportador tipo ABC de transporte de aminoácidos. Las integrasas de los fagos 3 y 5 están sobreexpresadas. La tendencia en la expresión en la cepa V583 LexA⁻ de los genes de los profagos que se encuentran integrados en el cromosoma se resume en la **Tabla 9**.

Gen	Nombre Proteína	Diferencia de expresión	Valor P	Caja LexA
EF0064	Proteína hipotética	1,12	*	Operón con EF0065
EF0065	Luciferasa	1,2	4,791x10 ⁻⁷	CGTACATATGTCC
EF0066	<i>ruvA</i> ADN helicasa RuvA de la unión de Holliday	/,1,17**	*	GGAACATATGTACG
EF0067	<i>ruvB</i> ADN helicasa RuvB de la unión de Holliday	1,3	1,213x10 ⁻³	Operón con EF0066
EF0682	Exonucleasa de reparación del ADN	1,6	2,822x10 ⁻⁸	CGAACAAATTTTCG
EF0683	Proteína hipotética	1,6	1,849x10 ⁻⁷	Operón con EF0682
EF0684	Proteína de unión a la CMP	1,8	4,885x10 ⁻⁸	Operón con EF0682
EF0760	Proteína de unión al ATP de un transportador de AA tipo ABC	1,2	2,382x10 ⁻³	Operón con EF0761
EF0761	Permeasa o proteína de unión a AA de un transportados de AA tipo ABC	1,1	4,875x10 ⁻²	CGAACATATTTTCG
EF0762	<i>uvrB</i> Subunidad B de la excinucleasa ABC	2,0	6,742x10 ⁻¹²	CGAAATATGTTCG
EF0763	<i>uvrA</i> Subunidad A de la excinucleasa ABC	2	2,654x10 ⁻¹⁴	Operón con EF0762
EF1067	Proteína hipotética	3,3	1,204x10 ⁻¹⁵	CAAGCTTATCTCG
EF1080	Proteína de la familia Imp/MucB/SamB.Homología con la familia Y de polimerasas	7,4	1,232x10 ⁻²⁰	CGAACGTTGTTCG
EF1081	Proteína hipotética	6,8	5,081x10 ⁻¹⁷	Operón con EF1080
EF1112	<i>rexB</i> Exonucleasa RexB	1,3	4,815x10 ⁻⁶	CAAACATGTTTC
EF1113	<i>rexA</i> Exonucleasa RexA	1,5	1,092x10 ⁻⁶	Operón con EF1112
EF1162	Helicasa	1,6	1,747x10 ⁻⁵	TGAACGCATGATTG
EF1163	L- Asparaginasa	1,2	6,244x10 ⁻³	Operón con EF1162
EF1418	Proteína hipotética	3,8	2,542x10 ⁻¹³	AGAACATACGTTCT
EF1417	Recombinasa específica de sitio de la familia de las integrasas de fagos (fago 3)	4,3	6,546x10 ⁻¹⁵	Operón con EF1418
EF1579	<i>lexA</i> Represor LexA	1,3	4,063x10 ⁻⁴	CGAACGCTGTGTTG
EF1686	Proteína hipotética	9,7	2,368x10 ⁻¹⁶	CGAACACTCGTTCC
EF1907	Proteína de la familia MaoC	1,2	2,940x10 ⁻⁴	AAATCGCGTGTAG
EF1906	Proteína hipotética	1,2	4,585x10 ⁻³	Operón con EF1907
EF2084	Proteína hipotética	4,0	2,705x10 ⁻¹³	CGAACGAAAGTTCG
EF2145	Recombinasa específica de sitio de la familia de las integrasas de fagos (fago 5)	5,2	1,492x10 ⁻¹⁴	CGAACATATATTCG
EF2415	Proteína hipotética	2,7	3,921x10 ⁻¹⁶	Operón con EF2416
EF2416	<i>rpsU</i> Proteína ribosomal S21 de la 30S	2,3	3,208x10 ⁻¹⁵	AAAACAGTCGTTCC
EF2704	<i>mutY</i> Adenina glicosilasa específica de A/G (sistema GO)	1,4	9,181x10 ⁻⁵	Operón con EF2705
EF2705	<i>recX</i> Regulador de la recombinación RecX	1,2	2,757x10 ⁻²	AGAATATATGTCTC
EF2756	<i>dinP/dinB</i> Proteína inducida por daño en el ADN DinP. Homóloga a la polimerasa IV	2,1	1,000x10 ⁻⁷	AGAACGGACGTTCC
EF3171	<i>recA</i> Recombinasa A	4	1,318x10 ⁻²⁰	CGAATGTTGTTCG

Tabla 7: Genes cuya expresión se encuentra aumentada en V583LexA⁻ respecto a su expresión en la cepa V583 WT. Se indican el gen, el nombre del mismo, la función de la proteína que codifica, la diferencia de expresión respecto a la cepa silvestre, el valor P de esa diferencia de expresión y la caja LexA para cada gen u operón *, diferencia de expresión no significativa (p>0,05). **, su expresión está disminuida pero no es estadísticamente significativo y forma parte de un operón cuyo otro gen presenta una expresión aumentada.

Gen	Nombre	Proteína	Diferencia de expresión	Valor P	Caja LexA
EF1343		Permeasa de un transportador de azúcares tipo ABC	3,4	3,554x10 ⁻¹⁰	Operón con EF1345
EF1344		Permeasa de un transportador de azúcares tipo ABC	2,3	1,699x10 ⁻⁹	Operón con EF1345
EF1345		Proteína de unión a azúcares de un transportador de azúcares tipo ABC	1,7	8,376x10 ⁻¹⁰	CGAACACATTTTAG
EF1537		Integrasa/recombinasa XerD	1,2	1,655x10 ⁻²	TGAACAAGTCTTTT
EF1538	<i>scpA</i>	Proteína A de segregación y condensación	1,2	1,925x10 ⁻²	Operón con EF1537
EF1539		Proteína hipotética	***	*	Operón con EF1537
EF1561	<i>aroE</i>	Shikimato 5-deshidrogenasa	2	2,380x10 ⁻¹²	ACAACAACGTTTG
EF1562		Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa constitutiva	2,4	9,532x10 ⁻¹⁷	Operón con EF1561
EF1563	<i>aroB</i>	3-deshidroquinato sintasa	2,4	1,245x10 ⁻¹⁷	Operón con EF1561
EF1564	<i>aroC</i>	Corismato sintasa	3,5	4,967x10 ⁻¹⁸	Operón con EF1561
EF1565		Prefenato deshidrogenasa constitutiva	2,4	2,546x10 ⁻¹⁵	Operón con EF1561
EF1566	<i>aroA</i>	3-fosfoshikimato-1-carboxiviniltransferasa constitutiva	2,9	4,636x10 ⁻¹⁸	Operón con EF1561
EF1567	<i>aroK</i>	Shikimato quinasa	2,5	1,991x10 ⁻¹³	Operón con EF1561
EF1568		Corismato mutasa/ prefenato deshidratasa constitutiva	1,8	2,294x10 ⁻⁹	Operón con EF1561

Tabla 8: Genes cuya expresión se encuentra disminuida respecto a su expresión en la cepa V583 WT. Se indican el gen, el nombre del mismo, la función de la proteína que codifica, la diferencia de expresión respecto a la cepa silvestre, el valor P de esa diferencia de expresión y la caja LexA para cada gen u operón *** Valor para la diferencia de expresión no disponible. *, Diferencia de expresión no significativa (p>0,05).

Profago	Localización	Tendencia de su expresión en V583 LexA ⁺	Caja LexA
1	EF0303-EF0355	Integrasa sin cambios. Tendencia de los genes a una expresión disminuida	AGAACGTAAGTCC
2	EF1276-EF1293	Sin cambios. Disminuida la expresión de EF1279 (proteína de organización del replisoma) y EF1280 (proteína hipotética)	-
3	EF1417-EF1489	Integrasa sobreexpresada. Sobreexpresión generalizada. Disminuida en EF1420, EF1421, EF1422, EF1427 y EF1428	AGAACATACGTCT
4	EF1988-EF2043	Sin cambios. Sobreexpresión de EF2036	-
5	EF2084-EF2145	Integrasa sobreexpresada. Resto sin cambios o expresión disminuida. Sobreexpresión de EF2151, EF2154 y EF2157	CGAACATATATTCG
6	EF2798-EF2855	Ligera sobreexpresión	-
7	EF2936-EF2955	Expresión sin cambios o ligeramente disminuida	-

Tabla 9: Tendencia de la expresión de los genes comprendidos en los profagos que se encuentran integrados en el cromosoma en la cepa V583 LexA⁺ respecto a V583 WT. Se indica si la mayoría de los genes de cada profago presentan su expresión aumentada o disminuida respecto a la cepa silvestre y se especifican los genes cuya expresión no sigue la tendencia general. Se detallan el profago, los genes que comprende, la tendencia en la expresión de los mismos y la secuencia de la caja LexA en caso de que presenten una. Se toma como referencia el genoma de V583.

Entre los genes del operón cuya expresión está disminuida, encontramos algunas de las subunidades de un transportador de azúcares tipo ABC y genes de la ruta metabólica del ácido shikímico, precursor, entre otros compuestos, de los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano). Los genes que codifican para las proteínas relacionadas con la segregación del cromosoma XerD y la proteína A también presentan una expresión disminuida en el mutante LexA⁻.

Destaca la alta proporción de genes (10/46) que codifican para proteínas hipotéticas que forman parte del operón, 9 de ellos sobreexpresados y 1 con una expresión disminuida.

Estudio de la implicación de los profagos en la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas

Para estudiar la implicación de los profagos que forman parte del genoma de *E. faecalis* V583 en la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas, se ensayó la resistencia a cefalosporinas de un mutante de *E. faecalis* V583 al que se le han delecionado todos los fagos. Se utilizó el método de difusión por disco en presencia y en ausencia de mitomicina C. La cepa a la que se le han delecionado los fagos presenta el mismo fenotipo que la cepa silvestre respecto a su resistencia a cefalosporinas tanto en presencia como en ausencia de mitomicina C.

Implicación de los genes *aro* y del operón EF1080 – EF1081 en la resistencia a cefalosporinas

Tanto los genes *aro* como el gen EF1080, que codifica para una polimerasa de translesión, presentan una expresión alterada en la cepa V583 LexA⁻ respecto a la cepa V583 WT. Para estudiar su implicación en el fenómeno de la reversión de la resistencia intrínseca, se contruyeron mutantes de inserción tanto para el operón que comprende los genes *aro* como para el gen EF1080, que codifica una proteína que participa en la síntesis por translesión. Las enzimas codificadas por los genes *aro* presentan cierto paralelismo con la proteína MurAA, implicada en la resistencia intrínseca a cefalosporinas, en cuanto a función (carboxiviniltransferasa) y a sustrato (fosfoenolpiruvato) se refiere. Se propusieron estos genes como candidatos en la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas al poder interferir con la función de la proteína MurAA. La fosfomicina es un homólogo del fosfoenolpiruvato, el sustrato inicial de la ruta del ácido shikímico (ruta llevada a cabo por las proteínas codificadas por los genes *aro*) y de MurAA. La fosfomicina se une e inhibe MurA (Kahan *et al.*, 1974). Se realizaron antibiogramas con fosfomicina en el medio para ver si el perfil de antibiorresistencia es similar al que presenta la cepa V583 LexA⁻, lo que podría indicar que la reversión de la resistencia mediada por el sistema SOS está relacionada con MurAA y con los genes *aro* (**Tabla 10**).

Cepema Cefalosporinas		V583 WT		JH2-2	
Generación	Nombre	BHI	BHI FOS 10µg/ml	BHI	BHI FOS 10µg/ml
1	Cefalexina (CN30)	6	10	6	9
1	Cefalotina (CF30)	10	13	11	13
1	Cefazolina (CZ30)	10	15	14	13
1	Cefadroxilo (CFR30)	8	13	13	10
1	Cefradina (CE30)	6	<12	10	11
2	Cefuroxima (CXM30)	6	21	6	15
2	Cefamandol (MA30)	9	11	10	11
2	Cefprozil (CPR30)	17	18	17	19
2	Cefaclor (CEC30)	12	14	14	15
3	Cefoperazona (CFP30)	17	17	12	14
3	Cefotaxima (CTX30)	6	27	6	23
3	Ceftazidima (CAZ30)	6	22	6	14
3	Ceftriaxona (CRO30)	6	20	6	15
3	Cefpodoxima (CPD10)	6	23	6	19
3	Cefsulodina (CFS30)	6	6	6	6
3	Ceftizoxima (ZOX30)	6	25	6	20
4	Cefepima (FEP30)	6	<18 (colonias)	6	13
4	Cefpiroma (CPO30)	11	25	16	19
Cefamicinas					
	Cefoxitina (FOX30)	6	6	6	6
	Cefotetan (CTT30)	6	6	6	6

Tabla 10: Resultados de los antibiogramas realizados con V583 WT y JH2-2 en BHI y en BHI con 10 µg/ml de fosfomicina. La técnica utilizada es el test de difusión por disco, y se indican los discos de antibiótico utilizados, su nombre abreviado y la cantidad de antibiótico de los mismos en µg. Las metoxi-iminocefalosporinas están en negrita. Los diámetros de los halos de inhibición están expresados en mm. FOS, fosfomicina. <, halo con algunas colonias dentro.

Cuando MurAA, MurAB o ambos están bloqueados *E. faecalis* presenta un perfil de antibiorresistencia que es muy similar al del mutante LexA⁻, aunque también presenta inducción frente a ceftazidima.

Se procedió a la construcción de mutantes de inserción en los genes EF1561, el primero del operón, y en el gen EF1562, que codifica la primera enzima de la vía del ácido shikímico. Estos mutantes no vieron alterada su susceptibilidad a cefalosporinas de una manera diferente a la cepa silvestre para esos genes. Se construyó un mutante de inserción para el gen EF1080 ya que su expresión es 7 veces mayor en V583 LexA⁻. Este gen presenta dominios conservados en común con polimerasas de translesión. El mutante de inserción para EF1080 presenta el mismo fenotipo que la cepa silvestre en su resistencia a cefalosporinas.

La estimación de la expresión mediante PCR cuantitativa de los genes *murAA*, *ireK*, *ireP*, *croR*, *croS* y *pbp4*

Para validar los resultados obtenidos con el microarray y estudiar la implicación de los factores descritos hasta el momento como importantes en la resistencia intrínseca a cefalosporinas, se estimó la expresión mediante PCR cuantitativa de los genes *murAA*, *ireK*, *ireP*, *croR*, *croS* y *pbp4* en las cepas de *E. faecalis* V583 y JH2-2. Se utilizaron las cepas silvestres crecidas en BHI, crecidas en presencia de mitomicina C, crecidas en presencia de levofloxacina y por último

sus mutantes para LexA correspondientes. No parece haber grandes diferencias de expresión entre las cepas silvestres, los mutantes LexA⁻ y las cepas silvestres en presencia de inductores de la respuesta SOS. Las cepas de *E. faecalis* V583 y JH2-2 presentan patrones de expresión algo distintos. Los niveles de expresión de detallan en la **Figura 22**.

Determinantes genéticos identificados mediante una librería por transposición

Se contruyó una librería por transposición a fin de identificar genes implicados en la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas. Para ello, tras realizar el protocolo establecido para crear la librería por transposición en la cepa de *E. faecalis* JH2-2, se seleccionaron los mutantes que, en presencia de mitomicina C, mantenían su resistencia frente a las metoxi-iminocefalosporinas. Se procedió a identificar esos genes presuntamente implicados en la reversión de la resistencia, ya que su disrupción impedía dicha reversión. Se identificaron 6 unidades transcripcionales que parecen relevantes en la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas en *E. faecalis* JH2-2.

Excepto el gen EF1938, el resto forman parte de operones, por lo que la transcripción de los genes que se encuentren corriente abajo también se va a ver afectada. El gen en el que se encuentra el transposón, los operones de los que

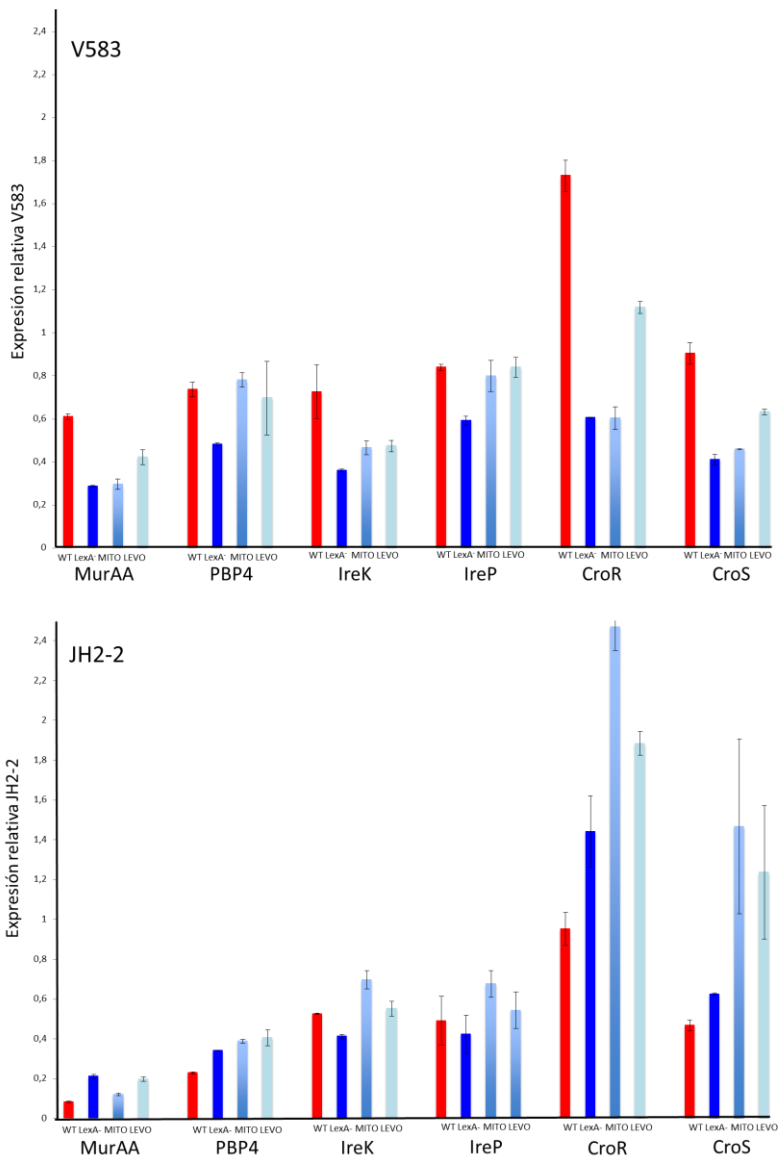


Figura 22: Expresión relativa de los genes que codifican las proteínas descritas hasta ahora como importantes en la resistencia intrínseca a cefalosporinas. En la gráfica superior de la cepa V583: WT, V583 WT (rojo); LexA⁻, V583 LexA⁻ (azul oscuro), MITO, V583 WT con 0,05 µg/ml de mitomicina C (azul); LEVO, V583 WT con 0,02 µg/ml de levofloxacina (azul celeste). En la gráfica inferior de la cepa JH2-2, con el mismo código de colores: WT, JH2-2; LexA⁻, JH2-2 LexA⁻, MITO, JH2-2 con 0,02 µg/ml de mitomicina C; LEVO, JH2-2 con 0,03 µg/ml de levofloxacina.

forman parte dichos genes y los genes del operón cuya transcripción puede verse afectada se detallan en la **Figura 23**.

De ellos, dos forman parte del mismo operón. Dos mutantes por transposición se corresponden con el gen EF1118 y 3 con el EF0297 (**Tabla 11**).

El gen EF1118 forma parte de un operón cuya expresión está regulada directamente por el sistema de dos componentes CroR/S.

Gen	Inserción (nt)	Exp.	Función	Caja	
				SOS	Cop
EF1938	1.879.811	1	Bomba ATP-asa de transporte de cationes	No	No
EF3106*	2.981.216	1	Transportador ABC de péptidos, proteína de unión a péptidos	No	No
EF1118	1.092.852	1	Transportador ABC de aminoácidos, permeasa	No	No
	1.092.430	1	Transportador ABC de aminoácidos, permeasa	No	No
	283.021	1	Represor transcripcional CopY	No	Sí
EF0297	283.030	1	Represor transcripcional CopY	No	Sí
	282.966	2	Represor transcripcional CopY	No	Sí
EF3107*	2.982.501	2	Transportador ABC de péptidos, permeasa	No	No
EF0760	716.385	2	Transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión a ATP	Sí	No
EF2413	2.334.253	3	Proteína con dominio HD	No	No

Tabla 11: Genes en los que se ha integrado el transposón en la cepa JH2-2. El número de nucleótido hace referencia al genoma de V583. El transposón se ha insertado en dos posiciones diferentes en el gen EF1118 (línea continua) y en tres en el gen EF0297 (línea discontinua). Según el estudio de la transcriptómica que realizamos, el gen EF0760 presenta una sobreexpresión de 1,2 en la cepa V583 LexA⁻ respecto a la cepa V683 WT. Exp, número de experimento; nt, número de nucleótido; *, genes pertenecientes al mismo operón.

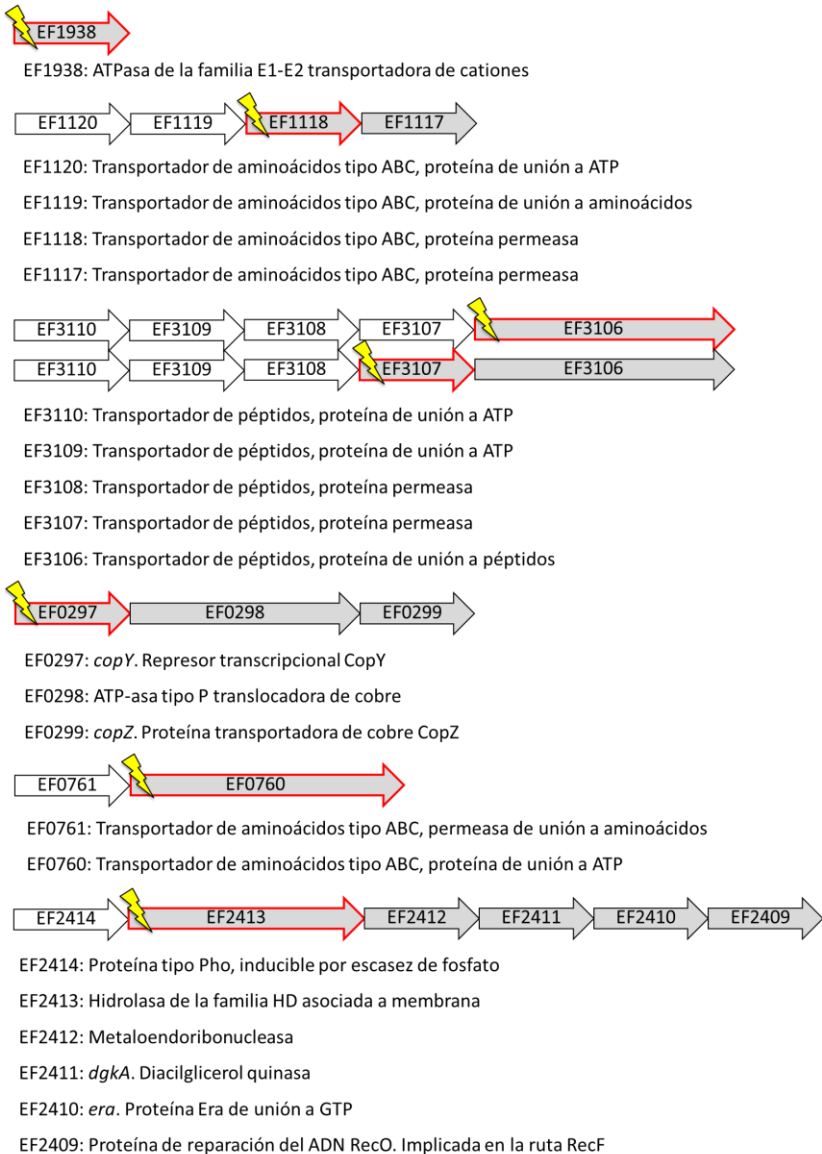


Figura 23: Genes en los que se ha insertado el transposón y las unidades transcripcionales de las que forman parte. Los genes están indicados con flechas, estando en rojo aquellos en los que se ha insertado el transposón y con fondo gris aquellos genes cuya expresión se puede ver afectada al estar corriente abajo del gen en el que está el transposon. Bajo cada unidad transcripcional representada mediante flechas, se detalla el número de cada gen tomando como referencia la cepa V583 (Janky and van Helden, 2008) y la función de la proteína codificada por cada uno de ellos.

Efecto del cobre en la resistencia a cefalosporinas en *E. faecalis* y *E. faecium*

Tres de los mutantes por transposición son mutantes en el gen que codifica para el regulador transcripcional CopY. La hipótesis respecto a los mutantes en CopY es que la ausencia de este regulador transcripcional impide la reversión de la resistencia. La presencia de cobre en el medio por tanto provocaría la separación del represor de las cajas Cop, ya que en presencia de cobre el operón Cop se

JH2-2	ZOX30	CPD10	CTX30	CXM30	CAZ30	CEC30
N	6	6	6	6	6	9
CuSO ₄ 1,4 mM	20	19	23	26	15	11

Tabla 12: La presencia de cobre induce sensibilidad a ciertas cefalosporinas en la cepa de *E. faecalis* JH2-2. Efecto de la adición en medio N de 1,4mM de Cu₂SO₄ en el test de difusión por discos de diferentes cefalosporinas. El tamaño del halo está expresado en mm. La concentración de antibiótico está expresada en µg. ZOX, ceftizoxima; CPD, cefpodoxima; CTX, cefotaxima; CXM, cefuroxima; CAZ, ceftazidima; CEC, cefaclor.

induce. Para estudiar la implicación del cobre en la resistencia a cefalosporinas se realizaron una serie de ensayos en presencia de cobre en el medio, comprobando que el cobre induce la susceptibilidad a las metoxi-iminocefalosporinas en *E. faecalis* (**Tabla 12**). El fenómeno también se observa en la especie *E. faecium* (**Tabla 13**), tanto en una cepa de laboratorio como en un aislado de la India. Uno de los dos aislados clínicos de la India que no revertían con mitomicina C su resistencia a cefalosporinas sí que la revierte en presencia de cobre (**Tabla 14**), volviéndose sensible a algunas cefalosporinas.

<i>E. faecium</i>	CTX30	CEC30	CPO30	CPD10	CF30	FOX30	MA30	DOR10	FOS200	AMP10
N	11	6	9	6	24	18	6	10	24	27
CuSO ₄ 1,6 mM	36	10	30	24	10	26	26	22	34	36

Tabla 13: La presencia de cobre induce sensibilidad a ciertos antibióticos en *E. faecium*. Efecto de la adición en medio N de 1,4mM de CuSO₄ en el test de difusión por discos. El tamaño del halo está expresado en mm. La concentración de antibiótico está expresada en µg. CTX, cefotaxima; CEC, cefaclor; CPO, cefpiroma; CPD, cefpodoxima, CF, cefalotina; FOX, cefoxitina; MA, cefamandole, DOR, doripenem; FOS, fosfomicina; AMP, ampicilina.

<i>E. faecium</i>		CTT30	CPD10	CTX30	CXM30	CRO30	CEC30
CM54	N	6	6	6	6	6	6
	CuSO ₄ 1,4 mM	6	6	6	6	6	6
CM80	N	6	6	6	6	6	6
	CuSO ₄ 1,4 mM	6	6	12	18	28	20

Tabla 14: La presencia de cobre puede inducir la sensibilidad a ciertos antibióticos en aislados clínicos de *E. faecium*. Efecto de la adición en medio N de 1,4mM de Cu₂SO₄ en el test de difusión por discos. El tamaño del halo está expresado en mm. La concentración de antibiótico está expresada en µg. CTT, cefotetan; CPD, cefpodoxima; CTX, cefotaxima; CXM, cefuroxima; CRO, ceftriaxona; CEC, cefaclor.

Efecto del cobre en la resistencia de JH2-2 LexA⁻ y en un mutante para el segundo gen del operón Cop

Para ver la relación entre el mecanismo de reversión de la resistencia a cefalosporinas mediada por cobre y mediada por la inducción del sistema SOS, se realizó un E-test para cefuroxima, una metoxi-iminocefalosporina, a la cepa JH2-2 LexA^{ind} en presencia de cobre. El cobre induce la sensibilidad a cefalosporinas en una cepa con el sistema SOS reprimido. Se ha construido un mutante de inserción

en el gen EF0298 (EF0297P), que codifica para CopA y que es el segundó gen del operón Cop. Este mutante expresa teóricamente *copY* pero no los otros dos genes del operón. Este mutante es sensible a las metoxi-iminocefalosporinas en presencia de mitomicina C mediante el test de difusión por disco. En presencia de cobre presenta una disminución en el crecimiento a partir de una concentración de cefalosporinas de 64 $\mu\text{g/ml}$, pero el halo de inhibición que se observa presenta un crecimiento tenue de manera que las bacterias llegan a crecer a concentraciones mayores a 256 $\mu\text{g/ml}$ de manera tenue (**Figura 24**).

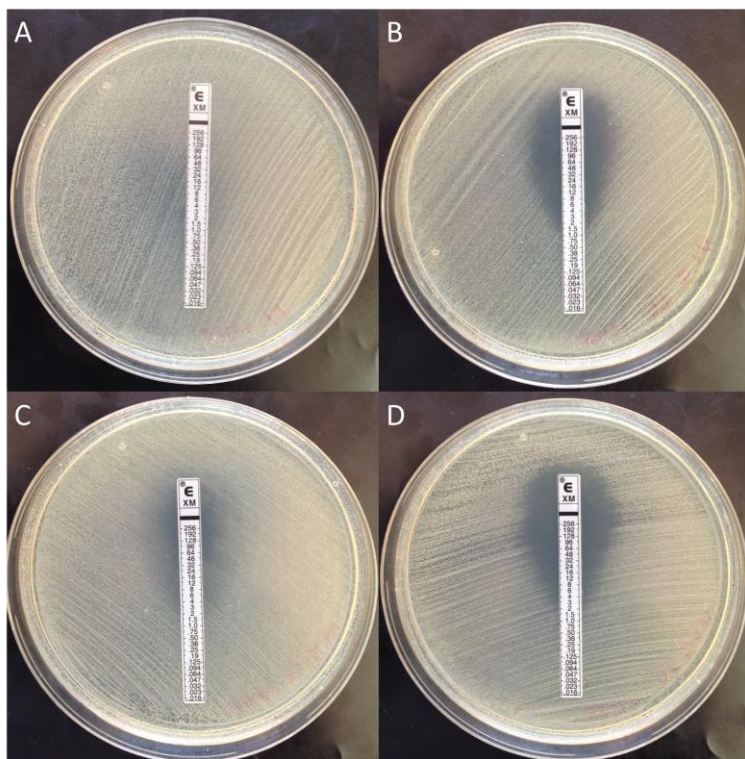


Figura 24: Efecto de la adicción en medio N de 1,4 mM de CuSO_4 en la CMI a cefuroxima. A, CMI en ausencia de cobre representativa de las cepas B, C y D (CMI>256). B, JH2-2 (CMI=12); C, JH2-2 EF0297P (CMI=64/256); D, JH2-2 LexA^{ind} (CMI=24).

Estudio de la resistencia a cefalosporinas de los mutantes por transposición en presencia de cobre

Se estudió la relación entre el cobre y los otros determinantes genéticos identificados en la librería por transposición para ver las posibles relaciones jerárquicas entre ellos. Para ello se realizó una serie de E-test en medio N en presencia y en ausencia de sulfato de cobre. En presencia de cobre, la CMI de JH2-2 pasa de ser mayor de 256 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$. Al realizar la técnica del E-test para cefuroxima a los mutantes por transposición, la mayoría, a pesar de disminuir su densidad, llegan a crecer hasta una CMI de 256 $\mu\text{g/ml}$, incluidos los mutantes de cobre. El mutante para EF1118 que presenta el 14,9% del gen ve disminuida su CMI a 2 $\mu\text{g/ml}$ mientras que el mutante de EF1118 que presenta el 74,1% del gen mantiene su CMI a 256 $\mu\text{g/ml}$. El mutante por transposición en el gen de la hidrolasa de la familia HD asociada a membrana es muy sensible a cefalosporinas y crece únicamente en la periferia de la placa (**Figura 25**).

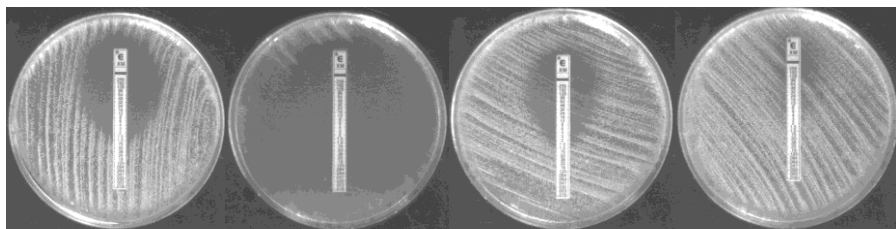


Figura 25: Concentración mínima inhibitoria a cefuroxima en presencia de 1,4mM de CuSO_4 . A, JH2-2, 1 $\mu\text{g/ml}$; B, mutante por transposición en el operón EF2414-EF2409, menor de 0,01 $\mu\text{g/ml}$; C y D, mutantes por transposición en el gen EF1118 del operón EF1120-EF1117 en los nucleótidos 1092852, 2 $\mu\text{g/ml}$ y 1092430, mayor de 256 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. En ausencia de cobre, la CMI de todos ellos es mayor a 256 $\mu\text{g/ml}$.

Discusión

DISCUSIÓN

Fenómeno de la reversión intrínseca a cefalosporinas mediante la inducción del sistema SOS

Cefalosporinas implicadas u el papel de las beta-lactamasas

La inducción del sistema SOS da lugar a una reversión de la resistencia intrínseca a las metoxi-iminocefalosporinas en *E. faecalis* (**Tabla 3** y **Figura 17**), *E. faecium* (**Tabla 4** y **Figura 19**) y *L. ivanovii* (**Tabla 3** y **Figura 18**). Estas bacterias presentan en los antibiogramas un halo de inhibición de 6 mm frente a ellas cuando el sistema SOS no está activado. Para otras cefalosporinas frente a las que presentan un halo de inhibición mayor, este aumenta ligeramente cuando el sistema SOS está activado (cefpiroma, cefalotina) (**Tablas 3 y 4**). Así, el efecto puede no ser tan evidente debido a que las bacterias ya presentan cierta sensibilidad. En *E. faecalis*, el fenómeno se ve principalmente en las ya mencionadas metoxi-iminocefalosporinas, aunque en ocasiones se ha observado cierta inducción en otras oxi-iminocefalosporinas como son la cefsulodina y la ceftazidima, aunque esta inducción no es consistente (**Tablas 3 y 4**). Esto puede deberse a la influencia del medio, cuya composición puede variar ligeramente de un lote a otro. En *E. faecalis* está descrita la influencia del medio de crecimiento en la actividad *in vitro* de las cefalosporinas de segunda y tercera generación,

habiendo diferencias notables de la CMI en medio de diferentes casas comerciales (Sahm *et al.*, 1984). El medio podría igualmente afectar de alguna manera a la mitomicina C. La posibilidad de que la mitomicina C afecte a las cefalosporinas directamente y tenga una influencia directa en la CMI de las mismas queda descartada ya que en el caso de los mutantes para *lexA* también observamos una disminución de la CMI y no hay mitomicina C (**Tabla 1**).

El grupo metoxi-imino contribuye a que la molécula atraviese la membrana externa de las bacterias Gram negativas y a su resistencia frente a las beta-lactamasas. Que sólo ocurra una reversión de la resistencia tan extrema con estas cefalosporinas nos hace plantearnos si es posible que el efecto sea debido a la inhibición de beta-lactamasas en la bacteria. En el genoma de V583 (Paulsen *et al.*, 2003) están codificadas varias beta-lactamasas por los *loci* EF1502, EF1691, EF1197 (metalobetalactamasa YycJ), y EF2434, EF2924 y EF1185 (todas codifican proteínas de la superfamilia de las metalobetalactamasas).

Es posible que la respuesta SOS controle, de manera directa o indirecta, la expresión de las beta-lactamasas y alguna se inhiba de manera que las cefalosporinas alcancen en mayor concentración las PBPs llegando a bloquearlas a pesar de que la PBP implicada en la resistencia a beta-lactámicos tenga poca afinidad por ellas. En la transcriptómica estas enzimas no aparecen alteradas, a excepción de la proteína de la superfamilia de las metalobetalactamasas codificada

por el gen EF1185 (**Tabla S1**). La expresión de este gen está aumentada 1,2 veces en la cepa V583 LexA⁻ respecto a su expresión en V583 WT. Además hay una serie de genes que codifican para proteínas hipotéticas con homología con beta-lactamasas (EF2590, EF0460, EF2904, EF2742, EF1816, EF1371 y EF1433). Ya que no hay diferencias en su expresión, asumimos que las beta-lactamasas no son la causa de la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas.

Características y metabolismo de la pared

También podrían estar implicadas en el proceso las hidrolasas o autolisinas que degradan la pared bacteriana. En circunstancias normales los precursores del peptidoglicano indican una reorganización del peptidoglicano y promueven la activación de las hidrolasas de la pared celular. La inhibición del sobrecruzamiento que causan los beta-lactámicos conduce a una acumulación de los precursores de peptidoglicano. El tratamiento con antibióticos puede causar la liberación de muropéptidos en el citoplasma, lo que en bacterias Gram – está sujeto al reciclaje de la pared (Templin *et al.*, 1992).

Este proceso podría estar medidado por el operón Opp, que se encuentra comprometido en uno de los mutantes por transposición que no se inducen con mitomicina C (**Figura 23**). Esta acumulación lleva a la digestión de la pared sin la producción de nuevo peptidoglicano. El sistema SOS podría inducir un desequilibrio en el proceso de degradación/síntesis de la pared que permitiera a las

cefalosporinas ejercer un efecto bactericida. En *E. faecalis* el gen EF2863 codifica para una endo-beta-N-acetilglucosaminidasa, pero su expresión no se encuentra alterada en la transcriptómica (**Tabla S1**), por lo que no parece que la expresión de dicho gen cambie en función del sistema SOS. Aún así, el nivel de reemplazo del peptidoglicano en *Enterococcus faecalis* es bajo a pesar de que se detecta actividad autocatalítica (Mesnage *et al.*, 2008).

En cuanto a las enzimas responsables de la transpeptidación, el enterococo presenta las PBPs de clase A PonA, PBPF y PBPZ (Paulsen *et al.*, 2003). La resistencia intrínseca a beta-lactámicos y en concreto a las cefalosporinas está mediada por una PBP de clase B de baja afinidad por los beta-lactámicos que debe actuar junto a una proteína con función glicosil transferasa. En JH2-2 el doble mutante para *ponA* y *pbpZ* es susceptible a cefalosporinas (Rice *et al.*, 2005). En la transcriptómica no se aprecian cambios estadísticamente significativos en la expresión de la PBP de baja afinidad. Los genes que codifican para dos PBPs de clase A, la PBPF y la PBPZ, tienen una expresión ligeramente disminuida en el mutante para el gen *lexA* (expresión de -1,3 y de -1,4 respectivamente) (**Tabla S1**). Sería conveniente ahondar en este detalle y sobreexpresar *ponA* desde un vector para ver si se recupera la resistencia a cefalosporinas y comprobar si esa disminución es la responsable del fenotipo observado o esta observación obedece a la menor tasa de crecimiento del mutante LexA⁻. Dentro de las PBPs de clase B, la

expresión de la PBPA está ligeramente disminuida (-1,2) (**Tabla S1**). En cambio la PBP de baja afinidad no presenta un cambio en su expresión que hayamos detectado en el estudio de la transcriptómica. Si esta PBP es la causa subyacente de la reversión de la resistencia, es posible que su alteración sea a nivel postranscripcional. Se podría expresar en trans para ver su implicación en el fenotipo para ver su implicación.

En *E. faecalis*, *E. faecium* y *L. ivanovii*, la disminución de la CMI de las metoxi-iminocefalosporinas ocurre a una escala similar (**Figuras 17, 18 y 19**), por lo que parece que el mecanismo subyacente es el mismo en estas bacterias. Las diferencias en el perfil de antibiorresistencia tanto en ausencia como en presencia de mitomicina C entre estas especies se pueden explicar debido a las variaciones en sus PBPs.

	PBPs clase A			PBPs clase B		
	<i>ponA</i> (EF1148)	<i>pbpF</i> (EF0680)	<i>pbpZ</i> (EF1740)	<i>pbp5/4</i> (EF2476)	<i>pbpC</i> (EF0991)	<i>pbpA</i> (EF2857)
<i>E. faecalis</i> V583						
<i>E. faecium</i> de referencia	DO	DO	DO	CTX0334	E980	E980
Cobertura	87%	98%	95%	99%	99%	99%
Identidad	63%	64%	58%	55%	58%	54%

Tabla 15: Porcentaje de homología de las PBPs entre las especies *E. faecalis* y *E. faecium*. El origen de las secuencias es: *E. faecalis* V583, Paulsen y col.; *E. faecium* DO, NC_017960.; *E. faecium* E980, van Schaik y col. y *E. faecium* TX0334, Pietto y col. (Paulsen *et al.*, 2003).

La homología entre las PBPs de *E. faecium* y *E. faecalis* oscila entre el 54 y el 64% (**Tabla 15**). Además, como se indica en la introducción, a pesar de que el mecanismo de las PBPs de baja afinidad en estas dos especies parece ser similar, al

parecer la susceptibilidad a beta-lactámicos puede variar según la glicosiltransferasa con la que interactúe la PBP de baja afinidad. Así, el perfil de resistencia a ampicilina es diferente en ambas especies cuando se deleccionan las tres PBPs de clase A (Rice *et al.*, 2005), y de modo similar las diferencias observadas en las enzimas que sintetizan la pared podrían ser la razón de las diferencias en la reversión de la susceptibilidad en *E. faecium*.

Para ver la universalidad de la reversión de la resistencia a cefalosporinas en *E. faecalis* y *E. faecium*, se estudió la sensibilidad a cefalosporinas de diferentes aislados clínicos en presencia y ausencia de mitomicina C. Dentro de cada especie, también hay variaciones en la sensibilidad a cefalosporinas (**Tabla 6**). No se ha observado la reversión de la resistencia en todas las cepas resistentes a cefalosporinas en la especie *E. faecium* ni en las cepas de la India (**Tabla 5**). Esto se puede deber a una necesidad de ajustar en cada caso tanto la concentración de mitomicina C (recordemos que la concentración óptima de inducción es diferente para las cepas de *E. faecalis* V583 y JH2-2) (**Tabla 1**) y como de la cefalosporina. El mecanismo que determina la alta resistencia a cefalosporinas podría ser precisamente el que se inhibe en presencia de la activación del sistema SOS.

La variabilidad entre cepas podría deberse igualmente a la presencia de determinantes genéticos determinados en fagos, pero al estudiar la reversión de la resistencia en la cepa pp-, cepa de V583 WT en la que se han deleccionado los

fagos, la inducción de la misma era igual que en la capa V583 WT.

Reversión en *L. ivanovii*

Respecto al fenómeno de la reversión de la resistencia en *L. ivanovii*, la estructura de la mureína es igual en todas las especies de *Listeria* (Hakenbeck y Hof, 1991). Se trata de un polímero formado por unidades alternas de ácido-*N*-acetilmurámico (NAcMur)-(β 1-4)-*N*-acetil-D-glucosamina (NAcGlc). Los muropéptidos se componen de L-alanil- γ -D-ácido glutámic-ácido *meso*-diaminopiméll-D-alanina-D-alanina y están unidos a los residuos de NAcMur. Estas cadenas peptídicas se conectan entre sí mediante una unión directa entre un residuo de D-Ala y el residuo *meso*-diaminopimelil de otro péptido. Se ha visto con el estudio de diversos aislados que las especies de *Listeria* presentan una resistencia intermedia de manera natural a algunas de las cefalosporinas más modernas (cefetamet, cefixime, ceftazidima, cefpodoxima, defotaxima, ceftriaxona y cefuroxima, entre otras) (Troxler *et al.*, 2000). *L. ivanovii* cuenta con dos PBPs bifuncionales de clase A y 3 de clase B (Bierne y Cossart, 2007; Guinane *et al.*, 2006; Korsak *et al.*, 2010). Las PBPs 4 y 5 tienen poca afinidad por las cefalosporinas (Hakenbeck y Hof, 1991). Según la base de datos del NCBI, en el genoma de *L. ivanovii* están los genes *lexA* (WP_014092697) y *recA* (WP_003719674), por lo que la reversión de la resistencia puede estar mediada por el sistema SOS, aunque no se puede descartar que en este caso esté mediada por

genes que se inducen ante un daño en el material genético independientemente del sistema SOS.

Eficiencia de los inductores del sistema SOS y la reversión de la resistencia

Mediante la presencia en el medio de diferentes compuestos que inducen el sistema SOS, se consigue la reversión de la resistencia a las metoxi-iminocefalosporinas en *E. faecalis* (**Tabla 2**). Una inducción eficiente de la respuesta SOS mediante un antibiótico permitiría abriría la puerta a las terapias combinadas con cefalosporinas en las infecciones causadas por enterococos. Las moléculas probadas como inductores del sistema SOS presentan distinta capacidad para revertir la resistencia a cefalosporinas en *E. faecalis*.

Está descrito que las fluoroquinolonas inducen la respuesta SOS al causar roturas en el ADN (Malik *et al.*, 2006), (Courcelle y Hanawalt, 2003), (Bellio *et al.*, 2014), (Pohlhaus *et al.*, 2008), así como el trimetoprim (Goerke *et al.*, 2006) y los beta-lactámicos (Miller *et al.*, 2004). En cambio la novobiocina puede inhibir la respuesta SOS (Schröder *et al.*, 2013), y nosotros no vemos reversión de la resistencia en presencia de este compuesto.

La utilización de las moléculas que han demostrado una reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas abren la puerta al uso de terapias

combinadas *in vivo*, ampliándose el arsenal terapéutico disponible para tratar las infecciones enterocócicas. Además la dosis efectiva del antibiótico inductor en terapia combinada podría ser menor, lo que disminuiría los efectos secundarios del tratamiento.

Aplicación de las cefalosporinas *in vivo*

Para ver si las cefalosporinas podrían ser una alternativa terapéutica en las infecciones enterocócicas y así ampliar las opciones terapéuticas disponibles actualmente, se ensayó la eficacia de la ceftriaxona en un modelo murino. La combinación levofloxacina (150mg/kg) y ceftriaxona (50mg/kg) se ha ensayado en ratones para el tratamiento de *S. pneumoniae* en ratones con neumonía y se ha visto que disminuye la inflamación pulmonar (Majhi *et al.*, 2014).

Antes del trabajo realizado con la cepa silvestre JH2-2 que se presenta en este trabajo, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio con la cepa V583 WT se realizó el recuento de la carga bacteriana en hígado, bazo corazón y riñones a los 3 y 7 días de la infección sin ningún tipo de tratamiento. Las tendencias observadas eran que en el corazón y en el bazo la bacteria se pierde completamente, mientras que en hígado va disminuyendo a la par que en riñones parece haber una tendencia a aumentar (datos no mostrados). Esta tendencia a

umentar del día 3 al día 7 postinoculación, se refleja, aunque más ligeramente, en el trabajo realizado por Kau y col (Kau *et al.*, 2005). Dado que las infecciones del tracto urinario son las infecciones más frecuentes causadas por enterococos (Huycke *et al.*, 1998) y que se han descrito numerosos factores importantes en el tropismo y la colonización del tracto urinario (Shankar *et al.*, 2001) se ha utilizado la carga bacteriana presente en los riñones como indicador de la eficacia del tratamiento con cefalosporinas.

Se inocularon 4 grupos de ratones con la cepa JH2-2 silvestre y se les aplicó como tratamiento solución salina, levofloxacina, ceftriaxona o una combinación de levofloxacina y ceftriaxonA. Dos grupos se inocularon con JH2-2 LexA⁻ y se trataron con solución salina o con ceftriaxona.

En ambos grupos con el sistema SOS activado, esto es, el grupo inoculado con JH2-2 LexA⁻ y tratado con ceftriaxona y el grupo inoculado con la cepa JH2-2 y tratado con levofloxacina y ceftriaxona, se observa una diferencia significativa en la carga bacteriana respecto al grupo control (inoculado con la cepa JH2-2 y tratado con solución salina) (**Figura 20**).

Se demuestra así que es posible el tratamiento *in vivo* de las infecciones enterocócicas con cefalosporinas mediante la combinación de las mismas de agentes inductores del sistema SOS.

Estudio de la expresión génica en *E. faecalis*

Se ha llevado a cabo un estudio de la transcriptómica en *E. faecalis* V583 WT utilizando un chip de ADN con el objetivo de identificar que genes alteran su expresión cuando la respuesta SOS está inducida

Se realizó el estudio en *E. faecalis* V583 WT, V583 LexA⁻ y V583 LexA^{ind} con y sin la adicción de 1 µg/ml de mitomicina C en el medio. El estudio se realizó por triplicado en réplicas técnicas. Únicamente se encontraron diferencias de expresión significativas entre la cepa silvestre y la cepa V583 LexA⁻. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas V583 WT con y sin mitomicina C ni V583^{ind} con y sin mitomicina C. El que no haya diferencias significativas en la cepa WT respecto a la cepa con mitomicina C indica que a pesar de inducir el sistema SOS con una concentración de mitomicina C alta no detectamos una inducción comparable a la creada al no tener el represor del sistema LexA. Esto puede deberse a que al ser la inducción del sistema en oleadas no hayamos extraído el ADN en uno de sus picos de inducción (Friedman *et al.*, 2005), aunque parece más probable que llegar a una inducción comparable a la de la bacteria sin el represor del sistema SOS, LexA, igual no es posible en la práctica. La concentración de mitomicina utilizada para inducir la respuesta SOS en *B. subtilis* en el trabajo para caracterizar su respuesta SOS en esta bacteria es 1 µg/ml (Au *et*

al., 2005), la misma que hemos utilizado nosotros. Que nosotros no hayamos obtenido resultados significativos con esa concentración se puede deber a la diferente susceptibilidad de las dos especies, a la técnica de preparación del cDNA y la sensibilidad del chip. Dado que nuestra intención es ver si hay diferencias en la transcripción en una bacteria resistente a cefalosporinas y en una bacteria en la que esa resistencia se ha revertido, las diferencias entre la cepa silvestre V583 WT y el mutante de V583 LexA⁻ pueden arrojar luz sobre este fenómeno.

Se determinó la caja LexA con las secuencias de la misma identificadas en los genes cuya transcripción se encuentra alterada en la cepa V583 LexA respecto a la cepa V583 WT. La secuencia de la caja identificada para *E. faecalis* no presenta variaciones significativas en los nucleótidos más relevantes respecto a la descrita en *B. subtilis* y para la división Firmicutes, coincidiendo con el motivo GAAC-N4-GTTC descrito como caja LexA monofilética de las bacterias Gram positivas (Erill *et al.*, 2007).

El número de genes cuya transcripción se ve alterada en el mutante V583 LexA⁻ es de 968 (**Tabla S1**). En *E. coli*, la exposición a mitomicina C altera la expresión de más de 1000 genes (Khil y Camerini-Otero, 2002). En este caso, casi 1000 genes están alterados en el mutante V583 LexA⁻. La alteración en la expresión de estos genes no es debida a un daño en el ADN, si no a la falta de represión del sistema SOS. Nosotros hemos encontrado 22 cajas LexA que regulan

un total de 42 genes. En *E. coli* se han encontrado al menos 26 cajas LexA funcionales controlando 31 genes que parecen estar regulados negativamente por LexA (Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000). Parece que el número de genes no controlados directamente por LexA inducidos por daño en el material genético es considerable (Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000) y hay al menos 22 proteínas que se inducen con luz UV en una cepa deficiente en LexA (Lesca *et al.*, 1991).

Respecto a bacterias Gram +, en *B. subtilis* se ha llevado a cabo la caracterización del sistema SOS (Au *et al.*, 2005) y se identificaron 54 genes a los que LexA se unía en su región reguladora mediante un ensayo de movilidad electroforética organizados en 34 operones. Mediante un chip de ADN, vieron que de ellos 33 de estos genes se inducían específicamente con mitomicina C y radiación ultravioleta de una manera dependiente de RecA. Estos genes se encuentran precedidos por 22 cajas LexA y organizados en 18 operones. En nuestro caso, también hemos identificado 22 cajas LexA delante de genes cuya expresión está alterada en la cepa LexA⁻. Para comprobar que realmente estos genes forman parte del regulón SOS es necesaria la realización de ensayos de movilidad electroforética y ver la afinidad de LexA por esas cajas.

Algunos genes identificados como parte del regulón de *B. subtilis* (Au *et al.*, 1988) coinciden con los que nosotros hemos identificado. Es el caso de los genes *uvrA* y *uvrB*, que en nuestro caso doblan su expresión en el mutante para *lexA*

(**Tabla 7**). Estas proteínas forman parte de la UvrABC excinucleasa, que cataliza la excisión de una variedad de lesiones en el ADN (Sancar y Sancar, 1988). En *E. faecalis*, al igual que en *B. subtilis* y al contrario que en *E. coli*, ambos genes se encuentran formando parte de un operón y tienen una expresión entre 8 y 12 veces mayor en *B. subtilis* y 4 y 6 respectivamente en *E. coli*. Los operones formados por EF0761 y EF0760, que codifican para un transportador de glutamina, y *uvrB-uvrA* comparten la caja SOS y se transcriben de manera divergente. La circunstancia de esta transcripción divergente con una caja LexA compartida también está descrita en *B. subtilis* (Au *et al.*, 2005). Es posible que una alteración en la expresión del transportador de glutamina sea un efecto colateral de la presencia de la caja LexA delante del operón *uvrB-uvrA*. Los transportadores de glutamina parecen importantes en la resistencia intrínseca a cefalosporinas (**Figura 23**). Una alteración en la expresión de este transportador de glutamina de manera “accidental” al inducirse la respuesta SOS puede ser la causa subyacente de la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas. La respuesta SOS es un sistema mediante el que la bacteria aumenta sus probabilidades de supervivencia en presencia de un daño en el material genético.

En nuestro caso, dos genes importantes en la reparación por excisión, *uvrC* (expresión de 1,8, **Tabla S1**) y *uvrD*, no forman parte de la respuesta SOS (**Tabla 7**), mientras que sí lo hacen en *B. subtilis* (Au *et al.*, 2005) y *E. coli* (Peterson y

Mount, 1987), aunque en el genoma de *E. faecalis* sí que encontramos sus homólogos. En *E. faecalis* encontramos formando parte del regulón SOS el gen *mutY* (EF2704), que codifica para una glicosilasa conocida por su papel en la reparación de bases del ADN por excisión (Lu *et al.*, 2001). Este gen forma parte del sistema de reparación GO (Michaels *et al.*, 1992), importante en la prevención de mutaciones derivadas de la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), una de las principales lesiones que se derivan de la oxidación de la guanina (Au *et al.*, 1988). *mutY* forma un operón con *recX*, que codifica para una proteína reguladora de la recombinación, estando así ambos genes bajo la regulación del sistema SOS. Tal y como se describe en la introducción de este trabajo, RecX actúa como inhibidor de la respuesta SOS y forma parte del regulón en *E. coli*.

En el regulón de *E. faecalis* también encontramos genes relacionados con la reparación por recombinación, como son *ruvA* y *ruvB* (**Tabla 7**) aparentemente formando un operón, como también parecen hacerlo en *E. coli* y en *B. subtilis* (Au *et al.*, 2005). En nuestro caso el primer gen del operón, *ruvA*, presenta una expresión ligeramente disminuida (-1,17) mientras que el segundo gen, *ruvB*, presenta un ligero aumento de su expresión (1,3) en el mutante para *lexA*. En *E. coli* estas proteínas parecen jugar un papel presumiblemente con RecA en la promoción de la migración de rama dependiente de ATP (Parsons *et al.*, 1995).

En el regulón de *E. faecalis* no hemos identificado genes que codifiquen para la

ADN girasa ni para la ADN topoisomerasa IV, al contrario de lo que pasa en *B. subtilis* (Au *et al.*, 2005). Aún así, los genes *parC* y *gyrA* presentan un aumento en su expresión de 1.2 (**Tabla 7**). Tal vez haya una regulación indirecta de los mismos.

Otro mecanismo clave en la recuperación de la bacteria ante una agresión en el material genético es la síntesis por translesión. Este tipo de síntesis del ADN permite a la bacteria replicar el material genético a través de una hebra molde dañada e introduce mutaciones en el ADN (Napolitano *et al.*, 2000). En el regulón SOS de *E. faecalis* hay dos genes que presentan cierta homología con genes de las polimerasas de translesión (**Tabla 7**). Uno es el gen EF1080, cuyo producto presenta un 25% de homología con la proteína UmuC de *E. coli*, una de las subunidades de la ADN polimerasa. El gen EF0078, que no forma parte del regulón SOS pero que presenta una expresión de 1,3 en el mutante *lexA* (**Tabla S1**), codifica para una proteína homóloga a UmuC. Este gen está sobreexpresado en el mutante *LexA* 7,4 veces. No hemos visto homólogos de UmuD en el genoma. El gen *dinP* (EF2756) forma parte del regulón SOS y se encuentra sobreexpresado 2,1 veces. Su producto presenta una homología del 41% con la polimerasa IV. Las dos proteínas en *E. coli* pertenecen a la superfamilia Y de las ADN polimerasas, cuyos miembros son capaces de replicar sobre diversas lesiones en el ADN (Goodman, 2002; Kim *et al.*, 1997).

Cabe destacar que en el genoma de *E. faecalis* no está presente, al menos bajo el control del regulón SOS, una proteína que se haya implicado en la detención de la replicación cuando el ADN está dañado (Paulsen *et al.*, 2003) (**Tabla 7**). De hecho, nuestro V583 LexA⁻ es capaz de multiplicarse, aunque es cierto que crece algo más lento que la cepa silvestre (datos no mostrados). En cambio en *E. coli* está la proteína SulA (Mukherjee *et al.*, 1998) y en *B. subtilis* YneA, habiendo indicios de que esta proteína suprime la división celular durante la respuesta SOS (Kawai *et al.*, 2003). *E. faecalis* tampoco presenta en su genoma *ydjM* (proteína hipotética de la membrana interna), *dinI* (que retrasa la síntesis de la polimerasa V), *rdgC* (implicado en la formación del filamento de RecA) ni el gen que codifica para la proteína Cho. Llama la atención el hecho de que no estén presentes los genes de las polimerasas de síntesis por translesión Pol II ni UmuD (Paulsen *et al.*, 2003).

En el regulón SOS que hemos identificado hay genes que codifican para otras proteínas implicadas en el metabolismo del ADN (**Tabla 7**), como son una helicasa (EF1162). Un operón formado por los genes EF0682, que codifica una exonucleasa de reparación del ADN y EF0683 y EF0684, que codifican proteínas homólogas a exorribonucleasas que requieren manganeso o cobre, también forman parte del regulón SOS en *E. faecalis*. Los productos de estos dos últimos genes, según el programa String, presentan coocurrencia con RecU, una resolvasa de la

unión de Holliday que en *B. subtilis* modula la actividad de RecA (Carrasco *et al.*, 2005). También las exonucleasas RexA y RexB son proteínas cuyos genes, organizados en un operón, forman parte del regulón SOS y presentan una sobreexpresión de 1,5 y 1,3 respectivamente (**Tabla 7**). En cambio, ninguno de los genes *ssb* (*single strand binding*) de los 3 presentes en el cromosoma de *E. faecalis* que codifican proteínas de unión a hebra sencilla y que son importantes en la activación del sistema SOS forman parte del regulón en *E. faecalis* y en *B. subtilis* (Au *et al.*, 2005). En *E. coli*, en cambio, si que hay un gen que codifica para una proteína SSB cuya expresión está bajo el control del sistema SOS (Brandsma *et al.*, 1985). Hay que destacar que el gen *ssb-1* (EF0008) presenta una sobreexpresión en el microarray de 1,9 en la cepa LexA. 2 genes, *ssb-4* y *ssb-5*, están codificados en el plásmido pTEF1, mientras que *ssb-6* está codificado en el plásmido pTEF2. Hay que tener en cuenta que en el microarray solo hemos estudiado la expresión de los genes del cromosoma.

Ni en el regulón de *E. coli* (Simmons *et al.*, 2008) ni en el regulón de *B. subtilis* (Au *et al.*, 2005) está descrita la disminución de la transcripción de genes del sistema SOS. En nuestro caso hay tres operones cuya expresión está disminuida (**Tabla 8**) y que presentan una caja LexA, aunque habría que comprobar la funcionalidad de la misma. Uno relacionado con el transporte de azúcares, uno compuesto por diversos genes de la ruta metabólica de la síntesis de

diversos aminoácidos aromáticos, y un último operón que comprende la integrasa/recombinasa XerD, la proteína A de segregación y condensación y una proteína hipotética.

Las rutas metabólicas podrían estar alteradas en el caso de que el estado metabólico que las células con el sistema SOS activado fuera diferente al de las células con un sistema SOS que se expresa a niveles basales. Esto podría explicar esa menor expresión de los operones mencionados. Otra posible causa de esta represión es que al presentar la bacteria LexA⁻ un crecimiento más lento que la cepa silvestre las necesidades metabólicas sean menores y que por ello los genes relacionados con el metabolismo estén disminuidos. Respecto a la recombinasa, la misma participa en la resolución de los dímeros del cromosoma, por lo que junto con la disminución en la proteína A de segregación y condensación podría jugar un papel en esa menor velocidad de crecimiento de la cepa LexA, ya sea como causa de ese retardo en el tiempo de generación a modo de control temporal, o como consecuencia del mismo.

Puede que estos genes presenten una expresión disminuida porque la separación del dímero de LexA hace que la hebra del ADN adopte una conformación menos favorable para la transcripción de los genes.

Algunos genes próximos a los genes del regulón podrían presentar alterada su transcripción, como son por ejemplo los genes EF1082 (proteína hipotética, sobreexpresión en el mutante V583 LexA⁻ de 4,2), EF1083 (proteína hipotética, expresión de 7,7), EF1084 (familia de proteínas universales de respuesta a estrés, expresión de 7,8) y EF1085 (proteína hipotética, expresión de 12), que presentan su transcripción aumentada. Este tipo de corregulación se podría producir porque la transcripción continuase debido a un terminador ineficiente de los genes regulados por el sistema SOS, que el operón descrito realmente se expandiera a todo el grupo de genes vecinos o a que haya un efecto en la región debido a factores proteicos o a la conformación estructural del ADN en la región que ante la unión separación del dímero de LexA de lugar a una expresión génica diferente en genes que no son del regulón (Courcelle *et al.*, 2001).

La alteración de la expresión de genes que en principio no forman parte del sistema SOS y que no se encuentran próximos a ningún gen del mismo pueden estar regulados de manera indirecta por los genes que sí que lo conforman o ser una respuesta a las consecuencias que la inducción constitutiva tiene sobre la bacteria.

En nuestro caso, lo que vemos son genes cuya transcripción varía en ausencia de LexA. Esto implica una activación del sistema SOS a su máximo nivel. Es posible que la expresión de estos genes no se altere en una respuesta SOS

fisiológica o inducida por un daño en el material genético. Al trabajar con una bacteria deficiente en la proteína LexA, el nivel de transcripción de los genes va a estar definido por la fuerza del promotor. No va a ocurrir ningún control temporal como el ya descrito. Este tipo de expresión puede suponer a la bacteria unas consecuencias que no se dan en condiciones normales y, por tanto, que la bacteria, a fin de lidiar con esta expresión no regulada, altere como consecuencia la transcripción de genes que en una respuesta SOS fisiológica no se vean alterados.

Esto implica que además de la acción directa de modulación del sistema SOS en la expresión génica mediada directamente por la caja SOS, la activación de la respuesta SOS activa muchos más genes.

Respecto a los genes candidatos a mediar la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas identificados en el regulón SOS, se estudiaron en mayor profundidad los genes *aro* (**Tabla 8**) y el gen que codifica para la subunidad UmuC de la polimerasa V (**Tabla 7**), que presenta una sobreexpresión en el mutante *lexA⁻* de 7,4. La razón del interés suscitado por los genes *aro* se debe a que la primera enzima de la vía del shikimato, codificada el operón de los genes *aro*, utiliza el mismo sustrato y tiene una función similar a la proteína MurAA. Esta proteína ha sido descrita como importante en la resistencia intrínseca a cefalosporinas.(Vesić y Kristich, 2012). La hipótesis era que una alteración de los genes *aro* podía conducir a una alteración de la función de la proteína MurAA. En

Salmonella enterica está descrita la alteración de la pared celular en mutantes *aro* (Sebkova *et al.*, 2008). En nuestro caso, tanto el mutante de inserción para el primer gen del operón como el mutante de inserción para el primer gen de la ruta del shikimato, que es el segundo del operón, no presentan un cambio fenotípico respecto a la resistencia a cefalosporinas. El mutante de inserción para el gen EF1080, que codifica una proteína homóloga a UmuC, tampoco presentó un fenotipo diferente al de la bacteria silvestre respecto a su resistencia a cefalosporinas.

Tras realizar el protocolo de mutagénesis por transposición se ha identificado un operón que parece importante para la resistencia a cefalosporinas y que forma parte del regulón SOS (**Figura 23** y **Tabla 7**). Es el operón formado por los genes EF0760-EF0761, que codifican para un transportador de glutamina. El mutante por transposición para este operón mantiene la resistencia a cefalosporinas en presencia de mitomicina C. En la cepa V583 LexA⁻ estos genes se expresan el doble que en la cepa silvestre (**Tabla 7**).

Respecto a los genes descritos como implicados en la resistencia intrínseca a cefalosporinas, algunos de ellos presentan un cambio en su expresión en el mutante LexA⁻ (**Tabla S1**). Así, el gen que codifica para IreK presenta una disminución en su expresión de 1,2, el gen que codifica para MurAA presenta un aumento de 1,3, el gen que codifica para el sensor histidina quinasa del sistema

CroR/S presenta una disminución en su expresión de 1,3 y el gen *rpoB* presenta una disminución de 1,4. Dos mutantes de nuestra librería por transposición tienen alterado el transportador de glutamina regulado por CroR/S, el operón EF1117-E1120 (**Figura 23**).

A fin de caracterizar totalmente el regulón SOS en *E. faecalis* deberíamos ampliar la búsqueda *in silico* y realizar ensayos de movilidad electroforética para comprobar a qué cajas SOS realmente se está uniendo el dímero de LexA.

Expresión de los genes implicados en la resistencia intrínseca a cefalosporinas estimada mediante PCR cuantitativa

A fin de validar los resultados del chip de ADN y tener una estimación más precisa de la expresión de los genes implicados en la resistencia intrínseca a cefalosporinas, se llevo a cabo una PCR cuantitativa de los genes descritos hasta el momento como importantes en la resistencia intrínseca a cefalosporinas. Las estimaciones se realizaron en *E. faecalis* V583 y JH2-2 sin nada en el medio, en presencia de mitomicina C y en presencia de levofloxacina, además de a sus correspondientes mutantes en el gen *lexA* (**Figura 22**). Los estudios que describen estos genes como implicados en la resistencia a cefalosporinas han utilizado en sus ensayos oxi-iminocefalosporinas (ceftriaxona y ceftazidima en IreK/IreP; ceftriaxona y ceftazidima para MurAA; ceftriaxona para CroR/S), lo que nos

sugiere que el mecanismo mediado por el sistema SOS podría implicar estos factores.

En la cepa V583, para *ireK* y para *murAA*, la tendencia cuadra con lo apreciado en la transcriptómica, mientras que para *croS* no es así. En esta cepa además no se observa una correspondencia entre un grado mayor de inducción de la respuesta SOS (mutante *lexA*⁻, inducción con mitomicina C, inducción con levofloxacina, sin inductor) y una expresión diferencial de los genes más diferente a la cepa silvestre. Esto en cambio sí ocurre en la cepa JH2-2. Además en JH2-2 la inducción del sistema SOS se corresponde con una disminución de la expresión de los determinantes genéticos descritos como claves en la resistencia a cefalosporinas. En cambio esto en la cepa V583 solo ocurre para los genes *ireK* e *ireP*. Dado que el mecanismo subyacente de la reversión de la resistencia debería ser el mismo en ambas cepas no parece que estos determinantes sean los mediadores de este fenómeno de reversión. Se aprecia que la expresión de los genes de un mismo operón, como son los que codifican para los sistemas de dos componentes IreK/IreP y CroR/S, siguen la misma tendencia.

La linealidad del gen *rpoB* se ha determinado como satisfactoria para ser utilizado como control en las PCRs cuantitativas, así como *gyrB* (Riboldi *et al.*, 2014).

La expresión en *trans* de los genes en los mutantes LexA⁻ para ver si se recupera el fenotipo de resistencia e incluso expresar los diferentes determinantes de resistencia descritos en cepas defectivas para uno de ellos arrojaría luz sobre la relación de los mismos entre sí y con el sistema SOS. También es posible que el sistema SOS actúe a nivel postranscripcional sobre estos factores, siendo necesaria una aproximación diferente para completar estos resultados.

Mutagénesis por transposición

A fin de identificar los determinantes genéticos que median la reversión de la resistencia, se realizó un protocolo de mutagénesis aleatoria por transposición. Se seleccionaron los mutantes que en presencia de mitomicina C se mantenían resistentes. Se han identificado una serie de genes que podrían estar implicados en la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas. De los 7 genes que hemos identificado (**Tabla 11**), dos de ellos (EF3107 y EF3106) forman parte del mismo operón (EF3106-EF3110), el cual codifica para un transportador de péptidos. Hay dos mutantes diferentes en el gen EF1118, que codifica para la permeasa de un transportador de aminoácidos tipo ABC, y tres mutantes de transposición diferentes en el gen que codifica para el represor transcripcional *copY* (EF0297). Entre los genes identificados en la librería por transposición, 5 de los mutantes tienen interrumpidos sistemas transportadores tipo ABC de aminoácidos o de péptidos. Estos mutantes por transposición se distribuyen en tres operones

diferentes (**Tabla 11** y **Figura 3**). Que no hayamos encontrado mutantes de transposición en ninguno de los genes que se conocen hasta ahora como importantes en la resistencia intrínseca a cefalosporina se justifica ya que la disrupción de estos genes dan lugar a sensibilidad. Nosotros hemos seleccionado mutantes que en presencia de mitomicina C, un compuesto que como visto revierte la resistencia intrínseca a cefalosporinas, fueran resistentes. Es por esta misma razón por la que no encontramos ningún mutante en las dos proteínas reguladoras del sistema SOS. Una falta de LexA hace a la bacteria sensible, mientras que un mutante en *recA*, aunque no viera alterada su resistencia, no podría lidiar con el daño en el material genético que está infringiendo la mitomicina C al no ser capaz de inducir el sistema SOS.

La relación entre los determinantes genéticos identificados y la resistencia intrínseca a cefalosporinas precisa de un estudio en mayor profundidad que incluya la mutación y complementación de los diferentes genes candidatos. La posible implicación y relación de los mismos con el fenómeno de la reversión de la resistencia a cefalosporinas se detalla a continuación.

Unidad transcripcional EF1938: ATPasa transportadora de cationes

Este es el único gen identificado que no forma parte de un operón. Codifica para un transportador de cationes. El programa String relaciona esta proteína con

el producto del gen EF3120, la quinasa de uno de los sistemas de dos componentes implicados en la resistencia intrínseca a cefalosporinas (CroR/S). También lo relaciona con la proteína SapB, codificada por el gen EF0759, adyacente a un operón mutado en esta misma librería por transposición, y con RpoD, un factor de transcripción. Respecto a su entorno genético, el gen que le precede codifica para una proteína hipotética de membrana, y el posterior una proteína hipotética. En el estudio de la expresión génica mediante el chip de ADN hay varias proteínas transportadoras de cationes cuya transcripción está alterada. Así, está alterada la expresión en la cepa V583 LexA⁻ del gen EF1304, cuya expresión está disminuida en 1,4 y que codifica para una ATPasa transportadora de cationes de la familia E1-E2; del gen EF0280, perteneciente a una familia de proteínas de eflujo de protones, con una disminución de la transcripción de 1,3; del gen EF1268, una ATPasa transportadora de cationes de la familia E1-E2, con un aumento de 1,2 y del gen EF0859, que codifica una proteína de una familia implicada en el eflujo de cationes, con una disminución de su expresión 1,8. En un trabajo en el que se estudia la expresión génica de *E. faecalis* V583 en presencia de eritromicina ninguna bomba de cationes presenta alterada su transcripción (Aakra *et al.*, 2005). Es la primera vez que se relaciona un transportador de cationes con la resistencia intrínseca a cefalosporinas, y se precisan más estudios para corroborar su implicación en el fenotipo de antibiorresistencia y para dilucidar su papel.

Unidad transcripcional EF1120-EF1117: Transportador de glutamina

Dos de los mutantes por transposición presentan interrumpido el gen EF1118, que codifica para la permeasa de un transportador de aminoácidos (**Tabla 11**). Este gen es el penúltimo de un operón de cuatro genes (**Figura 23**). Por tanto, se va a ver alterada la transcripción de los dos últimos genes del operón, EF1118 y EF1117, que codifican ambos para una permeasa del transportador del que forman parte. Las proteínas que codifica este operón son GlnQ, proteína de unión a ATP (EF1120), GlnH, proteína de unión a aminoácidos (EF1119), GlnM, permeasa (EF1118) y GlnP, también una permeasa (EF1117). Los cuatro genes codifican diferentes subunidades de un transportador de aminoácidos tipo ABC. La homología entre las permeasas codificadas por EF1118 y EF1117 es del 26% (cobertura del 85%). Es de remarcar que este operón se encuentra bajo el control del sistema de dos componentes CroR/S (Le Breton *et al.*, 2007), implicado en la resistencia intrínseca a cefalosporinas. Este sistema de dos componentes es capaz de unirse a fragmentos de peptidoglicano. Un mutante en *E. faecalis* que carece de CroR pierde la resistencia intrínseca a cefalosporinas (Comenge *et al.*, 2003). Además, recientemente se ha demostrado que el estrés oxidativo causado por H₂O₂ en la pared celular aumenta la resistencia a cefalosporinas a través de este sistema de dos componentes (Djorić y Kristich, 2015).

La glutamina es un metabolito clave en el metabolismo del nitrógeno (Wagner *et al.*, 2013). En el enterococo el gen EF2159 codifica para la proteína GlnA, una glutamina sintetasa de tipo I. Esta enzima cataliza síntesis de glutamina condensando para ello glutamato y amoníaco. El glutamato es un aminoácido presente en la cadena peptídica del peptidoglicano. Cabe mencionar que de manera divergente al operón que codifica para el transportador de glutamina se transcribe la glutamato racemasa MurI, que convierte el L-glutamato a D-glutamato, componente del peptidoglicano. Además, el enterococo tiene una enzima bifuncional glutamato-cisteína ligasa/glutación sintetasa codificada por el gen EF3089, que participa en la síntesis del glutati6n. El glutati6n es importante en el mantenimiento del estado redox de la c6lula; de hecho, el gen *gpx*, que codifica para una glutati6n peroxidasa, est6 sobreexpresado en un mutante en la cepa de *E. faecalis* OG1RF para AsrR, un regulador que responde al estr6s oxidativo (Lebreton *et al.*, 2012). As6, el glutamato podr6a influir de dos maneras en la bacteria: por ser un componente del peptidoglicano y por participar en el estado redox de la c6lula. Cabe destacar que en un estudio realizado por Suzuki y colaboradores en el que identifican mutaciones en bacterias resistentes a diferentes antibi6ticos en *E. coli*, en un mutante resistente a cefoperazona est6 mutada la prote6na de uni6n a ATP de un transportador de glutati6n de la superfamilia de transportadores tipo ABC (*ylia*).

Unidad Transcripcional EF0761-EF0760: transportador de glutamina

Este es el segundo transportador de glutamina que hemos identificado en nuestra librería por transposición. En este caso, el transportador forma parte del regulón SOS, lo que puede indicar que la reversión de la resistencia intrínseca en las bacterias con el sistema SOS activado está mediada por este regulón. Tal y como hemos visto con el operón anterior, parece haber una relación entre los transportadores de glutamina y la resistencia a cefalosporinas que merece un estudio en mayor profundidad.

Unidad transcripcional EF3110-EF3106: Transportador de péptidos relacionado con el systems Opp

Al secuenciar los mutantes por transposición dos de ellos son mutantes para genes contiguos que forman parte de la misma unidad de transcripción y que codifica para un transportador de péptidos (**Tabla 11** y **Figura 23**). Los transposones están en los genes EF3106 (proteína de unión a péptidos) y EF3107 (permeasa). Dado que presentan un fenotipo similar, parece que el gen implicado en el fenotipo podría ser el último del operón, EF3106, ya que su transcripción está afectada en los dos mutantes por transposición, o que todas las proteínas del operón fueran imprescindibles para la funcionalidad del transportador de péptidos tipo ABC. Los genes de este operón tienen dominios conservados que se corresponden con los sistemas de transporte de péptidos Opp (sistema de transporte de oligopéptidos OppABCDEF) y Ddp (sistema de transporte de

dipéptidos/oligopéptidos/niquel). Los sistemas tipo Opp, que unen péptidos de dos a 35 aminoácidos, pueden tener un papel en el remplazo de los péptidos de la pared (Reith y Mayer, 2011).

En *B. subtilis*, este operón tiene una función en el ciclo celular participando en la esporulación (Hoch, 1976, 1993; Perego *et al.*, 1991; Rudner *et al.*, 1991). La acumulación de péptidos en el interior celular puede ser una señal para la esporulación (Perego *et al.*, 1991). En *E. faecalis* podría tener un papel en la fisiología de la pared celular.

El sistema DppBCDF funciona como un transportador de hemo en *E. coli* (Létóffé *et al.*, 2006). El sistema de transporte Opp parecía estar implicado en la captación del grupo hemo necesario para la actividad de la catalasa dependiente de hemo en la especie que nos ocupa, aunque finalmente parece el sistema Opp presenta baja afinidad por este grupo prostético (Baureder y Hederstedt, 2012). El sistema DppBCDF funciona como un transportador de hemo en *E. coli* (Létóffé *et al.*, 2006). Este hecho hubiera ligado el estrés oxidativo con la respuesta SOS.

El gen *oppA* se ha utilizado en un trabajo realizado por Suzuki y colaboradores (Suzuki *et al.*, 2014) para la predicción de la resistencia a antibióticos en función del perfil de expresión de ciertos genes. La expresión de la proteína OppA aumenta en *E. coli* en presencia de beta-lactámicos y de quinolonas (Suzuki *et al.*,

2014). Algunos estudios previos discuten si la delección de este gen contribuye a la resistencia a aminoglucósidos (Acosta *et al.*, 2000). Por tanto, hay evidencias de una posible relación entre este operón y la resistencia a antibióticos.

En nuestro caso, es posible que ante una agresión, el transportador capte péptidos fruto de la degradación de la pared celular y que esto desencadene una respuesta en el refuerzo de la pared, o incluso en un sobreexpresión de una PBP de baja afinidad. Por ahora no podemos elucidar el papel de este transportador en la respuesta SOS, pero parece que este sistema transportador es importante.

Según la base de datos String, la proteína codificada por EF3106 tiene relación con otro sistema transportador de péptidos (EF0913-EF0909, que según el chip de ADN, presenta su transcripción disminuida en el mutante V583 LexA⁻, **Tabla S1**) y las proteínas codificadas por EF2903 (proteína de unión al sustrato de un transportados tipo ABC, con una expresión de 1,2 en el mutante V583 LexA⁻ **Tabla S1**) y EF2221 (la proteína de unión a sustrato de un transportador ABC UgpB de transporte de glicerol-3-fosfato, con una expresión de 1,2 en el mutante V583 LexA⁻ **Tabla S1**).

Unidad transcripcional EF2414-EF2409: Operón que incluye el gen que codifica la proteína RecO

Este operón conformado por 6 genes que codifican para diversas proteínas presenta un interruptor por el transposón su segundo gen, EF2413, que codifica para una proteína con un dominio HD. En principio, la transcripción del primer gen no se vería afectada, pero dado que todos los genes conforman un operón, es posible que Pho, codificado por el primer gen del operón (EF2414), necesite del resto de genes del operón para cumplir su función adecuadamente. Este gen, el EF2414, codifica para una proteína tipo Pho, que se induce en caso de falta de fosfato. Es posible por tanto que la respuesta SOS se encuentre relacionada con otras respuestas frente a estrés. El gen en el que está el transposón presenta un dominio conservado tipo HD. Este tipo de dominio que se encuentra en una familia de proteínas con actividad fosfohidrolasa. Estas enzimas parecen estar implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos y la transducción de señales, además de probablemente en otras funciones. En el dominio HD están muy conservados ciertos residuos que son histidinas o aspartatos, lo que sugiere que la coordinación con cationes divalentes es esencial para su actividad. Esto podría tener relación con la identificación en esta librería del transportador de cationes y con el operón relacionado con el cobre. El siguiente gen del operón, EF2412, codifica para una metaloendoribonucleasa específica de hebra simple implicada en el control de calidad tardío de la subunidad 70S del ribosoma y en la

maduración del extremo 3' del ARN ribosómico 16S. A continuación, codificada por el gen EF2411, hay una diacilglicerol kinasa. Codificado por el gen EF2410 está la proteína de unión a GTP Era, que es una GTPasa esencial que une GTP y GDP con un intercambio rápido de nucleótido. Esta proteína juega un papel importante en el procesamiento del ARN ribosómico 16S y en la biogénesis de la subunidad 30S. Posiblemente también está implicada en la regulación del ciclo celular y en el metabolismo de energía. Por último tenemos la proteína RecO, implicada en la reparación del ADN y en la vía RecF de la recombinación. Esta proteína juega un papel importante cuando hay un daño en el material genético y es la que parece tener una relación más directa con el sistema SOS.

Como ya se ha comentado, las proteínas RecFOR parecen tener un papel en la interacción de RecA y la hebra sencilla de ADN. Su papel parece ser el de desplazar de esta hebra a la proteína de unión a hebra simple SSB y una mutación en cualquiera de las proteínas del sistema RecFOR da lugar a un retraso en la activación del sistema SOS (Hegde *et al.*, 1996a; Hegde *et al.*, 1996b). Este retraso podría verse acompañado de una activación alterada del sistema SOS y que esto resulte en el mantenimiento de la resistencia a cefalosporinas. Hay que tener en cuenta que, de nuevo, se podría ver afectada la activación del sistema, como también podría ocurrir con una alteración en las proteínas SSB, una de las cuales presenta una caja Cop.

Otra opción es el sistema SOS actúe sobre estas proteínas y a través de su función se regule el determinante implicado en la resistencia a cefalosporinas. Es remarcable que los dos genes anteriores a PhoH, EF2415 y *rpsU*, forman un operón que se transcribe en la misma dirección que el operón que nos ocupa y que está bajo el control de una caja LexA, siendo parte del regulón SOS. Estos genes codifican para RpsU, la proteína ribosomal S21 de la subunidad 30S del ribosoma, y una proteína hipotética. La proteína S21 presenta una sobreexpresión en la cepa V583 LexA⁻ de 2,3 y la proteína hipotética de 2,7 (**Tabla 7**). Funcionalmente parece que ambos operones son importantes en la biogénesis del ribosoma. Es posible que el terminador del *rpsU*-EF2415 no sea muy fuerte y se cotranscriban con cierta frecuencia ambos, o que la alteración de ambos tenga un efecto similar en la resistencia a cefalosporinas. También es posible que el transposón ejerza un efecto polar en la transcripción de estos genes. En el estudio de la expresión génica, los genes que codifican para la proteína tipo Pho y para la proteína Era están sobreexpresados en el mutante V583 LexA⁻ (**Tabla 7**).

Unidad transcripcional EF0297-EF0299: Operón Cop

Mediante la mutagénesis aleatoria por transposición hemos identificado tres mutantes que permanecen resistentes a cefalosporinas en presencia de mitomicina C en los que el transposón se encuentra en el gen EF0297, que codifica para el

regulador transcripcional CopY. Este gen forma parte del operón Cop (**Figura 23**) y codifica para el represor transcripcional del mismo. En *E. hirae* *copY* codifica una proteína bipartita (Madiraju *et al.*, 1988). El extremo N-terminal presenta un 30% de identidad con represores de beta-lactamasas, por ejemplo, con MecI de *S. aureus* y es el que interacciona con el ADN, mientras que el extremo carboxilo terminal es el que une cobre o zinc y presenta múltiples residuos de cisteína. El operón en *E. faecalis* solo comprende tres genes que codifican para el represor CopY (EF0297), la bomba de extrusión de cobre CopA (EF0298) y la chaperona CopZ (EF0299). En nuestro caso, la transposición ha ocurrido en lugares relativamente próximos entre sí. Los mutantes por transposición presentan intacto un 32,7, un 45,2 y un 47,3% del gen. Hasta donde sabemos, este regulador transcripcional solo regula la expresión del propio operón que lo codifica. Como la región N-terminal se ha conservado en cierta medida, es posible que el efecto de la pérdida de la resistencia a cefalosporinas en presencia de mitomicina C se deba a un bloqueo en la transcripción si la fracción que queda tiene afinidad por el ADN.

Este efecto se puede deber a una alteración en la transcripción del operón o de otros genes regulados por el mismo o a las consecuencias de una alteración en la concentración intracelular de cobre. En el genoma de *E. faecalis* hay varias cajas Cop perfectas, algunas de las cuales se encuentran en regiones intergénicas. Hay una caja Cop delante de un gen que codifica para la SSB-2 (*Single Strand Binding*

protein, proteína de unión a hebra sencilla). La expresión del gen *ssb-1* está aumentada en el mutante LexA- según la transcriptómica. Si nuestros mutantes para CopY no dan una proteína que se pueda unir a las cajas Cop, la falta del regulador CopY puede fomentar una inducción constante de la proteína SSB-2, que podría competir por la unión al ADN de hebra sencilla con SSB-1. La homología entre ambas proteínas es del 55%, siendo la SSB-2 más corta, aunque los extremos amino y carboxilo terminal de ambas son homólogos (Paulsen *et al.*, 2003). En el caso de que esa fracción de proteína codificada por los genes truncados se pudiera unir a la caja presente en la región promotora del gen *ssb-2*, es posible que lo bloquee parcialmente y no permita que haya suficiente SSB-2 en la célula para que se induzca la respuesta SOS de manera fisiológica. Esto podría estar limitando la inducción del sistema SOS al no poderse formar correctamente el filamento de RecA, y no llegar a producir una inducción del sistema lo suficientemente alta como para que se transcriban los genes implicados en la reversión de la resistencia pero sí para lidiar con los daños en el ADN. Aún así, por su posición en el cromosoma, parece más relevante la SSB-1, codificada por el gen EF0008, que la SSB-2, codificada por EF0499, ya que la SSB-1 está más cerca del origen de replicación (Soler-Bistué *et al.*, 2015).

Otra de las cajas Cop está presente delante del gen EF0859, que codifica para un transportador de cationes metálicos divalentes inorgánicos

(hierro/cobre/zinc/cadmio), implicado en el metabolismo de transporte de iones. Es posible entonces que este gen participe en la homeostasis de los cationes divalentes en respuesta a la concentración intracelular de cobre.

Hay otra caja delante del operón que codifica para una recombinasa específica de sitio de la familia de las integrasas de fagos (EF2240) y una proteína hipotética (EF2241) (Paulsen *et al.*, 2003). La transcripción de estos dos genes se encuentra aumentada en 1,6 y 1,4 respectivamente en el mutante defectivo para la proteína LexA en la cepa V583 (**Tabla S1**). Dos recombinasas específicas de sitio de la familia de las integrasas de fagos forman parte del regulón SOS descrito en este trabajo. En un estudio transcriptómico realizado en presencia de eritromicina en *E. faecalis* V583 se encuentran aumentadas dos recombinasas de este tipo (codificadas por los genes EF2043 y EF1648). Es posible que estas integrasas jueguen un papel en la respuesta al estrés.

En cambio, si el fenotipo observado se debe a la ausencia del represor y a una expresión constitutiva de los genes del operón, en presencia de cobre se podría crear el mismo efecto, ya que el represor pierde afinidad por el ADN cuando está unido al cobre. Al realizar una serie de antibiogramas en presencia de cobre se observó una reversión de la resistencia a cefalosporinas. Existen evidencias de que el cobre produce daño en el material genético, ya sea directamente o a través de la reacción de Fenton (Solioz y Stoyanov, 2003). Este daño podría inducir el SOS y

por tanto dar lugar a una reversión de la resistencia mediante esta vía. La inducción de la cepa JH2-2 LexA^{ind} (**Figura 24**) sugiere por el contrario que el mecanismo de inducción de esta sensibilidad no está mediada directamente por la inducción del sistema SOS si no que en el sistema SOS hay componentes que se pueden alterar mediante el cobre de manera independiente de LexA y que pueden ser comunes a ambas vías o que el efecto del cobre se encuentra por debajo de la regulación de las proteínas RecA y LexA en el mecanismo de reversión de la resistencia. En presencia de cobre, la CMI de JH2-2 pasa de ser mayor de 256 µg/ml a 1 µg/ml (**Figura 24**). LA CMI para cefuroxima para JH2-2 y los mutantes por transposición en medio N es de 256 µg/ml. Al realizar E-test para cefuroxima en presencia de cobre a los mutantes por transposición, la mayoría, a pesar de disminuir su densidad cerca del E-test, llegan a crecer hasta una CMI de 256 µg/ml, incluidos los mutantes de cobre. Esto podría indicar que hay elementos comunes en la reversión de la resistencia que se observa en ambos sistemas, ya que en estos mutantes no se revierte la resistencia a cefalosporinas ni en presencia de mitomicina C ni en presencia de cobre, por lo que podría haber efectores comunes. Es curioso que el mutante para el gen que codifica para una proteína permeasa del transportador de glutamina (EF1118) que presenta el 14,9% del gen sí vea disminuida su CMI a 2 µg/ml mientras que el que presenta el 74,1% del gen mantiene su CMI a 256 µg/ml. Entre ambos mutantes hay aproximadamente 400 nucleótidos de diferencia en la inserción del transposón que los interrumpe. Es

posible que en uno de los casos, en el que hay más porción de gen intacto, no solo se transcriba sino que además sea capaz de suplir la falta de la otra permeasa. En presencia de mitomicina C no se ha realizado la CMI, pero el fenotipo mostrado por ambos mutantes mediante la técnica de difusión en disco era de 6 mm de diámetro en ambas condiciones (Se seleccionaron mutantes por transposición que presentaran este fenotipo). Deberíamos de realizar la CMI en presencia de mitomicina C y comprobar si el fenotipo de ambos mutantes es el mismo o no.

El mutante por transposición en el gen de la hidrolasa de la familia HD asociada a membrana (EF2413) es sumamente sensible a cefalosporinas, creciendo únicamente en la periferia de la placa (**Figura 25**). Esta disociación clara entre la inducción por la mitomicina C y por cobre puede indicar que los genes cuya transcripción está alterada por el transposón se corresponden únicamente con la vía de reversión de la resistencia del sistema SOS. Aún así, al ser su sensibilidad a cefalosporinas en presencia de cobre mayor que en la cepa silvestre en presencia de cobre, es posible que alguno de estos genes tengan también una función moduladora en la implicación del cobre en la reversión de la resistencia.

Para ver si era el regulador transcripcional CopY o los otros genes del operón los importantes en la reversión de la resistencia a cefalosporinas, se construyó un mutante de inserción en el gen EF0298, que teóricamente expresa el represor CopY pero no los otros dos genes del operón. Este mutante se induce con

mitomicina C al realizar la técnica del antibiograma (datos no mostrados), mientras que al realizar un E-test en presencia de cobre, no se induce como la cepa silvestre y llega a crecer con baja densidad a concentraciones mayores de 256 $\mu\text{g/ml}$ pero presenta menor densidad desde 64 $\mu\text{g/ml}$ (**Figura 24**). Así, el fenotipo de los mutantes de transposición, que presentan la proteína CopY truncada, es diferente en presencia de mitomicina C, ya que la resistencia no se revierte, a la que presenta el mutante de inserción en EF0298, con la proteína CopY intacta. Esto indica que es el represor el que media la reversión de la resistencia en presencia de la mitomicina C, mientras que la reversión de la resistencia en presencia de cobre implica la no expresión de los genes que codifican para CopA y CopZ. Aún así, convendría realizar E-test de ambos tipos de mutantes para tener referencias cuantitativas, y realizarlos además con diferentes concentraciones de mitomicina C y cobre, para comprobar que realmente el mecanismo es diferente (**Figura 26**).

Habría que hacer ensayos de movilidad electroforética para comprobar que el represor transcripcional CopY se une a las cajas Cop identificadas y también para comprobar si lo hace el fragmento de CopY producto del gen *copY* truncado por la inserción del transposón en los mutantes de la librería por transposición.

Como ya se ha comentado al principio de la discusión de esta sección, convendría validar la implicación de los determinantes genéticos identificados en

esta librería por transposición mediante la delección y la complementación de los mismos para descartar la implicación de un efecto polar y/o del gen de gentamicina que se transpone.

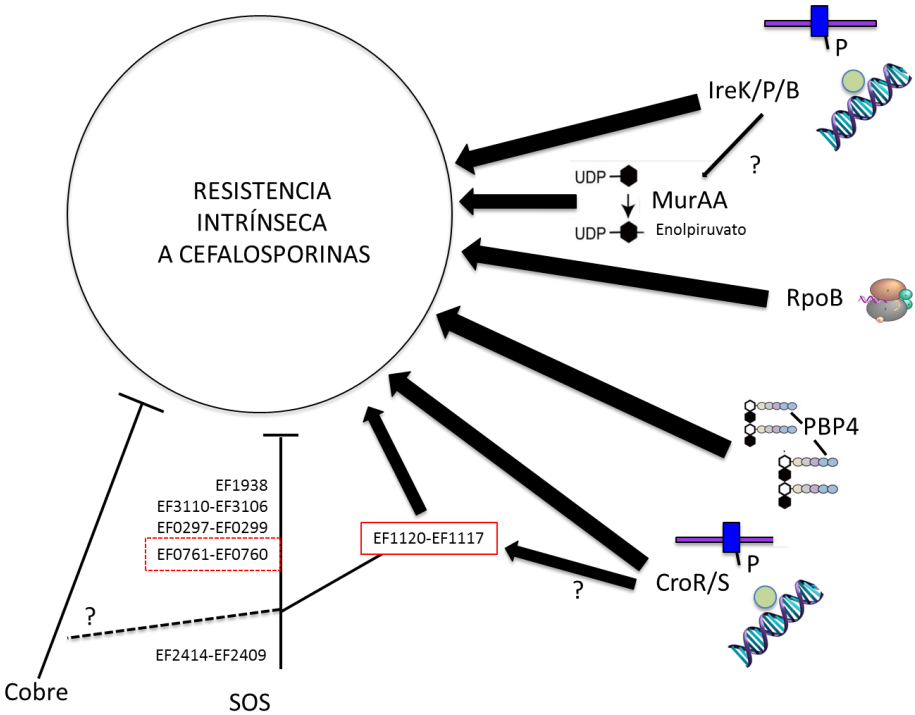


Figura 26: Factores implicados en la resistencia intrínseca a cefalosporinas y estímulos que la revierten. Las unidades de transcripción potencialmente importantes en esta reversión se muestran en la figura. Recuadrado en rojo con línea continua está el operón implicado en la captación de glutamina regulado por CroR/S y recuadrado en rojo con línea discontinua el operón implicado en la captación de glutamina regulado por el sistema SOS.

Visión integrada

Globalmente, hay ciertos patrones que se repiten en otros estudios y que relacionan diversos genes del regulón SOS que hemos identificado con la resistencia a diferentes antibióticos. En el perfil de la transcriptómica en presencia de eritromicina (Warnes y Keevil, 2011), el gen *mutY* y *recX* presentan alterada su transcripción. Estos dos genes forman parte del regulón SOS que hemos identificado. También está alterada la transcripción de la subunidad ϵ de la polimerasa III, necesaria para la activación del sistema SOS mediado por quinolonas. En presencia de eritromicina se encuentran alteradas una serie de proteínas ribosomales. El ribosoma o la maduración de sus componentes podría jugar un papel en la fidelidad de la traducción o favorecer la traducción de unos ARN mensajeros más que la de otros. Uno de nuestros mutantes por transposición podría tener alterada la expresión de genes importantes en la maduración del ribosoma (**Figura 23**). En la respuesta a eritromicina de *E. faecalis* V583 la expresión de dos recombinasas específicas de sitio se encuentran alteradas, y en el regulón SOS identificado (**Tabla 7**) encontramos dos genes que codifican para recombinasas de este tipo y además otra recombinasa presenta una caja Cop.

En el ensayo realizado por Suzuki y colaboradores (Suzuki *et al.*, 2014), en el caso de las cepas de *E. coli* resistentes a diferentes beta-lactámicos se observan

mutaciones en las proteínas ribosomales, en un gen de un transportador de glutatión y en un péptido regulador de PhoPQ. El gen *opp* se encuentra sobreexpresado en presencia de cefalosporinas, trimetoprim y quinolonas.

En este mismo artículo se utiliza la expresión de la proteína Opp como factor de predicción de la resistencia a antibióticos. Este transportador podría detectar si la pared celular está dañada (Perego *et al.*, 1991). El sistema CroR/S puede detectar daño en la pared. De hecho, el estrés oxidativo causado por H₂O₂ aumenta la resistencia a cefalosporinas a través de este sistema (Aakra *et al.*, 2005). CroR/S está implicado en la resistencia intrínseca a cefalosporinas pero no se sabe el efector (Comenge *et al.*, 2003). Y este sistema de dos componentes regula, además de a sí mismo y la expresión de *salB*, la expresión de un transportador de glutamina (Le Breton *et al.*, 2007). En este operón regulado por CroR/S (EF1120-EF1117) hemos encontrado dos transposones que se han insertado en el gen EF1118. Estos dos mutantes no se inducen en presencia de mitomicina C. Además, otro mutante por transposición tiene interrumpido otro operón implicado en el transporte de glutamina (EF0761-EF0760) en el que la proteína permeasa de este transportador ABC está fusionada con la proteína de unión a aminoácidos. Este operón forma parte del sistema SOS y está ligeramente sobreexpresado en el mutante V583 LexA⁻, aunque esto puede deberse a que se transcribe de manera divergente al operón *uvrB-uvrA*, genes clásicos del regulón SOS.

Es posible que el modo de activación del sistema SOS tenga una influencia en la sensibilidad a cefalosporinas, ya que en un mutante obtenido por transposición aleatoria está afectado el gen que codifica para RecO, con un papel en la formación del nucleofilamento de RecA, y la transcripción de alguna SSB puede estar afectada debido a que *ssb-2* presenta una caja Cop.

El operón Cop, de alguna manera que aun no podemos decir, está implicado en la resistencia a cefalosporinas, ya sea mediante el efecto biológico desencadenado por una concentración de cobre determinada o por el represor transcripcional del operón. Está descrito que niveles de cobre de 0,5mM de CuSO₄ activan el módulo de genes implicados en el daño en el material genético y regulados por LexA y también genes implicados en la respuesta al estrés y en la homeostasis a metales (regulón Fur). En este artículo se puntualiza que esta inducción de la respuesta SOS podría ser indicativa de que el exceso de cobre conlleva la presencia de daños por estrés oxidativo (Djorić y Kristich, 2015). Además hay un mutante por transposición en un transportador de cationes y otro en un operón con una proteína con un dominio HD (**Figura 23**). Estos dominios se coordinan con cationes divalentes.

Hay otra proteína, CutC, que se induce tardíamente tras la exposición al cobre y que puede modificar el contenido intracelular del mismo en *E. faecalis* (Latorre

et al., 2014). Es posible que esto permita a los mutantes de inserción en *copY* ser viables en presencia de cobre en el medio.

En un estudio llevado a cabo por Coelho y colaboradores vieron que en presencia de 0,05 mM de cobre se alteraba la transcripción del operón *dlt* y EF0559, implicados en la biosíntesis de la pared celular. En presencia de esa concentración de cobre el operón Cop era el operón más fuertemente inducido (Latorre *et al.*, 2011). El gen *KatA*, que codifica para una catalasa peroxidasa, también presentaba su transcripción alterada, lo que une una alta concentración de cobre con el estrés oxidativo. En este estudio también estudiaron la respuesta transcripcional frente a zinc, y en presencia de 4mM de $ZnCO_4$ había una inducción de los genes *glnA* (que codifica para la proteína glutamina sintetasa) y *glnR* (que codifica para una proteína reguladora) (Abrantes *et al.*, 2011). Habría que estudiar con más profundidad la relación de los cationes divalente con el metabolismo de la glutamina.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo primero: Caracterización de la relación entre la respuesta SOS y la resistencia a antibióticos en *Enterococcus faecalis*

Cepas y medios de cultivo, químicos, aditivos y antibióticos

Las cepas utilizadas en este trabajo se detallan en las **Tablas 16, 17 y 18.**

Cepa	Nombre abreviado	Características destacables	Fuente o referencia
VE14188	VE14188	GM1674repA. GM1674 (<i>dam' dcm' repA'</i>) repA de TG1repA	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
VE14192	VE14192	GM1674repA. GM1674 (<i>dam' dcm' repA'</i>) + pVE14218	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
XL1-Blue		Cepa supercompetente. QuickChange® <i>Site-Directed Mutagenesis</i>	Kit QuickChange®
TOP10		Cepa aportada por el kit TOPO TA-cloning®	Kit TOPO TA-cloning®
MG1656	MG1656	Cepa LacZ' derivada de MG1655	Guerin <i>et al.</i> , 2011
MG1656ΔrecA	MG1656RecA'	MG1656 ΔrecA	Guerin <i>et al.</i> , 2011
MG1656ΔsulΔlexA	MG1657LexA'	MG1656 ΔsulA ΔlexA	Guerin <i>et al.</i> , 2011
<i>Vibrio cholerae</i>			
N16961		ΔlacZ	
<i>P. aeruginosa</i>			
PAO 1			Cirz <i>et al.</i> , 2006
<i>L. monocytogenes</i>			
EGD-e			Doumith <i>et al.</i> , 2004
<i>L. ivanovii</i>			
ATCC 19119		<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC19119
<i>S. aureus</i>			
MRSA COL		<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> COL, resistente a meticilina	Shafer y Iandolo, 1979
<i>S. pneumoniae</i>			
R6			Hoskins <i>et al.</i> , 2001
<i>K. pneumoniae</i>			
ATCC 10031		<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>R. equi</i>			
RECC			

Tabla 16: Cepas utilizadas en el capítulo 1. Se detallan la especie, el nombre abreviado, las características principales y la referencia o fuente (Paulsen *et al.*, 2003; Pietta *et al.*, 2014; van Schaik *et al.*, 2010).

Cepa	Nombre abreviado	Características destacables	Fuente o referencia
<i>E. faecalis</i>			
VE14002	V583	Aislado clínico resistente a vancomicina	Sham <i>et al.</i> , 1989
VE14089	V583 WT	Aislado clínico resistente a vancomicina curado de sus plásmidos	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
VE14412		V583 WT + pG+host3	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
VE14089 LexA ⁻	V583 LexA ⁻	V583 WT con <i>lexA</i> interrumpido: Sistema SOS constitutivamente inducido	Este trabajo
VE14089 RecA ⁻	V583 RecA ⁻	V583 WT con <i>recA</i> interrumpido: Sistema SOS no inducible	Este trabajo
VE14089 LexA ^{Ind}	V583 LexA ^{Ind}	V583 WT con LexA no catalizable: Sistema SOS no inducible	Este trabajo
VE14089 LexA ^{-comp}	V583 LexA ^{-comp}	V583 LexA ⁻ en la que se ha eliminado el plásmido	Este trabajo
JH2-2	JH2-2	Cepa resistente a rifampicina y a ácido fusídico	Jacob y Hobbs, 1974
JH2-2 LexA ⁻	JH2-2 LexA ⁻	JH2-2 con <i>lexA</i> interrumpido: Sistema SOS constitutivamente inducido	Este trabajo
JH2-2 RecA ⁻	JH2-2 RecA ⁻	JH2-2 con <i>recA</i> interrumpido: Sistema SOS no inducible	Este trabajo
JH2-2 LexA ^{Ind}	JH2-2 LexA ^{Ind}	JH2-2 con LexA no catalizable: Sistema SOS no inducible	Este trabajo
JH2-2 LexA ^{-comp}	JH2-2 LexA ^{-comp}	JH2-2 LexA ⁻ en la que se ha eliminado el plásmido	Este trabajo
E0740	S1	Aislado clínico	Rob Willem
E1188	S2	Aislado clínico	Rob Willem
E1818	S3	Aislado clínico	Rob Willem
E1819	S4	Aislado clínico	Rob Willem
E1820	S5	Aislado clínico	Rob Willem
E1822	S6	Aislado clínico	Rob Willem
E1823	S7	Aislado clínico	Rob Willem
E1825	S8	Aislado clínico	Rob Willem
E1826	S9	Aislado clínico	Rob Willem
E1828	S10	Aislado clínico	Rob Willem
E1831	S11	Aislado clínico	Rob Willem
E1833	S12	Aislado clínico	Rob Willem
E1835	S13	Aislado clínico	Rob Willem
E1836	S14	Aislado clínico	Rob Willem
E1837	S15	Aislado clínico	Rob Willem
E1838	S16	Aislado clínico	Rob Willem
E1840	S17	Aislado clínico	Rob Willem
E1940	S18	Aislado clínico	Rob Willem
E1955	S19	Aislado clínico	Rob Willem
E1956	S20	Aislado clínico	Rob Willem
E1965	S21	Aislado clínico	Rob Willem
E1968	S22	Aislado clínico	Rob Willem
E3446	S23	Aislado clínico	Rob Willem
E3450	S24	Aislado clínico	Rob Willem
E3453	S25	Aislado clínico	Rob Willem
E3725	S26	Aislado clínico	Rob Willem
E4074	S27	Aislado clínico	Rob Willem
E4080	S28	Aislado clínico	Rob Willem
E4246	S29	Aislado clínico	Rob Willem
E4249	S30	Aislado clínico	Rob Willem
E4250	S31	Aislado clínico	Rob Willem
E4267	S33	Aislado clínico	Rob Willem
E4269	S34	Aislado clínico	Rob Willem
E4281	S35	Aislado clínico	Rob Willem
E4284	S36	Aislado clínico	Rob Willem
E7133	S37	Aislado clínico	Rob Willem
E7136	S38	Aislado clínico	Rob Willem
E7140	S39	Aislado clínico	Rob Willem
E7143	S40	Aislado clínico	Rob Willem

Tabla 17: Cepas utilizadas en el capítulo 1. Se detallan la especie, el nombre abreviado, las características principales y la referencia o fuente. (Cirz *et al.*, 2006; Doumith *et al.*, 2004; Guérin *et al.*, 2011; Hoskins *et al.*, 2001; Rigottier-Gois *et al.*, 2011; Shafer y Iandolo, 1979).

Cepa	Nombre abreviado	Características destacables	Fuente o referencia
<i>E. faecium</i>			
Aus0004 (E7345)	M1	Aislado clínico	Rob Willem
C68 (E2480)	M2	Aislado clínico	Rob Willem
E0155	M3	Aislado clínico	Rob Willem
E0333	M4	Aislado clínico	Rob Willem
E0980	M5	Aislado clínico	Rob Willem
E1007	M6	Aislado clínico	Rob Willem
E1162	M7	Aislado clínico	Rob Willem
E1172	M8	Aislado clínico	Rob Willem
E1321	M9	Aislado clínico	Rob Willem
E1392	M10	Aislado clínico	Rob Willem
E1421	M11	Aislado clínico	Rob Willem
E1435	M12	Aislado clínico	Rob Willem
E1488	M13	Aislado clínico	Rob Willem
E1590	M14	Aislado clínico	Rob Willem
E1604	M15	Aislado clínico	Rob Willem
E1613	M16	Aislado clínico	Rob Willem
E1644	M17	Aislado clínico	Rob Willem
E1669	M18	Aislado clínico	Rob Willem
E1677	M19	Aislado clínico	Rob Willem
E1717	M20	Aislado clínico	Rob Willem
E1721	M21	Aislado clínico	Rob Willem
E1731	M22	Aislado clínico	Rob Willem
E1760	M23	Aislado clínico	Rob Willem
E1861	M24	Aislado clínico	Rob Willem
E1972	M25	Aislado clínico	Rob Willem
E2039	M26	Aislado clínico	Rob Willem
E2297	M27	Aislado clínico	Rob Willem
E2369	M28	Aislado clínico	Rob Willem
E2560	M29	Aislado clínico	Rob Willem
E2620	M30	Aislado clínico	Rob Willem
E2883	M31	Aislado clínico	Rob Willem
E3083	M32	Aislado clínico	Rob Willem
E3548	M33	Aislado clínico	Rob Willem
E6012	M34	Aislado clínico	Rob Willem
E6045	M35	Aislado clínico	Rob Willem
E7273	M36	Aislado clínico	Rob Willem
E7392	M37	Aislado clínico	Rob Willem
E7486	M38	Aislado clínico	Rob Willem
E7611	M39	Aislado clínico	Rob Willem
U0317(E7442)	M40	Aislado clínico	Rob Willem
CECT410T		Cepa tipo	CECT
CM54		Aislado clínico de la India	Este trabajo
CM80		Aislado clínico de la India	Este trabajo

Tabla 18: Cepas utilizadas en el capítulo 1. Se detallan la especie, el nombre abreviado, las características principales y la referencia o fuente.

Los medios de cultivo utilizados se obtuvieron de Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) y BioMérieux (Biomérieux, Francia). Los químicos,

los aditivos y los antibióticos utilizados son de Merck (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania), Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., San Luis, Co) y Biomérieux (Biomérieux, Francia). La ceftriaxona inyectable (Rocefallin[®]) se adquirió en Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza).

Los medios de cultivos utilizados fueron BHI, MH y agar sangre. El agar sangre cuando debía contener algún aditivo se preparó con sangre defibrinada de caballo (Thermo Fisher Scientific Inc., NYSE: TMO) y las bacterias se cultivaron a 37°C o a 28°C en el caso de bacterias portadoras de plásmidos termosensibles. *Streptococcus pneumoniae* se cultivó en condiciones de microaerofilia mediante el método de la vela.

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad a antimicrobianos se llevó a cabo por el método de difusión por disco y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron por microdilución o por E-Test (prueba de epsilometría) (BioMérieux, Francia) siguiendo las guías de CLSI. En algunos casos se utilizó BHI en los ensayos de susceptibilidad para facilitar la lectura de los resultados.

La inducción de la susceptibilidad se ensayó utilizando mitomicina C, levofloxacin, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, flumequina, norfloxacina, enrofloxacin, moxifloxacina, novobiocina, ampicilina y trimetoprim a diferentes concentraciones para encontrar la concentración de inducción adecuada. A fin de estudiar el perfil de antibiorresistencia en presencia de mitomicina C para V583 se utilizó en las placas una concentración de 0,05 µg/ml y de 0,02 µg/ml para JH2-2.

Se ensayó la reversión de la resistencia a cefalosporinas en diferentes especies bacterianas: *L. ivanovii*, *L. monocitogenes*, *E. faecium*, *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Rhodococcus equi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, y *E. coli* MG1656, MG1656Δ*recA* y MG1656 Δ*lexA*.

Análisis y manipulación del ADN

Los oligonucleótidos y plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en las **Tablas 19** y **20** respectivamente. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se adquirieron en Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza). Las PCRs se realizaron con la enzima polimerasa *Phusion polymerase* (Finnzymes, Woburn, MA). La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo con el kit *Qiagen PCR purification Kit*[®] (Qiagen, Inc., Chatworth, California, USA) o el kit *Gel extraction Kit* de Qiagen[®] (Qiagen, Inc., Chatworth, California, USA). La secuenciación automática se llevó a cabo en Secugen, S. L. (Madrid, España). El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa 4Peaks 1.6 (Mek&Tosj,

Gen/Región	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Origen	Posición	Número de acceso en	
					GenBank	Fuente
<i>lexA</i>	lexAF	ACCAACCTGCAGAACTTTACCTAAAATTGT ACAGAAGATATCACAAAGACAATTAGAAGT	Genoma V583	1531735-1531758	NC_004668.1	Este trabajo
	lexAR	A	Genoma V583	1532298-1532322	NC_004668.1	Este trabajo
	lexA2F	GAATACCTGCAGCGTTAATCATACTTT	Genoma V583	1531932-1531955	NC_004668.1	Este trabajo
	lexA2R	AAACAAGATATCAATTAGAAAGTACTTA	Genoma V583	1532295-1532318	NC_004668.1	Este trabajo
	lexAext	GAATTGGTTAATGAAAATA	Genoma V583	3044939-3044954	NC_004668.1	Este trabajo
	lexAindF	CGCTAAAATTGGTTCTCAGCAGTTACGAC	Genoma V583	1532041-1532070	NC_004668.1	Este trabajo
	lexAindR	GTCGTAAGTCTGAGGAACCAATTTAGCG	Genoma V583	1532041-1532070	NC_004668.1	Este trabajo
<i>recA</i>	recA2F	ACGTAGCTGCAGTTGAGACATTAGTCG	Genoma V583	3044990-3045016	NC_004668.1	Este trabajo
	recA2R	CGCACTGAATTCAAAATGAAAAGAA	Genoma V583	3045450-3045476	NC_004668.1	Este trabajo
	recAext	CATTGCGATTACGATGTGCG	Genoma V583	1531864-1531883	NC_004668.1	Este trabajo
Sitio de clonaje M13F	GTAAACGACGGCCAG	pCR 2.1-TOPO			Oligonucleótido universal	
Sitio de clonaje M13R	CAGGAAACAGCTATGAC CGGCGATCGACTAAACAATTGAACACGG	pCR 2.1-TOPO			Oligonucleótido universal	
Sitio de clonaje OEF102	C	pVE14218			Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011	
Sitio de clonaje OEF106	TGATGAAACGGCACGGATAG	pVE14218			Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011	

Tabla 19: Oligonucleótidos utilizados en el capítulo 1. Se detallan el gen, la secuencia, el origen de dicho gen, su posición en el caso del genoma de *E. faecalis* V583 con el número de acceso al mismo y la fuente (Jacob y Hobbs, 1974; Rigottier-Gois *et al.*, 2011; Sahm *et al.*, 1989).

Plásmido	Características	Fuente
pG+host3	Plásmido termosensible. Resistencia a cloramfenicol. RepA ^{ts} , Cat	Law <i>et al.</i> , 1995
pVE14218	Vector de clonaje. Resistencia a tetraciclina. Ori ⁺ , RepA ⁻ , TetM	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
pCR 2.1-TOPO	Vector de clonaje	Invitrogen

Tabla 20: Plásmidos utilizados en el capítulo 1. Se detallan las características principales y la fuente. RepA^{ts}, proteína RepA termosensible que permite la replicación del plásmido a 28°C pero no a temperaturas mayores. Cat, proteína codificada por el plásmido que confiere resistencia a cloranfenicol. TetM, otorga resistencia a tetraciclina. (Paulsen *et al.*, 2003; Rigottier-Gois *et al.*, 2011).

Netherlands) y las herramientas de análisis en línea del *National Institutes of Health* (NIH) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Las enzimas de restricción y la ligasa T4 se adquirieron en Takara (Takara Bio INC., Shiga, Japón) y en New England BioLabs (New England BioLabs Inc, Ipswich, Massachusetts).

Construcción de los mutantes del sistema SOS

Para la construcción de los mutantes de inserción dirigidos en el cromosoma mediante recombinación homóloga se utilizó un sistema basado en la replicación condicional de dos plásmidos (Law *et al.*, 1995). El plásmido pVE14218, RepA⁻ es un vector de clonaje en el que se van a clonar 500pb de la región interna del gen a inactivar. El plásmido pG+host3 es un plásmido termosensible que a una temperatura permisiva le va a aportar al plásmido pVE14218 la proteína RepA, necesaria para la replicación del mismo. Los plásmidos derivados de pVE14218 se integraron en el *locus* elegido tal y como se describe en el artículo de Rigottier-Gois y colaboradores (Abrantes *et al.*, 2011). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región interna de los genes *lexA* y *recA* fueron respectivamente *lexA2F/lexA2R* y *recA2F/recA2R*. Los mutantes se comprobaron por *Southern blot* utilizando el kit *DIG DNA labeling y Detection*[®] Kit (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza) y/o mediante PCR y secuenciación utilizando los oligonucleótidos OEF106 y *lexAext* o *recAext*.

Las cepas LexA^{-comp} se consiguieron mediante pases en BHI líquido sin presión antibiótica de las cepas LexA⁻. La pérdida del plásmido mediante una segunda recombinación homóloga y la reconstitución de los alelos silvestres de los genes se comprobó mediante la pérdida de la resistencia a tetraciclina y PCR con los oligonucleótidos LexAF y LexAR.

La construcción de los mutantes LexA^{ind-} se realizó amplificando el gen con los oligonucleótidos LexAF (con la diana de restricción para PstI) y LexAR (con la diana de restricción para EcoRV). El producto de PCR se digirió con las enzimas correspondientes y se siguieron las instrucciones del fabricante. La digestión se ligó en el vector pCRTM 2.1-TOPO[®] utilizando el kit de Invitrogen TOPO TAcloning[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para la mutagénesis dirigida se emplearon los oligonucleótidos LexAindF/R y el kit de Stratagene *Site-directed mutagenesis*[®] (Agilent Technologies Inc., California). La mutagénesis del gen *lexA* crea una diana de restricción para *BbvCI* y una sustitución G96E en la proteína. La mutación puntual se comprobó por PCR mediante los oligonucleótidos M13F/M13R. De esta construcción se obtuvo un fragmento *EcoRV-PstI* que se clonó en pVE14218, y se procedió como en la construcción de los mutantes de inserción. Mediante pases en BHI sin presión antibiótica, se consiguió la pérdida del plásmido en el cromosoma y se comprobó la presencia de la mutación en el gen por digestión con *BbvCI* y por PCR.

Inducción de cepas clínicas en placas de gradiente

Se realizó la estimación orientativa de la CMI en placa de cefotaxima (placas de 4; 16; 64; 128 y 264 $\mu\text{g/ml}$) y mitomicina C (0,025; 0,05; 0,1 y 0,2 $\mu\text{g/ml}$). Las placas utilizadas fueron de BHI agar. Se prepararon soluciones 0,5 Mcfarland de cada cepa, se diluyeron 1/10 y se inocularon 10 μg de esta solución bacteriana en las placas. Se incubaron 16-24h a 37°C en condiciones de aerobiosis. Se consideró crecimiento cualquier evidencia del mismo.

Para probar la inducción de la susceptibilidad a las cefalosporinas en las que hemos observado la reversión de la resistencia se tomo como indicador la ceftriaxona y se realizaron placas de gradiente. Se prepararon inóculos bacterianos de 0,5 McFarland de las cepas. Se empapó un hisopo en las soluciones McFarland y se extendió, pasándolo dos veces, a lo largo de la placa formando una línea por cepa. Se sembraron en placas de gradiente de BHI con mitomicina C en la capa inferior (como control) y en placas con mitomicina C y cefotaxima en la capa inferior y cefotaxima en la capa superior. Las concentraciones de mitomicina C utilizadas fueron de 0,05; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1 y 0,15 $\mu\text{g/ml}$, partiendo de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y adaptando la concentración según los resultados observados, y de cefotaxima fue de 64 $\mu\text{g/ml}$. Se incubaron 16-24h a 37°C en condiciones de aerobiosis. En todas las placas se sembraron las cepas de *E. faecalis* V583 y JH2-2 como controles.

Ensayos en ratones

Las cepas utilizadas para realizar los ensayos *in vivo* en ratones fueron *E. faecalis* V583 WT, V583 LexA⁻, JH2-2 y JH2-2 LexA⁻. Se emplearon ratones BALB/c hembra de 3 semanas de edad y con un peso comprendido entre los 15 y 20 gramos. Los grupos de ratones eran de entre 10 y 5 individuos. Los ratones fueron inoculados en la vena lateral caudal de la cola con 10⁸ UFC de la bacteria correspondiente. Se llevó a cabo el sacrificio humanitario con CO₂. Los ratones recibieron el tratamiento correspondiente cada 8h por vía intraperitoneal. Tras su sacrificio se extrajeron el corazón, el bazo, el hígado y los riñones. Se introdujo cada órgano o par de órganos en una bolsa de Stomacher[®] (Seward Ltd, Reino Unido), se añadieron 5 ml de fosfato tampón salino (PBS) y se homogenizaron en un Stomacher[®] (Seward Ltd, Reino Unido). Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de este homogeneizado y se sembraron en placas de BHI para averiguar el número de UFC. Se replicaron 100 colonias de las cepas LexA⁻ de cada experimento en placas con 10 µg/ml de tetraciclina para comprobar que no se había perdido el plásmido. Los tratamientos antibióticos fueron de 200 mg/kg de ceftriaxona, 30 mg/kg de levofloxacin, 200 mg/kg de ceftriaxona y 30 mg/kg de levofloxacin o solución salina, todo ello administrados intraperitonealmente en un volumen de 200 µl. Los datos son el conjunto de los datos de 6 experimentos diferentes. El número total de ratones por tipo de tratamiento y un esquema del protocolo seguido se detallan en la **Figura 27** y en la **Tabla 21**.

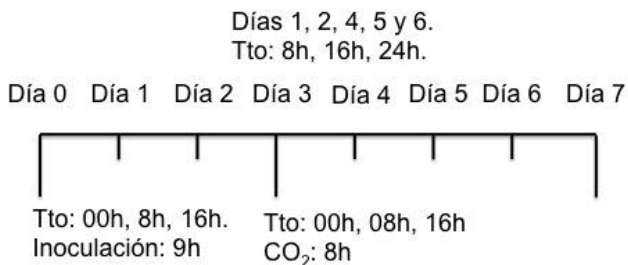


Figura 27: Esquema del tratamiento seguido. El tratamiento de los ratones comienza la noche previa a la inoculación de los mismos a las 9h del día siguiente y va a ser administrado cada 8h hasta el día del sacrificio de los ratones, ya que se sacrifican a las 8h y antes del sacrificio no se les trata.

Cepa	JH2-2	JH2-2	JH2-2 LexA-	JH2-2 LexA-	JH2-2	JH2-2
Tratamiento	SS	CRO	SS	CRO	LEV	LEV+CRO
Número	32	30	20	19	11	16

Tabla 21: Cepa inoculada, tratamiento administrado y número de individuos en cada grupo. SS, solución salina; CRO, ceftriaxona 200 mg/kg; LEV, levofloxacina 30 mg/kg.

El análisis estadístico de los datos se realizó aplicando el test de medianas de Mood con dos colas, test apropiado para ver la igualdad de medianas en dos o más poblaciones que no asume una distribución concreta de los datos, utilizando el programa IBM SPSS (IBM, NYSE IBM, California, EEUU).

Capítulo segundo: Estudio del regulón SOS y de los determinantes de resistencia a cefalosporinas

Cepas y medios de cultivo, químicos, aditivos y antibióticos

Las cepas utilizadas se encuentran en la **Tabla 22**. Los medios de cultivo utilizados se obtuvieron de Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) y BioMérieux (Biomérieux, Francia). Los químicos, los aditivos y los antibióticos (incluidos discos y E-Test[®]) utilizados son de Merck (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania), Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., San Luis, Co), Panreac (PanReac Química S.L.U., España), Pronadisa (Laboratorios Conda S. A., España) y Biomérieux (Biomérieux, Francia).

Los medios de cultivo utilizados fueron BHI y medio N (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% Na_2HPO_4 y 1% glucosa) (Wunderli-Ye y Solioz, 1999). Las bacterias se cultivaron a 37°C o a 28°C en el caso de bacterias portadoras de plásmidos termosensibles.

Cepa	Nombre abreviado	Características destacables	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>			
VE14188	VE14188	GM1674 <i>repA</i> . GM1674 (<i>dam⁻ dcm⁻ repA⁺</i>) <i>repA</i> de TG1 <i>repA</i>	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
VE14192	VE14192	GM1674 <i>repA</i> . GM1674 (<i>dam⁻ dcm⁻ repA⁺</i>) + pVE14218	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
DH5 α		Cepa utilizada para la amplificación de construcciones genéticas	FOCUS (1986) 8:2. 9.
DH5 α pZXL5		DH5 α receptora del plásmido pZXL5 (ver tabla de plásmidos)	Este trabajo
<i>E. faecalis</i>			
VE14002	V583	Aislado clínico resistente a vancomicina	Sham <i>et al.</i> , 1989
VE14089	V583 WT	Aislado clínico resistente a vancomicina curado de sus plásmidos	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
VE14412		V583 WT + pG+host3	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
VE14089 LexA ⁻	V583 LexA ⁻	V583 WT con <i>lexA</i> interrumpido: Sistema SOS constitutivamente inducido	Este trabajo
VE14089 RecA ⁻	V583 RecA ⁻	V583 WT con <i>recA</i> interrumpido: Sistema SOS no inducible	Este trabajo
VE14089 LexA ^{Ind}	V583 LexA ^{Ind}	V583 WT con LexA no catalizable: Sistema SOS no inducible	Este trabajo
VE14089 LexA ^{comp}	V583 LexA ^{-comp}		
VE18590	pp-	VE14089 sin los profagos pp1, pp2, pp3, pp4, pp5, pp6 y pp7	
JH2-2	JH2-2	Cepa resistente a rifampicina y a ácido fusídico	Jacob y Hobbs, 1974
JH2-2 LexA ⁻	JH2-2 LexA ⁻	JH2-2 con <i>lexA</i> interrumpido: Sistema SOS constitutivamente inducido	
JH2-2 RecA ⁻	JH2-2 RecA ⁻	JH2-2 con <i>recA</i> interrumpido: Sistema SOS no inducible	
JH2-2 LexA ^{Ind}	JH2-2 LexA ^{Ind}	JH2-2 con LexA no catalizable: Sistema SOS no inducible	
JH2-2 EF0297P		JH2-2. EF0298 interrumpido. El operón <i>cop</i> solo expresa <i>copY</i>	Este trabajo
<i>E. faecium</i>			
CECT410T		Cepa tipo	CECT
CM54		Aislado clínico de la India	Este trabajo
CM80		Aislado clínico de la India	Este trabajo

Tabla 22: Cepas utilizadas en el capítulo 2. Se detallan la especie, el nombre abreviado, las características principales y la referencia o fuente (Law *et al.*, 1995; Rigottier-Gois *et al.*, 2011).

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad a antimicrobianos se llevó a cabo por el método de difusión de disco o por E-test® siguiendo las guías de CLSI (*Clinical y Laboratory Standards Institute*) utilizando como medio BHI o medio N.

La inducción de la susceptibilidad se ensayó utilizando mitomicina C. Para V583 se utilizó en las placas una concentración de 0,05 mg/ml y de 0,02 mg/ml para JH2-2. Se utilizó Cu_2SO_4 para la realización de ensayos de susceptibilidad utilizando como medio el medio N (Rigottier-Gois *et al.*, 2011) o BHI (*Brain Heart Infusion*). Las diferentes concentraciones que se utilizaron se detallan en cada apartado. Se realizaron antibiogramas en BHI con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fosfomicina.

Construcción de los mutantes dirigidos por integración por recombinación homóloga

Se construyeron mutantes de inserción para los genes EF1561, EF1562 (que codifican enzimas que participan en la ruta del shikimato y son genes *aro* pertenecientes al mismo operón), EF1080 (que codifica para una proteína implicada en la síntesis de translesión y que el mutante V583LexA⁻ sobreexpresa respecto a la cepa silvestre) y EF0298 (gen *copA*, segundo gen del operón *cop*) (Wunderli-Ye y Solioz, 1999) mediante un procedimiento de mutagénesis dirigida (Paulsen *et al.*, 2003). Se clona un fragmento interno del gen que se desea interrumpir en un plásmido repA⁻ que porta un gen de resistencia a tetraciclina (pVE14218). Para amplificar el fragmento interno del gen a clonar se empleó la pareja de oligonucleótidos F/R correspondiente a cada gen (**Tabla 24**). La comprobación del clonaje se hizo con la pareja de oligonucleótidos OEF102 y OEF106 (**Tabla 24**). La proteína RepA la va a aportar un plásmido termosensible

que porta un gen de resistencia a cloranfenicol (pG+host3) (**Tabla 24**). Se aplica un choque térmico de 42 °C de manera que el plásmido termosensible se pierde y se seleccionan los integrantes en placas con tetraciclina. La comprobación de los mutantes de integración se realizó mediante PCR con el oligonucleótido ext, F o R de cada gen y uno de los oligonucleótidos del plásmido.

Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Tanto los plásmidos y como los oligonucleótidos utilizados en la realización de este trabajo se detallan en las **Tablas 23** y **24** respectivamente.

Plásmido	Características	Fuente
pG+host3	Plásmido termosensible. Resistencia a cloramfenicol. RepA ^{ts} , Cat	Law <i>et al.</i> , 1995
pVE14218	Vector de clonaje. Resistencia a tetraciclina. Ori ⁺ , RepA ⁺ , TetM	Rigottier-Gois <i>et al.</i> , 2011
pZXL5	Plásmido termosensible. Porta un transposón y un gen <i>cat</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2012

Tabla 23: Plásmidos utilizados en el capítulo 2. Se detallan las características principales y la fuente. RepA^{ts}, proteína RepA termosensible que permite la replicación del plásmido a 28°C pero no a temperaturas mayores. *cat* y Cat, gen y proteína respectivamente que confieren resistencia a cloranfenicol. TetM, otorga resistencia a tetraciclina (Focus, 1986; Jacob y Hobbs, 1974; Rigottier-Gois *et al.*, 2011; Sahm *et al.*, 1989)).

Análisis y manipulación del ADN

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se adquirieron en Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suiza). Las PCRs se realizaron con la enzima polimerasa *Phusion polymerase* (Finnzymes, Woburn, MA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo con el kit

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Origen	Posición	Número de acceso en GenBank	Fuente
<i>aroE</i>	EF1561F	AATAACTGCAGCCACTCGTTTAGC	Genoma V583	1513424-1513447	NC_004668.1	Este trabajo
	EF1561R	GTTCTGTTCAAGTGAATTCGCCAGT	Genoma V583	1513919-1513942	NC_004668.1	Este trabajo
	EF1561Rext	CAGCAACATCTTTTGTCTAG	Genoma V587	1513986-1514004	NC_004668.1	Este trabajo
EF1562	EF1562F	CCGAAAAGCAACTGCAGCAAGTCA	Genoma V584	1514347-1514370	NC_004668.1	Este trabajo
	EF1562R	GTTCTGAATTCGCTCATCCATCA	Genoma V585	1514812-1514835	NC_004668.1	Este trabajo
	EF1562Rext	GCGCACGATTTGTAAAATG	Genoma V586	1514855-1514874	NC_004668.1	Este trabajo
EF1080	EF1080F	ACGCTACTGCAGAATGCGCAG	Genoma V584	1050282-1050302	NC_004668.1	Este trabajo
	EF1080R	TCAAAGAATTCACATGCCAGA	Genoma V585	1050789-1050809	NC_004668.1	Este trabajo
	EF1080dext	CCATCATGCCAAATGTTTCTT	Genoma V586	1050909-1050929	NC_004668.1	Este trabajo
<i>ireK</i>	IreK EF3120 V583 F	GCGCAAGAAGATGGAC	Genoma V583	2996815-2996830	NC_004668.1	Este trabajo
	IreK EF3120 V583 R	AACTGTGGAATAAGGAATTGG	Genoma V583	2996729-2996749	NC_004668.1	Este trabajo
	IreK JH2-2 F	ATGTAGGCGAAGAAGATGGA	Genoma V583	2996816-2996835	NC_004668.1	Este trabajo
<i>ireP</i>	IreK JH2-2 R	TGGAATAAGGGA*TTGGGAAATG	Genoma V583	2996734-2996755	NC_004668.1	Este trabajo
	IreP EF3121 F	TGAGAACCAACAACACAT	Genoma V583	2997725-2997742	NC_004668.1	Este trabajo
	IreP EF3121 R	CCTAAATTATTGACTGCCATT	Genoma V583	2997644-2997664	NC_004668.1	Este trabajo
<i>murAA</i>	MurAA EF2605 F	CAATAGACGCAACACAAC	Genoma V583	2523176-2523193	NC_004668.1	Este trabajo
	MurAA EF2605 R	GACCATTACGAGCCAAATA	Genoma V583	2523089-2523106	NC_004668.1	Este trabajo
	EF3289 F	ATGAAGGATACGAAGTCG	Genoma V583	3170775-3170792	NC_004668.1	Este trabajo
EF3289 R	EF3289 R	GCATCATAATGTCCAAGATT	Genoma V583	3170857-3170876	NC_004668.1	Este trabajo
	EF3290 F	CGCTTAATTCTCGCTACCA	Genoma V583	3171681-3173700	NC_004668.1	Este trabajo
	EF3290 R	TCAAACGGAATGCGGTGAT	Genoma V583	3171760-3171778	NC_004668.1	Este trabajo
PBP4 EF2476	PBP4 EF2476 V583 F	GCAAGCCAAACAAGAAATTAGC	Genoma V583	2398817-2398837	NC_004668.1	Este trabajo
	PBP4 EF2476 V583 R	TGAAACAACCGCAGGTAAC	Genoma V583	2398739-2398757	NC_004668.1	Este trabajo
	PBP4 EF2476 JH2-2 F	ACTTAATCTTGGTGTCTTCT	Genoma V583	2398891-2398909	NC_004668.1	Este trabajo
<i>rpoB</i> EF3238	PBP4 EF2476 JH2-2 R	CTTCGGCTAATTCTGTG	Genoma V583	2398812-2398829	NC_004668.1	Este trabajo
	rpoB EF3238 F	GTTATGTTTCCCAATTAGTT	Genoma V583	3111980-3112000	NC_004668.1	Este trabajo
	rpoB EF3238 R	GTTTAGGAATGACTGTTGA	Genoma V583	3111901-3111919	NC_004668.1	Este trabajo
<i>cat</i>	CatPlasm Transp F	GCCTCTCAATCCAATAACCC	pZXL5		JQ088279.1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>cat</i>	CatPlasm Transp R	ATCCGGATAGACTGTAAAGG	pZXL5		JQ088279.1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	Genta Probe F	ACAGAGCCTTGGGAAGATGA	pZXL5		JQ088279.1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	Genta Probe R	TGCCTTAACATTTGTGGCATT	pZXL5		JQ088279.1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Transposón fuera	IPCR HaeIII F	AAACAGGAATTTTATCGAAAATGGT	pZXL5		JQ088279.1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Transposón fuera	IPCR	CCCCCTGAAATCTTACAT	pZXL5		JQ088279.1	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>copY</i>	2.13 interno F	GATGAGCAGAAAGTTGTGAC	Amplificación 2.13		NC_004668.1	Este trabajo
EF0298	EF0298F	GTGGGAAGTCTCTGAGGTTATTTG	Genoma V583	282860-282883	NC_004668.1	Este trabajo
	EF0298R	CATCCAGGTGAATTCGCCGTAGC	Genoma V583	283344-283367	NC_004668.1	Este trabajo

Tabla 24: Oligonucleótidos utilizados en el capítulo 2. Se detallan el gen, la secuencia, el origen de dicho gen, su posición en el caso del genoma de *E. faecalis* V583 con el número de acceso al mismo y la fuente (Law *et al.*, 1995; Rigottier-Gois *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012b).

Qiagen PCR purification Kit[®] (Qiagen, Inc., Chatworth, California, USA) o el kit *Gel extraction Kit*[®] de Qiagen (Qiagen, Inc., Chatworth, California, USA). La secuenciación automática se llevó a cabo en Secugen, S. L. (Madrid, España). El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa 4Peaks 1.6 (Mek&Tosj, Netherlands) y las herramientas de análisis en línea de los *National Institutes of*

Health (NIH) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Las enzimas de restricción y la ligasa T4 se adquirieron en Takara (Takara Bio INC., Shiga, Japón) y en New England BioLabs (New England BioLabs Inc, Ipswich, Massachusetts).

Chip de ADN o *Microarray*

Se realizó un análisis por *microarray* por triplicado de las cepas V583 WT, V583 LexA⁻ y V583 LexA^{ind}, todos ellos con y sin 1 µg/ml de mitomicina C. Para la extracción del ARN se partió de un preinóculo de 5 ml de BHI crecido a 37 °C sin agitación en condiciones aeróbicas durante toda la noche. Se inocularon 150 ml de BHI con 2 ml del preinóculo y se incubó en condiciones de aerobiosis a 37 °C sin agitación hasta que se alcanzó una densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,2-0,3, momento en el que se añadió mitomicina C a una concentración final de 1 µg/ml en los cultivos correspondientes. Se tomaron 50 ml de cultivo en los minutos 0, 20 y 60 tras la adicción de mitomicina C. Se centrifugó durante 6 minutos a 6000 rpm a temperatura ambiente y se congeló el precipitado a -80°C hasta proceder a la extracción del ARN. A partir de este momento se procedió con la realización del *microarray* de acuerdo a lo descrito en el artículo de Ibrahim Mehmeti y colaboradores (Mehmeti *et al.*, 2011). Las unidades de transcripción, esto es, la búsqueda de operones, se realizó a través de ProOpDB, *Prokaryotic Operon DataBase* (Taboada *et al.*, 2012). El regulón SOS

se identifico buscando en la caja LexA consenso descrita para firmicutes. La secuencia consenso de la caja LexA de V583 WT fue determinada con el programa de acceso libre Weblogo (Weblogo.berkeley.edu).

PCR cuantitativa

El ARN de todas las cepas se obtuvo de cultivos líquidos al principio de la fase exponencial ($D.O_{600}=0,3$). El ensayo se realizó en dos cepas y en diferentes condiciones ambientales. Uno es el entorno de V583, con las cepas V583 WT, V583 LexA⁻, V583 WT con 0,05 µg/ml mitomicina C y V583 WT con 0,2 µg/ml de levofloxacin. El otro es el de JH2-2, con las cepas JH2-2, JH2-2 LexA⁻, JH2-2 con 0,02 µg/ml mitomicina C y JH2-2 con 0,3 µg/ml de levofloxacin. Las extracciones de ARN se llevaron a cabo en cada cepa siguiendo las indicaciones del kit *RNA-easy Kit*[®] (Qiagen, Inc., Chatworth, California, USA). Las digestiones con DNAsa se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante. La ausencia de ADN se confirmó por PCR con los oligonucleótidos para *rpoB* descritos en la **Tabla 24**. El ADNc se obtuvo mediante la retrotranscriptasa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) y oligonucleótidos aleatorios de 6 pb. La presencia de ADNc fue confirmada por PCR. Los cebadores para realizar la PCR a tiempo real se diseñaron con el programa Allele ID 7.7 (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). La Q-PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador MYiQ (Laboratorios Bio-Rad Inc., España) y el mix IQ SYBR Green Supermix de Bio Rad (Bio-Rad

Laboratories, Inc., California) realizando tres replicas técnicas y tres biológicas. Hubo que eliminar un dato para el gen *ireK* de JH2-2 LexA⁻ debido a una desviación evidente del mismo. En ninguna de las PCRs se obtuvieron dímeros de cebadores. La eficiencia de todos los ensayos fue del 100% ± 5%. Los genes cuyo ARN se midió fueron los que codifican para las proteínas IreP, IreK, CroR, CroS, MurAA y la PBP de baja afinidad. Los resultados de la expresión se normalizaron en función de *rpoB*.

Construcción de mutantes espontáneos por transposición

En la cepa JH2-2 llevamos a cabo un protocolo de mutagénesis aleatoria por transposición tal y como se describe en el artículo de Zhang y colaboradores del año 2012 (Zhang *et al.*, 2012). Brevemente el protocolo es el siguiente: Tras electroporar en JH2-2 el plásmido pZXL5 (**Tabla 23**) se creció la electroporación a 28°C en placas de BHI con 300 µg/ml de gentamicina. Inoculamos 5 ml de BHI con 300 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de cloranfenicol y se incubó durante 16-20h a 28°C. Se inocularon 200 ml de BHI con 200 µg/ml de gentamicina y 25 ng/ml de nisina a 37°C durante 24h, para inducir la transposasa y fomentar la pérdida del plásmido. Se transfirieron 100 µg/ml de este cultivo a 200 ml de BHI con 300 µg/ml de gentamicina y lo incubó a 37°C durante 24h para eliminar el plásmido de las células. Se repitió este último paso hasta la pérdida del plásmido.

Placa	Diluciones sembradas	Objetivo
BHI	10 ⁶	Número de bacterias totales para el cálculo de porcentajes
G300	10 ⁵ y 10 ⁶	Número de bacterias con el transposón
C10	10 ⁴ y 10 ⁵	Número de bacterias con el plásmido
G300+CRO16	10 ⁴ y 10 ⁵	Número de bacterias resistentes a ceftriaxona
MITO0,02+G300+CRO16	10 ⁰ , 10 ¹ y 10 ²	Número de bacterias resistentes a ceftriaxona en presencia de mitomicina C

Tabla 25: Presión antibiótica, diluciones sembradas y objetivos de las placas sembradas para la realización de la librería por transposición. Las placas son de BHI agar con la concentración de antibiótico indicada en µg/ml. G, gentamicina; C, cloranfenicol; CRO, ceftriaxona; MITO, mitomicina C.

Placa Original		
Placas en las que replicamos	Perfil seleccionado	Objetivo
MITO0,02+G300+CRO16		
C10	Sin crecimiento	Presencia del plásmido
G300	Crecimiento	Presencia del transposón
MITO0,02+CRO16	Crecimiento	Bacterias resistentes a ceftriaxona en presencia de mitomicina C

Tabla 26: Presión antibiótica de la placa original de la que se seleccionan los mutantes por transposición y de las placas en las que se replican, junto con el perfil de crecimiento de los mutantes seleccionados. La placa original presenta gentamicina para seleccionar la presencia del transposón, y mitomicina C y ceftriaxona para seleccionar los mutantes que en presencia de mitomicina C mantienen su resistencia. Las placas son de BHI agar con la concentración de antibiótico indicada en µg/ml. G, gentamicina; C, cloranfenicol; CRO, ceftriaxona; MITO, mitomicina C.

A continuación, se sembraron por duplicado 100 µg/ml de diferentes diluciones en solución salina 1/10 seriadas en una batería de placas. Estas placas eran de BHI, de BHI con 300 µg/ml de gentamicina, de BHI con cloranfenicol 10 µg/ml, de BHI con 300 µg/ml de gentamicina y 16 µg/ml de ceftriaxona y de BHI con 300 µg/ml de gentamicina, 60 µg/ml de ceftriaxona y 0,02 µg/ml de mitomicina C (**Tabla 25**).

Las colonias que crecieron en las placas de BHI con 300 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 60 $\mu\text{g/ml}$ de ceftriaxona y 0,02 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina las replicamos en placas de BHI con cloranfenicol 10 $\mu\text{g/ml}$ para comprobar la pérdida del plásmido, en placas de BHI con 300 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina para comprobar que efectivamente presentan el transposón y en placas de BHI con 0,02 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C y 16 $\mu\text{g/ml}$ de ceftriaxona para comprobar que presentan el fenotipo deseado (**Tabla 26**). A las colonias que no crecían en las placas de BHI con 10 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol pero sí en las placas de gentamicina y en las placas de mitomicina C y ceftriaxona se les realizó un antibiograma en placas de BHI y en placas de BHI con mitomicina C a 0,02 $\mu\text{g/ml}$ para cefaclor, cefalosporina cuyo diámetro varía minimamente en presencia de mitomicina C, para ceftriaxona, para ver que mantenía su resistencia, y para gentamicina, para comprobar que el mutante mantenía el transposón.

Además se comprobó la ausencia del plásmido mediante PCR del gen *cat* con los oligonucleótidos CatPlasm TranspF/R y la presencia del transposón con los oligonucleótidos Genta probeF/R. Con las colonias que presentaban el fenotipo deseado, se prosiguió la identificación de la región del genoma en la que se encontraba el transposón según lo descrito en el artículo de Zhang y colaboradores (Rigottier-Gois *et al.*, 2011). Se extrajo el ADN mediante el kit *QIAamp DNA Mini Kit*[®] (Qiagen, Inc., Chatworth, California, USA), se digirió con la enzima

HaeIII siguiendo las instrucciones del fabricante y se religaron los fragmentos con la ligasa T4. A continuación se realizó una PCR con los oligonucleótidos IPCR HaeIIIF/R. Estos oligonucleótidos hibridan en el transposón y están orientados hacia el exterior, de manera que, al haber religado el genoma digerido, van a amplificar las regiones del ADN adyacentes al transposón. En un caso (mutante número 13 del experimento 2) se realizó una segunda PCR con el oligonucleótido 2.13 interno F basándonos en la secuencia del amplicón para saber el punto exacto de inserción en el genoma. Los productos de la PCR se purificaron cortando de gel mediante el kit *QIAquick Gel Extraction Kit*[®] (Qiagen, Inc., Chatworth, California, USA) y se secuenciaron. Se realizó un BLAST de estas secuencias para identificar la inserción del transposón en el genoma. Se tomó como referencia el genoma de la cepa V583 (Zhang *et al.*, 2012b).

Conclusiones

CONCLUSIONES

I- La activación del sistema SOS en *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Listeria ivanovii* causa la reversión de la resistencia intrínseca a cefalosporinas.

The induction of the SOS response causes the reversion of the intrinsic resistance to cephalosporins in *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Listeria. ivanovii*.

II- *E. faecalis* presenta un sistema SOS regulado por las proteínas LexA y RecA y la caja SOS está conservada y se corresponde con la secuencia descrita para otros Firmicutes.

The SOS response of *E. faecalis* is governed by the proteins LexA y RecA. The SOS box is conserved and its sequence corresponds to the sequence described for other Firmicutes.

III- En *E. faecalis* el sistema SOS controla mecanismos implicados en la reparación y recuperación de la bacteria ante un daño en el material genético pero a diferencia de *B. subtilis* y *E. coli* carece de un sistema de inhibición de la multiplicación celular.

The SOS response controls mechanisms implicated in the repair and the recovery of bacteria with damaged DNA, but, in contrast to *B. subtilis* and *E. coli*, it lacks a cell division inhibitor.

IV- Ninguno de los mecanismos de resistencia intrínseca a cefalosporinas descritos hasta el momento ha mostrado tener una implicación clara en la reversión de la resistencia.

None of the currently known mechanisms important for the intrinsic resistance to cephalosporins have demonstrated a clear implication in the reversion of the resistance.

V- Los transportadores de glutamina están implicados en la resistencia a cefalosporinas y uno de ellos parece ser el efector de la resistencia mediada por CroR/S.

The glutamine transporters are implicated in the resistance to cephalosporins and one of them in particular seems to be responsible for the resistance mediated by CroR/S.

VI- El cobre revierte la resistencia a cefalosporinas.

Copper reverts the resistance to cephalosporins.

VII- El represor CopY parece suficiente para la reversión de la resistencia a cefalosporinas mediada por mitomicina C pero para la mediada por cobre parece necesario el resto del operón Cop.

The CopY repressor is sufficient to revert the intrinsic cephalosporin resistance mediated by mitomycin C, however for the reversion mediated by copper, the rest of the operon is required.

Material Suplementario

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF1085 conserved hypothetical protein	12	1.731e-21
EF1080 structural gene for ultraviolet resistance	7.8	1.232e-20
EF3171 recA protein	4	1.318e-20
EF1418 hypothetical protein	3.8	2.542e-19
EF1083 hypothetical protein	7.7	2.542e-19
EF1566 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase putative	2.9	4.636e-18
EF1564 chorismate synthase	3.5	4.967e-18
EF1563 3-dehydroquinase synthase	2.4	1.245e-17
EF1081 hypothetical protein	6.8	5.081e-17
EF1084 universal stress protein family	7.8	5.195e-17
EF1562 phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase putative	2.4	9.532e-17
EF0900 aldehyde-alcohol dehydrogenase	2.8	2.187e-16
EF1686 hypothetical protein	9.7	2.368e-16
EF2415 conserved hypothetical protein	2.7	3.921e-16
EF1067 hypothetical protein	3.3	1.204e-15
EF0809 hypothetical protein	2.8	2.546e-15
EF1565 prephenate dehydrogenase putative	2.4	2.546e-15
EF2416 ribosomal protein S21	2.3	3.208e-15
EF0308 conserved hypothetical protein	2.9	3.914e-15
EF1417 integrase phage family	4.3	6.546e-15
EF2145 integrase phage family	5.2	1.492e-14
EF0634 decarboxylase putative	2.2	1.821e-14
EF0763 excinuclease ABC subunit A	2	2.654e-14
EF1349 glycosyl hydrolase family 13	2.2	3.775e-14
EF2139 hypothetical protein	3.1	7.388e-14
EF3088 hypothetical protein	3.1	1.991e-13
EF1567 shikimate kinase	2.5	1.991e-13
EF0958 PTS system component	3	2.236e-13
EF1082 hypothetical protein	4.2	2.236e-13
EF2209 hypothetical protein	2.2	2.574e-13
EF2084 hypothetical protein	4	2.705e-13
EF1466 conserved domain protein	3.4	3.234e-13
EF1348 glucan 1,6-alpha-glucosidase putative	2.8	3.328e-13
EF0402 Na ⁺ /H ⁺ antiporter	2.8	4.924e-13
EF2130 hypothetical protein	2.7	5.994e-13
EF0453 general stress protein 170	2.4	7.844e-13
EF1347 glycosyl hydrolase family 13	2.4	9.746e-13
traC protein	2.2	1.180e-12
EF1764 ribosomal subunit interface protein	2	1.355e-12
EF0310 hypothetical protein	2	1.691e-12
EF2941 hypothetical protein	2.4	1.928e-12
EF1561 shikimate 5-dehydrogenase	2	2.380e-12
EF2678 arsenate reductase putative	1.8	3.192e-12
EF1089 aminopeptidase C putative	2	3.354e-12
EF0350 conserved hypothetical protein	3.2	4.792e-12
EF1419 conserved hypothetical protein	2	6.233e-12
EF0762 excinuclease ABC subunit B	2	6.742e-12
EF0443 LysM domain protein	3	9.986e-12
EF1258 hypothetical protein	2	1.280e-11

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF1086 spermidine acetyltransferase putative	2.9	1.327e-11
EF2953 hypothetical protein	2.3	1.458e-11
EF1946 hypothetical protein	2.4	1.458e-11
EF2650 spermidine/putrescine ABC transporter permease protein	2.7	1.619e-11
EF1110 YkgG family protein	1.8	1.619e-11
EF0468 lemA protein	1.8	1.809e-11
EF2943 major histocompatibility complex-related protein	2.3	2.327e-11
EF2291 Helix-turn-helix domain protein	1.9	3.547e-11
EF1947 hypothetical protein	2.4	4.480e-11
EF0307 transcriptional regulator	2.2	5.167e-11
EF0897 preprotein translocase YajC subunit putative	1.9	5.167e-11
EF2132 conserved hypothetical protein	2	7.830e-11
EF0526 cyL-S protein	1.7	8.168e-11
EF3152 large conductance mechanosensitive channel protein	2.1	8.214e-11
EF2135 hypothetical protein	2	8.515e-11
EF1467 hypothetical protein	3.2	8.515e-11
EF1489 hypothetical protein	4	1.173e-10
EF2940 hypothetical protein	2.6	1.610e-10
EF1459 hypothetical protein	2.8	1.747e-10
EF2129 conserved hypothetical protein	2.2	1.843e-10
EF0417 conserved hypothetical protein	1.9	2.246e-10
EF2518 conserved hypothetical protein	1.6	2.377e-10
EF1343 maltose ABC transporter permease protein putative	3.4	3.554e-10
EF1097 hypothetical protein	2.6	3.554e-10
EF0214 ribosomal protein L29	1.7	3.918e-10
EF1698 conserved hypothetical protein	1.8	4.580e-10
EF0235 hypothetical protein	2.4	4.630e-10
EF0313 hypothetical protein	2.5	5.203e-10
EF1367 cold-shock domain family protein	1.8	6.697e-10
EF2121 hypothetical protein	2.1	7.522e-10
EF2925 cold-shock domain family protein	1.8	7.618e-10
EF0796 acid phosphatase	1.9	7.825e-10
EF1345 maltose ABC transporter maltose-binding protein putative	1.7	8.376e-10
EF3035 universal stress protein family	1.5	9.444e-10
EF0339 hypothetical protein	2.2	9.610e-10
EF2124 methyltransferase putative	2.2	1.068e-09
EF1107 hypothetical protein	1.7	1.048e-09
EF0349 conserved hypothetical protein	2.9	1.166e-09
EF1248 hypothetical protein	2	1.220e-09
EF0330 helicase SNF2/RAD54 family putative	2.5	1.241e-09
EF0697 conserved hypothetical protein	1.7	1.262e-09
EF2708 conserved hypothetical protein	1.9	1.241e-09
EF0288 hypothetical protein	2.9	1.455e-09
EF0351 Structural protein	2.2	1.499e-09
EF0312 hypothetical protein	2.4	1.549e-09
EF0319 conserved hypothetical protein	2.5	1.550e-09
EF1550 DNA-binding protein HU	2.3	1.593e-09
EF2549 uracil phosphoribosyltransferase	1.7	1.651e-09
EF1344 maltose ABC transporter permease protein	2.3	1.699e-09

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF0325 DNA polymerase I putative	2.3	1.708e-09
EF1468 hypothetical protein	2.8	1.859e-09
EF0355 endolysin	2.1	1.995e-09
replication-associated protein RepA	1.8	2.201e-09
EF1568 chorismate mutase/prephenate dehydratase putative	1.8	2.294e-09
EF1167 fructose-bisphosphate aldolase	1.6	2.455e-09
EF0521 choloylglycine hydrolase	1.6	2.513e-09
EF1461 conserved hypothetical protein	2.9	2.515e-09
EF0173 pyrimidine-nucleoside phosphorylase	1.6	2.622e-09
EF0345 hypothetical protein	2.1	3.495e-09
EF2952 hypothetical protein	2.1	3.512e-09
EF0770 hypothetical protein	1.6	3.591e-09
EF2140 hypothetical protein	2.3	3.985e-09
EF0463 superoxide dismutase Mn	2.1	5.530e-09
EF2136 hypothetical protein	1.9	5.599e-09
EF0338 conserved domain protein	1.8	5.639e-09
EF0340 hypothetical protein	2.1	6.157e-09
EF1140 lactoylglutathione lyase	1.6	6.319e-09
EF0238 ABC transporter P-binding protein	1.5	7.019e-09
EF1057 Mn2+/Fe2+ transporter NRAMP family	1.8	7.839e-09
EF0327 hypothetical protein	2.1	7.847e-09
EF3233 Dps family protein	1.5	7.994e-09
EF1469 conserved domain protein	2.9	8.397e-09
EF1022 hypothetical protein	1.4	9.198e-09
EF2946 hypothetical protein	1.8	9.562e-09
EF2141 transcriptional regulator	2.4	1.006e-08
EF2126 hypothetical protein	2	1.006e-08
EF0473 ribonucleoside-diphosphate reductase 2 NrdH-redoxin	1.4	1.046e-08
EF2122 hypothetical protein	2.1	1.181e-08
EF2125 hypothetical protein	2	1.218e-08
EF2123 hypothetical protein	2	1.275e-08
EF2138 transcriptional regulator	2	1.470e-08
EF0940 conserved hypothetical protein	1.9	1.478e-08
EF2443 ribosomal protein S20	1.6	1.571e-08
EF1322 conserved hypothetical protein	1.6	1.578e-08
EF1450 conserved hypothetical protein	1.9	1.845e-08
EF0404 nitroreductase family protein	1.5	1.956e-08
EF1460 LysM domain protein	2.6	1.956e-08
EF1043 conserved hypothetical protein	1.7	2.194e-08
EF0234 ribosomal protein L17	1.7	2.228e-08
EF1463 hypothetical protein	2.8	2.636e-08
EF2536 hypothetical protein	2.2	2.822e-08
EF0682 DNA repair exonuclease family protein	1.6	2.822e-08
EF0547 ammonium transporter putative	1.7	3.138e-08
EF2195 glycosyl transferase domain protein	1.5	3.138e-08
EF0207 ribosomal protein L4	1.6	3.261e-08
EF2697 conserved domain protein	1.5	3.463e-08
EF2128 conserved hypothetical protein	2.1	3.601e-08
EF2541 hypothetical protein	1.8	3.744e-08

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF1465 hypothetical protein	3	4.091e-08
EF1449 hypothetical protein	2	4.386e-08
EF3287 hypothetical protein	1.4	4.680e-08
EF0684 DNA-binding-factor	1.8	4.885e-08
EF0328 virulence-associated protein E	2	5.354e-08
EF0008 single-strand binding protein	1.9	5.374e-08
EF1204 conserved hypothetical protein	1.4	5.374e-08
EF1470 hypothetical protein	2.4	6.430e-08
EF2746 dltD protein	2	6.720e-08
EF0315 hypothetical protein	2.1	7.235e-08
EF2133 conserved domain protein	1.8	7.449e-08
EF1464 hypothetical protein	2.7	7.876e-08
EF3278 conserved hypothetical protein	1.6	7.900e-08
EF0042 2C-methyl-D-erythritol 2 4-cyclodiphosphate synthase	1.4	8.239e-08
EF2784 hypothetical protein	1.6	9.103e-08
EF0341 hypothetical protein	2	9.571e-08
EF2756 DNA-damage-inducible protein P	2.1	1.000e-07
EF2131 hypothetical protein	2.2	1.000e-07
EF2240 integrase phage family	1.6	1.057e-07
EF2651 spermidine/putrescine ABC transporter permease protein	2.2	1.182e-07
EF2144 hypothetical protein	1.7	1.339e-07
EF1211 NADH peroxidase	1.4	1.408e-07
EF0318 hypothetical protein	2	1.712e-07
EF1306 heat-inducible transcription repressor HrcA	1.6	1.759e-07
EF0778 hypothetical protein	1.6	1.759e-07
EF2134 hypothetical protein	1.8	1.786e-07
EF0683 conserved hypothetical protein	1.6	1.849e-07
EF2748 dltB protein	1.8	1.877e-07
EF2951 hypothetical protein	1.8	2.103e-07
EF1048 ribosomal protein L32	1.5	2.264e-07
EF2949 hypothetical protein	1.9	2.264e-07
EF1301 cell division protein FtsW/RodA/SpovE family	1.7	2.410e-07
EF2075 iron (chelated) ABC transporter permease protein	2.5	2.410e-07
EF1560 hypothetical protein	1.6	2.524e-07
EF3279 protease putative	1.6	2.835e-07
EF3280 protease putative	1.5	2.979e-07
EF0311 hypothetical protein	1.7	3.010e-07
EF0317 transcriptional regulator	1.5	3.208e-07
EF0798 hypothetical protein	1.6	3.278e-07
EF1052 hypothetical protein	1.8	3.658e-07
EF3296 conserved hypothetical protein TIGR00092	1.4	3.621e-07
EF2898 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin-type	1.4	3.621e-07
EF3178 peptidase M20/M25/M40 family	1.4	3.642e-07
EF1475 hypothetical protein	2.1	3.668e-07
EF0041 conserved hypothetical protein	1.5	3.999e-07
EF3299 Pase ParA family	1.5	4.001e-07
EF0689 conserved hypothetical protein	1.7	4.231e-07
EF2856 ribosomal protein L33	1.4	5.295e-07
EF2143 gp35 putative	1.5	5.617e-07

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF2410 P-binding protein Era	1.4	5.678e-07
EF0172 sugar-binding transcriptional regulator LacI family	1.4	5.959e-07
EF0783 acyltransferase putative	1.4	5.971e-07
EF3085 iron compound ABC transporter permease protein	1.8	6.101e-07
EF0080 gls24 protein	1.5	6.139e-07
EF1108 conserved hypothetical protein	1.5	6.139e-07
EF2137 hypothetical protein	1.9	6.157e-07
EF2127 hypothetical protein	1.8	6.690e-07
EF2445 2-dehydropantoate 2-reductase putative	1.5	6.977e-07
EF1114 conserved hypothetical protein	1.5	6.977e-07
EF2950 hypothetical protein	2.1	7.280e-07
EF1405 thioredoxin	1.6	7.519e-07
EF1483 hypothetical protein	2.3	8.114e-07
EF0343 gene 16.1	1.5	8.405e-07
EF1368 hypothetical protein	1.5	8.405e-07
EF2920 ABC transporter P-binding/permease protein	1.4	8.899e-07
EF2909 conserved hypothetical protein	1.4	8.984e-07
EF0309 excisionase-related protein	1.7	9.003e-07
EF0959 hypothetical protein	1.7	9.034e-07
EF0420 drug resistance transporter EmrB/QacA subfamily	1.5	9.095e-07
EF0243 branched-chain amino acid transport system II carrier protein	2.4	9.501e-07
EF0988 conserved hypothetical protein TIGR00242	1.4	9.443e-07
EF2203 Bacterial regulatory proteins tetR family domain protein	1.4	9.984e-07
EF0206 ribosomal protein L3	1.3	1.008e-06
conserved hypothetical protein	2	1.038e-06
EF0860 membrane protein putative	1.6	1.083e-06
EF1113 exonuclease RexA	1.5	1.092e-06
EF0354 holin-related protein	1.8	1.151e-06
EF1478 hypothetical protein	2	1.193e-06
EF3237 DNA-directed RNA polymerase beta-prime subunit	1.5	1.214e-06
EF3242 abortive phage resistance protein putative	1.5	1.317e-06
EF1479 conserved hypothetical protein	2.1	1.478e-06
EF1482 hypothetical protein	2.3	1.478e-06
EF3238 DNA-directed RNA polymerase beta subunit	1.4	1.506e-06
EF0305 conserved domain protein	1.7	1.529e-06
EF1521 DNA primase	1.3	1.546e-06
EF3293 inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	1.5	1.548e-06
EF1143 conserved hypothetical protein	1.4	1.584e-06
EF3082 iron compound ABC transporter substrate-binding protein	1.6	1.658e-06
EF0576 zinc ABC transporter permease protein putative	2.7	1.718e-06
EF0956 beta-phosphoglucomutase	2.6	1.858e-06
EF3297 conserved hypothetical protein	1.4	1.880e-06
EF0323 hypothetical protein	1.9	2.004e-06
EF1361 dihydroxyacetone kinase family protein	1.6	2.308e-06
EF1180 conserved domain protein	1.6	2.308e-06
EF1477 hypothetical protein	2.1	2.308e-06
EF3331 membrane protein 60 kDa	1.4	2.351e-06
EF1604 sugar-binding transcriptional regulator LacI family	2.2	2.370e-06
EF2927 hydrolase haloacid dehalogenase-like family	1.4	2.444e-06

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF1191 DegV family protein	1.5	2.511e-06
EF3095 hydrolase haloacid dehalogenase-like family	1.4	2.571e-06
EF3324 oxaloacetate decarboxylase beta subunit putative	1.4	2.603e-06
EF1454 conserved hypothetical protein	1.8	2.645e-06
EF2665 RNA methyltransferase TrmH family	1.4	2.660e-06
EF1455 conserved hypothetical protein	2	2.767e-06
EF0631 cardiolipin synthetase putative	1.4	2.831e-06
EF0577 adhesion lipoprotein	1.5	3.205e-06
EF1326 Bacterial regulatory proteins tetR family domain protein	1.5	3.539e-06
EF0748 rhodanese family protein	1.3	3.560e-06
EF0282 enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase	1.3	3.596e-06
EF2537 hypothetical protein	2.6	3.659e-06
EF1480 hypothetical protein	1.7	3.744e-06
EF0779 conserved domain protein	1.6	3.861e-06
EF0201 translation elongation factor Tu	1.4	4.060e-06
EF3065 ribosomal protein S15	1.5	4.345e-06
EF2142 transcriptional regulator	1.5	4.698e-06
EF2307 conserved hypothetical protein	1.4	4.754e-06
EF1112 exonuclease RexB	1.3	4.815e-06
EF0131 conserved domain protein	1.7	5.042e-06
EF1192 aquaporin Z	1.5	5.219e-06
EF0462 hypothetical protein	1.3	5.480e-06
EF0306 transcriptional regulator	1.4	5.687e-06
EF2747 D-alanyl carrier protein	1.3	5.705e-06
conserved hypothetical protein	1.6	5.747e-06
EF2652 spermidine/putrescine ABC transporter P binding subunit	1.5	5.747e-06
EF1247 conserved hypothetical protein	1.6	6.509e-06
EF2644 conserved hypothetical protein TIGR00147	1.4	6.509e-06
EF0026 hypothetical protein	1.8	6.735e-06
EF1446 hypothetical protein	1.8	7.014e-06
EF1458 hypothetical protein	1.7	7.250e-06
EF0022 PTS system component	1.5	7.561e-06
transcriptional regulator UvrC family	1.8	7.707e-06
EF3298 chromosome partitioning protein ParB putative	1.5	8.432e-06
EF2740 methyltransferase	1.3	8.585e-06
EF0179 sugar ABC transporter permease protein	1.4	8.639e-06
ImpB/MucB/SamB family protein	2.5	9.411e-06
EF0869 transcriptional regulator	1.5	9.677e-06
EF2944 hypothetical protein	1.8	1.015e-05
EF2690 exonuclease SbcD	1.6	1.081e-05
EF3118 ribulose-phosphate 3-epimerase	1.4	1.089e-05
EF3311 Glucose inhibited division protein A	1.3	1.130e-05
EF0316 hypothetical protein	1.6	1.177e-05
EF0781 cold shock domain family protein	1.4	1.195e-05
EF2749 D-alanine-activating enzyme putative	1.4	1.259e-05
EF0542 hypothetical protein	1.6	1.469e-05
EF3312 thiophene and furan oxidation protein ThdF	1.4	1.507e-05
EF1088 frmE protein putative	1.6	1.530e-05
EF3004 sulfate permease family protein	1.4	1.533e-05

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF1443 conserved hypothetical protein	1.4	1.537e-05
EF3281 conserved hypothetical protein	1.6	1.580e-05
EF3322 citrate lyase ligase	1.3	1.608e-05
EF0790 ABC transporter P-binding/permease protein	1.5	1.629e-05
EF3300 glucose-inhibited division protein B	1.4	1.629e-05
EF1474 LysM domain protein	1.8	1.653e-05
EF2947 hypothetical protein	1.8	1.699e-05
EF3018 conserved domain protein	1.5	1.699e-05
EF3319 citrate lyase alpha subunit	1.4	1.699e-05
EF0803 conserved hypothetical protein	1.7	1.704e-05
EF0985 hypothetical protein	1.3	1.704e-05
EF0680 penicillin-binding protein 1	1.3	1.714e-05
EF0007 ribosomal protein S6	1.4	1.736e-05
EF1162 helicase putative	1.6	1.747e-05
EF2539 hypothetical protein	2.4	1.824e-05
EF3059 Bacterial regulatory proteins tetR family domain protein	1.5	1.867e-05
EF2497 ABC transporter permease protein	1.5	1.873e-05
EF1444 hypothetical protein	1.5	1.949e-05
EF1462 hypothetical protein	2.3	1.989e-05
EF2880 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II	1.3	2.002e-05
EF2942 hypothetical protein	1.9	2.044e-05
EF2522 hypothetical protein	1.8	2.115e-05
EF0909 peptide ABC transporter permease protein	1.3	2.228e-05
EF3087 hypothetical protein	2.1	2.228e-05
EF0326 hypothetical protein	1.8	2.228e-05
EF1338 thioredoxin reductase	1.4	2.250e-05
EF0926 DNA-binding response regulator	1.4	2.291e-05
EF1772 hypothetical protein	1.7	2.376e-05
EF0478 hypothetical protein	1.4	2.496e-05
EF2222 ABC transporter permease protein	1.4	2.567e-05
EF0009 ribosomal protein S18	1.4	2.753e-05
EF1453 hypothetical protein	1.8	2.827e-05
EF3033 PTS system component	1.5	2.951e-05
EF2487 UDP-galactopyranose mutase	1.3	2.976e-05
EF0003 conserved hypothetical protein	1.2	2.976e-05
EF2905 sugar ABC transporter permease protein	1.3	2.976e-05
EF2638 DNA-binding protein	1.3	2.976e-05
EF0226 ribosomal protein L15	1.5	3.080e-05
EF2241 hypothetical protein	1.4	3.150e-05
EF0609 conserved hypothetical protein	1.3	3.195e-05
EF1796 conserved hypothetical protein	1.6	3.288e-05
pheromone shutdown protein TraB	1.5	3.342e-05
EF2589 mannose-6-phosphate isomerase class I	1.4	3.369e-05
EF2178 hypothetical protein	1.3	3.369e-05
EF0449 hydrolase alpha/beta hydrolase fold family	1.4	3.509e-05
EF1452 DNA methylase	1.6	3.851e-05
EF3116 ribosomal protein L28	1.7	4.024e-05
EF0247 amino acid ABC transporter amino acid-binding/permease pr	1.3	4.240e-05
EF1440 conserved hypothetical protein	1.6	4.366e-05

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF3022 sodium/dicarboxylate symporter family protein	1.6	4.403e-05
EF3290 sensor histidine kinase	1.3	4.459e-05
EF1740 penicillin-binding protein 1 putative	1.4	4.683e-05
EF3263 conserved hypothetical protein	1.7	4.860e-05
EF0332 conserved hypothetical protein	1.8	4.860e-05
EF0816 PTS system component	1.4	4.906e-05
EF2677 putative transcriptional regulator MecA	1.4	4.906e-05
EF1457 conserved domain protein	1.9	4.925e-05
EF2875 acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase alpha subunit	1.3	5.259e-05
EF0859 cation efflux family	1.8	5.581e-05
EF1144 conserved hypothetical protein	1.5	5.516e-05
EF1008 oxidoreductase Gfo/Idh/MocA family family	1.4	5.555e-05
EF0237 cobalt ABC transporter P-binding protein	1.5	5.611e-05
EF1358 glycerol dehydrogenase	1.4	5.794e-05
EF3333 ribosomal protein L34	1.3	5.794e-05
EF3117 conserved hypothetical protein	1.3	5.903e-05
EF0348 hypothetical protein	1.4	6.238e-05
EF2486 lipopolysaccharide/O-antigen transport protein	1.4	6.290e-05
EF1496 V-type Pase subunit C	1.4	6.472e-05
EF2782 galactose-1-phosphate uridylyltransferase	1.5	6.559e-05
EF2906 sugar ABC transporter permease protein	1.4	6.584e-05
EF0224 ribosomal protein S5	1.3	6.681e-05
EF1308 dnak protein	1.3	7.064e-05
EF0208 ribosomal protein L23	1.3	7.087e-05
EF0610 hypothetical protein	1.3	7.366e-05
EF1100 ABC transporter P-binding protein	1.5	7.366e-05
EF0304 hypothetical protein	1.3	7.647e-05
EF2913 conserved hypothetical protein	2.1	7.712e-05
EF2221 conserved hypothetical protein	1.4	7.838e-05
EF0617 hypothetical protein	1.4	8.436e-05
EF0077 hypothetical protein	1.3	8.436e-05
EF2535 nucleotidyltransferase family protein	1.4	8.721e-05
EF2704 A/G-specific adenine glycosylase	1.4	9.181e-05
EF1556 conserved hypothetical protein	1.4	9.146e-05
EF3027 serine protease	1.4	9.186e-05
EF0841 conserved domain protein	1.4	9.386e-05
EF1259 hydrolase haloacid dehalogenase-like family	1.4	1.025e-04
EF1366 conserved hypothetical protein	1.3	1.138e-04
EF0820 ribosomal protein L25	1.7	1.138e-04
EF0639 low temperature requirement C protein	1.3	1.151e-04
EF1190 hypothetical protein	1.3	1.152e-04
EF1487 hypothetical protein	1.4	1.159e-04
EF0641 L-lactate dehydrogenase	1.7	1.194e-04
EF0543 hypothetical protein	1.4	1.260e-04
EF2939 cold-shock domain family protein	1.5	1.291e-04
EF1300 cell division protein FtsW/RodA/SpovE family	1.4	1.287e-04
EF1484 conserved hypothetical protein	1.6	1.291e-04
EF0329 phage protein putative	1.5	1.312e-04
EF0910 peptide ABC transporter permease protein	1.3	1.344e-04

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF0562 hypothetical protein	1.4	1.375e-04
EF1214 alpha-acetolactate decarboxylase putative	1.3	1.377e-04
EF0525 cyll-L protein	1.4	1.388e-04
EF1522 RNA polymerase sigma-70 factor family protein	1.3	1.399e-04
EF3170 HDIG domain protein	1.3	1.403e-04
EF2530 hypothetical protein	1.8	1.452e-04
EF1213 acetolactate synthase	1.3	1.513e-04
EF2179 hypothetical protein	1.3	1.520e-04
EF0948 uracil-DNA glycosylase	1.3	1.573e-04
EF0815 PTS system component	1.3	1.585e-04
EF0771 P-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP	1.4	1.607e-04
EF3130 hypothetical protein	1.4	1.631e-04
EF0097 regulatory protein pfoR	1.5	1.622e-04
EF0797 hypothetical protein	1.4	1.652e-04
EF2225 transcriptional regulator MerR family	1.4	1.662e-04
EF0842 Yail/YqxD family protein	1.3	1.718e-04
EF1272 conserved hypothetical protein	1.3	1.712e-04
EF1497 V-type Pase subunit G	1.3	1.712e-04
EF1164 HD domain protein	1.5	1.828e-04
EF3123 methionyl-tRNA formyltransferase	1.2	1.842e-04
EF3210 PTS system component	1.3	1.936e-04
EF0025 hypothetical protein	1.4	1.989e-04
EF0637 hypothetical protein	1.3	2.136e-04
EF1233 ABC transporter permease protein	1.4	2.143e-04
EF0295 V-type Pase subunit J	1.8	2.187e-04
EF0352 hypothetical protein	1.4	2.199e-04
EF0914 translation initiation factor IF-3	1.3	2.235e-04
EF1448 hypothetical protein	1.5	2.260e-04
EF3294 conserved hypothetical protein	1.8	2.260e-04
EF0227 preprotein translocase SecY subunit	1.6	2.267e-04
EF1541 conserved hypothetical protein	1.4	2.299e-04
EF0723 hypothetical protein	1.9	2.350e-04
EF1554 conserved hypothetical protein	1.3	2.369e-04
EF1273 ribosomal protein L7A family	1.2	2.439e-04
EF0546 hypothetical protein	1.3	2.447e-04
EF2966 PTS system component	1.3	2.514e-04
EF1915 hypothetical protein	1.4	2.536e-04
EF0744 sodium/dicarboxylate symporter family protein	1.4	2.549e-04
EF0285 dihydroorotate dehydrogenase	1.3	2.557e-04
EF0916 ribosomal protein L20	1.3	2.576e-04
EF0961 pyrroline-5-carboxylate reductase	1.5	2.761e-04
EF0220 ribosomal protein S8	1.2	2.757e-04
EF2739 alkyl hydroperoxide reductase	1.4	2.785e-04
EF0846 P-dependent RNA helicase DeaD	1.3	2.815e-04
EF2146 hypothetical protein	1.4	2.874e-04
EF2491 glycosyl transferase domain protein	1.3	2.888e-04
EF2649 spermidine/putrescine ABC transporter spermidine/putresci	1.2	2.940e-04
EF1907 maoC like domain protein	1.2	2.940e-04
EF2529 hypothetical protein	1.5	3.056e-04

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF0954 sugar-binding transcriptional repressor Lacl family	1.4	3.085e-04
EF2074 ABC transporter P-binding protein	1.5	3.095e-04
EF1092 conserved hypothetical protein	1.3	3.157e-04
EF0741 hypothetical protein	1.6	3.157e-04
EF1135 conserved hypothetical protein	1.4	3.193e-04
EF2169 hypothetical protein	1.2	3.274e-04
EF0032 membrane protein putative	1.5	3.352e-04
EF0344 hypothetical protein	1.6	3.370e-04
EF2702 hypothetical protein	1.3	3.395e-04
EF2480 conserved hypothetical protein	1.4	3.395e-04
EF2886 transcriptional regulator MarR family	1.2	3.411e-04
EF1307 heat shock protein GrpE	1.2	3.424e-04
EF3259 ger protein	1.4	3.440e-04
EF1526 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1.5	3.471e-04
EF1602 glycosyl hydrolase family 13	1.3	3.491e-04
EF1704 sensory box histidine kinase	1.4	3.583e-04
EF0250 maltose O-acetyltransferase putative	1.3	3.736e-04
EF0902 mevalonate kinase	1.3	3.738e-04
EF0337 hypothetical protein	1.6	3.988e-04
EF0396 hypothetical protein	1.3	4.050e-04
EF1579 transcriptional repressor LexA	1.3	4.063e-04
EF2948 primase putative	1.6	4.131e-04
EF0785 multidrug resistance protein putative	1.2	4.277e-04
EF0814 transcriptional regulator GntR family	1.4	4.526e-04
EF1304 cation-transporting Pase E1-E2 family	1.4	4.639e-04
EF2519 hypothetical protein	1.7	4.673e-04
EF1601 PTS system component	1.3	4.688e-04
replication-associated protein RepB	1.3	4.688e-04
EF2456 pyruvate carboxylase	1.3	5.046e-04
EF2604 conserved hypothetical protein	1.6	5.237e-04
EF1548 ribosomal protein S1 putative	1.2	5.321e-04
EF1456 conserved hypothetical protein	1.6	5.358e-04
EF3214 sigma-54 dependent transcriptional regulator putative	1.3	5.396e-04
EF0918 membrane protein putative	1.3	5.489e-04
EF1010 transcriptional antiterminator BglG family	1.3	5.493e-04
EF1933 hypothetical protein	1.3	5.709e-04
EF1590 protease synthase and sporulation negative regulatory protei	1.3	5.762e-04
EF3332 ribonuclease P protein component	1.3	5.839e-04
EF1447 hypothetical protein	1.5	5.839e-04
EF3163 ribose-phosphate pyrophosphokinase	1.2	5.894e-04
EF0795 conserved hypothetical protein	1.3	6.085e-04
EF2885 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	1.2	6.230e-04
EF1445 hypothetical protein	1.5	6.230e-04
EF1109 iron-sulfur cluster binding protein	1.3	6.230e-04
EF0198 ribosomal protein S12	1.3	6.278e-04
EF1486 endolysin	1.2	6.572e-04
EF1025 conserved hypothetical protein	1.4	6.743e-04
EF0233 DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	1.3	6.836e-04
EF0300 hypothetical protein	1.5	6.905e-04

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
PemK family protein	1.3	6.931e-04
EF0144 conserved hypothetical protein	1.4	6.953e-04
EF0768 COG1481 family protein	1.3	6.991e-04
EF2083 hypothetical protein	1.6	7.132e-04
EF0333 conserved hypothetical protein	2	7.344e-04
EF2483 hypothetical protein	1.3	7.440e-04
EF0081 conserved hypothetical protein	1.4	7.466e-04
EF0552 PTS system component	1.4	7.490e-04
EF1441 hypothetical protein	1.4	7.628e-04
EF2304 Helix-turn-helix domain protein	1.3	7.633e-04
EF0200 translation elongation factor G	1.3	7.697e-04
EF2694 M/SAH nucleosidase	1.3	7.763e-04
EF1643 conserved hypothetical protein TIGR00023	1.3	7.791e-04
EF2154 conserved hypothetical protein	1.3	8.041e-04
EF2479 conserved hypothetical protein	1.5	8.272e-04
EF3122 Sun protein	1.3	8.064e-04
EF3286 transcriptional regulator RpiR family putative	1.5	8.147e-04
EF3166 DNA mismatch repair protein MutL	1.3	8.337e-04
EF2912 sensor histidine kinase putative	1.3	8.481e-04
EF0719 transcriptional regulator DeoR family	1.4	8.481e-04
EF0229 translation initiation factor IF-1	1.2	8.498e-04
EF1356 pyruvate dehydrogenase complex E3 component lipoamide	1.3	8.544e-04
EF0989 conserved hypothetical protein TIGR00006	1.2	8.622e-04
EF1503 conserved hypothetical protein	1.2	8.660e-04
EF3091 YitT family protein	1.4	8.660e-04
EF2151 glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (isom)	1.2	8.943e-04
EF3169 conserved hypothetical protein TIGR00282	1.2	9.059e-04
EF1528 hypothetical protein	1.6	9.103e-04
EF0230 ribosomal protein L36	1.3	9.132e-04
EF0322 phage-related protein	1.6	9.259e-04
EF1471 hypothetical protein	1.8	9.330e-04
EF1013 PTS system component	1.4	9.671e-04
EF1078 multidrug resistance protein putative	1.3	9.725e-04
EF1044 DNA polymerase III alpha subunit	1.3	9.875e-04
EF1476 hypothetical protein	1.5	1.032e-03
EF1261 sensor histidine kinase	1.2	1.062e-03
EF0335 gene 7 putative	1.3	1.068e-03
EF0927 sensor histidine kinase	1.2	1.074e-03
EF1481 conserved domain protein	1.8	1.122e-03
EF3070 ribosomal protein S4	1.4	1.183e-03
EF1182 autoinducer-2 production protein LuxS	1.3	1.202e-03
EF0067 Holliday junction DNA helicase RuvB	1.3	1.213e-03
EF0789 ABC transporter P-binding/permease protein	1.7	1.213e-03
EF0031 membrane protein putative	1.4	1.223e-03
EF2183 ABC-transporter permease protein putative	1.3	1.219e-03
EF0215 ribosomal protein S17	1.2	1.220e-03
EF2901 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family prote	1.3	1.227e-03
EF1340 hypothetical protein	1.3	1.241e-03
EF3260 polyprenyl synthetase	1.4	1.277e-03

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF0469 conserved hypothetical protein	1.3	1.328e-03
EF0258 low temperature requirement B protein putative	1.4	1.341e-03
EF2847 conserved hypothetical protein	1.4	1.359e-03
EF1494 V-type Pase subunit K	1.2	1.364e-03
EF0321 hypothetical protein	1.8	1.389e-03
EF3061 rod shape-determining protein MreD	1.3	1.411e-03
EF3097 ribonuclease III	1.3	1.411e-03
EF3039 conserved hypothetical protein	1.3	1.439e-03
EF0175 cytidine deaminase	1.2	1.431e-03
EF2223 ABC transporter permease protein	1.3	1.469e-03
EF0024 conserved hypothetical protein	1.2	1.483e-03
EF0079 gls24 protein	1.4	1.527e-03
EF3062 rod shape-determining protein MreC	1.2	1.506e-03
EF2935 conserved hypothetical protein	1.2	1.551e-03
EF1543 ferredoxin	1.3	1.568e-03
EF0051 kinase GHMP family group 2	1.3	1.582e-03
EF3283 CtsR protein	1.3	1.603e-03
EF0825 uridine kinase	1.3	1.616e-03
EF0802 hypothetical protein	1.4	1.620e-03
EF2201 flavodoxin	1.2	1.621e-03
EF0669 low temperature requirement B protein putative	1.3	1.642e-03
EF1241 hypothetical protein	1.2	1.642e-03
EF2548 hypothetical protein	1.3	1.642e-03
EF0140 conserved domain protein	1.8	1.658e-03
EF1096 conserved hypothetical protein	1.4	1.693e-03
EF0347 hypothetical protein	1.4	1.700e-03
EF3211 PTS system component	1.2	1.700e-03
EF1091 hypothetical protein	1.3	1.706e-03
EF0287 translation elongation factor P	1.3	1.750e-03
EF1555 YitT family protein	1.2	1.760e-03
EF1360 dihydroxyacetone kinase family protein	1.4	1.848e-03
EF2475 conserved hypothetical protein	1.3	1.869e-03
EF1558 poly(A) polymerase family protein	1.2	1.954e-03
EF1279 replisome organiser-related protein	1.3	1.888e-03
EF2283 resolvase TndX	1.2	1.888e-03
EF0545 hypothetical protein	1.3	1.926e-03
EF0911 peptide ABC transporter P-binding protein	1.3	1.926e-03
EF3295 hypothetical protein	1.2	1.957e-03
EF2470 HD domain protein	1.4	2.004e-03
EF1001 conserved hypothetical protein	1.2	2.028e-03
EF0192 FecCD transport family protein	1.4	2.037e-03
EF1423 transcriptional regulator	1.3	2.063e-03
EF1316 transcriptional regulator	1.4	2.063e-03
EF1420 hypothetical protein	1.2	2.108e-03
EF0667 conserved hypothetical protein	1.3	2.108e-03
EF0745 glyoxalase family protein	1.3	2.158e-03
EF2457 cell division protein FtsW/RodA/SpoVE family	1.2	2.159e-03
EF0016 DegV family protein	1.6	2.180e-03
EF1002 cell division protein DivIVA	1.2	2.183e-03

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF3111 acyl carrier protein	1.2	2.252e-03
EF2601 conserved hypothetical protein	1.2	2.287e-03
EF0760 amino acid ABC transporter P-binding protein	1.2	2.382e-03
EF0056 ABC transporter P-binding protein	1.3	2.383e-03
EF0834 PTS system component	1.4	2.388e-03
EF2788 glucokinase putative	1.2	2.401e-03
EF2873 Pase of unknown function subfamily putative	1.3	2.409e-03
EF0186 purine nucleoside phosphorylase	1.2	2.410e-03
EF0239 cobalt transport protein	1.2	2.418e-03
EF0256 peptidyl-tRNA hydrolase	1.3	2.438e-03
EF0037 gamma-glutamyl phosphate reductase	1.3	2.616e-03
EF1341 ABC transporter P-binding protein	1.2	2.626e-03
EF0957 glycosyl transferase family 65	1.7	2.638e-03
EF2751 hypothetical protein	1.4	2.819e-03
EF2850 conserved hypothetical protein	1.3	2.782e-03
EF0057 ABC 3 transport family protein	1.4	2.785e-03
EF1363 HMG-CoA synthase	1.2	2.786e-03
EF0261 conserved hypothetical protein	1.2	2.840e-03
EF2855 integrase phage family	1.3	2.875e-03
EF2188 conserved domain protein	1.2	2.885e-03
EF2354 hypothetical protein	1.2	2.911e-03
EF0268 lysyl-tRNA synthetase	1.3	2.915e-03
EF2182 ABC transporter P-binding protein	1.2	2.917e-03
EF1416 glucose-6-phosphate isomerase	1.2	2.931e-03
EF1029 hypothetical protein	1.4	2.941e-03
EF0342 hypothetical protein	1.3	3.008e-03
EF1584 cysteine synthase A	1.3	3.018e-03
EF2342 hypothetical protein	1.3	3.025e-03
EF2276 hypothetical protein	1.4	3.025e-03
EF2750 conserved hypothetical protein	1.5	3.149e-03
EF1422 transcriptional regulator	1.2	3.206e-03
EF1251 hypothetical protein	1.4	3.284e-03
EF1437 hypothetical protein	1.3	3.315e-03
EF0665 hypothetical protein	1.3	3.408e-03
EF1039 hydrolase haloacid dehalogenase-like family	1.2	3.408e-03
EF2427 hypothetical protein	1.4	3.408e-03
EF1408 ABC transporter P-binding protein	1.2	3.504e-03
EF0019 PTS system component	1.2	3.584e-03
EF0134 hypothetical protein	1.4	3.662e-03
EF1212 transcriptional regulator	1.2	3.729e-03
EF2190 glycosyl transferase domain protein	1.2	3.729e-03
EF0252 autolysin	1.3	3.763e-03
EF1317 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	1.2	3.777e-03
EF2364 xanthine/uracil permease family protein	1.4	3.808e-03
EF0076 oxidoreductase short chain dehydrogenase/reductase family	1.3	3.867e-03
EF2922 conserved hypothetical protein	1.3	3.944e-03
EF0930 methionyl-tRNA synthetase	1.3	3.965e-03
EF0699 hypothetical protein	1.3	4.037e-03
EF1918 conserved hypothetical protein	1.2	4.083e-03

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF3111 acyl carrier protein	1.2	2.252e-03
EF2601 conserved hypothetical protein	1.2	2.287e-03
EF0760 amino acid ABC transporter P-binding protein	1.2	2.382e-03
EF0056 ABC transporter P-binding protein	1.3	2.383e-03
EF0834 PTS system component	1.4	2.388e-03
EF2788 glucokinase putative	1.2	2.401e-03
EF2873 Pase of unknown function subfamily putative	1.3	2.409e-03
EF0186 purine nucleoside phosphorylase	1.2	2.410e-03
EF0239 cobalt transport protein	1.2	2.418e-03
EF0256 peptidyl-tRNA hydrolase	1.3	2.438e-03
EF0037 gamma-glutamyl phosphate reductase	1.3	2.616e-03
EF1341 ABC transporter P-binding protein	1.2	2.626e-03
EF0957 glycosyl transferase family 65	1.7	2.638e-03
EF2751 hypothetical protein	1.4	2.819e-03
EF2850 conserved hypothetical protein	1.3	2.782e-03
EF0057 ABC 3 transport family protein	1.4	2.785e-03
EF1363 HMG-CoA synthase	1.2	2.786e-03
EF0261 conserved hypothetical protein	1.2	2.840e-03
EF2855 integrase phage family	1.3	2.875e-03
EF2188 conserved domain protein	1.2	2.885e-03
EF2354 hypothetical protein	1.2	2.911e-03
EF0268 lysyl-tRNA synthetase	1.3	2.915e-03
EF2182 ABC transporter P-binding protein	1.2	2.917e-03
EF1416 glucose-6-phosphate isomerase	1.2	2.931e-03
EF1029 hypothetical protein	1.4	2.941e-03
EF0342 hypothetical protein	1.3	3.008e-03
EF1584 cysteine synthase A	1.3	3.018e-03
EF2342 hypothetical protein	1.3	3.025e-03
EF2276 hypothetical protein	1.4	3.025e-03
EF2750 conserved hypothetical protein	1.5	3.149e-03
EF1422 transcriptional regulator	1.2	3.206e-03
EF1251 hypothetical protein	1.4	3.284e-03
EF1437 hypothetical protein	1.3	3.315e-03
EF0665 hypothetical protein	1.3	3.408e-03
EF1039 hydrolase haloacid dehalogenase-like family	1.2	3.408e-03
EF2427 hypothetical protein	1.4	3.408e-03
EF0019 PTS system component	1.2	3.504e-03
EF0134 hypothetical protein	1.2	3.584e-03
EF1212 transcriptional regulator	1.4	3.662e-03
EF2190 glycosyl transferase domain protein	1.2	3.729e-03
EF0252 autolysin	1.2	3.729e-03
EF1317 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	1.3	3.763e-03
EF2364 xanthine/uracil permease family protein	1.2	3.777e-03
EF0076 oxidoreductase short chain dehydrogenase/reductase family	1.4	3.808e-03
EF2922 conserved hypothetical protein	1.3	3.867e-03
EF0930 methionyl-tRNA synthetase	1.3	3.944e-03
EF0699 hypothetical protein	1.3	3.965e-03
EF1918 conserved hypothetical protein	1.3	4.037e-03
EF3119 conserved hypothetical protein TIGR00157	1.2	4.083e-03

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF0996 cell division protein FtsA	1.2	4.089e-03
EF0920 conserved hypothetical protein	1.2	4.192e-03
EF3030 PTS system component	1.3	4.212e-03
EF2186 conserved domain protein	1.4	4.228e-03
EF3015 sodium/dicarboxylate symporter family protein	1.2	4.251e-03
EF2166 conserved hypothetical protein	1.6	4.260e-03
EF1773 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	1.3	4.260e-03
EF2210 conserved hypothetical protein	1.4	4.295e-03
EF0889 hypothetical protein	1.2	4.412e-03
EF1906 conserved hypothetical protein UPF0005	1.3	4.582e-03
EF0403 transcriptional regulator MarR family	1.2	4.585e-03
EF2455 hypothetical protein	1.3	4.618e-03
EF1198 conserved hypothetical protein	1.3	4.726e-03
EF2722 L-serine dehydratase iron-sulfur-dependent alpha subunit	1.3	4.754e-03
EF0907 peptide ABC transporter peptide-binding protein putative	1.2	4.896e-03
EF1433 conserved hypothetical protein	1.2	5.011e-03
EF2903 ABC transporter substrate-binding protein	1.2	4.898e-03
EF0038 glutamate 5-kinase	1.2	4.910e-03
EF3120 serine/threonine protein kinase	1.3	4.925e-03
EF1115 phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit	1.2	5.006e-03
EF0635 amino acid permease	1.2	5.032e-03
EF2593 ABC transporter P-binding/permease protein	1.3	5.047e-03
EF1547 cytidylate kinase	1.3	5.214e-03
EF0296 Na ⁺ /H ⁺ exchanger family protein	1.2	5.223e-03
EF0368 aspartokinase putative	1.3	5.243e-03
EF3067 hydrolase haloacid dehalogenase-like family	1.3	5.244e-03
EF1009 P-dependent RNA helicase DEAD/DEAH box family	1.3	5.283e-03
EF3007 conserved hypothetical protein	1.2	5.312e-03
EF1021 conserved hypothetical protein	1.4	5.397e-03
EF1194 sensory box histidine kinase VicK	1.3	5.635e-03
EF2157 conserved hypothetical protein TIGR00159	1.2	5.663e-03
EF0835 hypothetical protein	1.2	5.689e-03
EF2667 copper homeostasis protein	1.4	5.803e-03
EF0139 FtsK/SpoIIIE family protein	1.4	5.926e-03
EF3057 hypothetical protein	1.5	6.021e-03
EF1428 hypothetical protein	1.2	6.044e-03
EF2490 hypothetical protein	1.2	6.098e-03
EF3266 Ham1 family protein	1.2	6.180e-03
EF1163 L-asparaginase putative	1.2	6.232e-03
EF2634 chaperonin 10 kDa	1.2	6.244e-03
EF0657 transcriptional regulator DeoR family	1.2	6.244e-03
EF1275 ribosome-binding factor A	1.2	6.262e-03
EF0722 DNA ligase	1.2	6.279e-03
EF0903 mevalonate diphosphate decarboxylase	1.3	6.585e-03
EF0780 MutT/nudix family protein	1.2	6.909e-03
EF2605 UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1.2	6.979e-03
EF0648 nitroreductase family protein	1.3	7.011e-03
EF3217 helicase conserved C-terminal domain protein	1.2	7.037e-03
EF2513 hypothetical protein	1.2	7.114e-03

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF2760 conserved hypothetical protein	1.3	7.387e-03
EF0078 conserved hypothetical protein	1.2	7.443e-03
EF2391 NifU-related protein	1.3	7.443e-03
EF1572 hypothetical protein	1.2	7.535e-03
EF3329 DNA-binding response regulator	1.2	7.591e-03
EF1586 NADH oxidase	1.3	7.591e-03
EF1069 galactokinase	1.2	7.595e-03
EF1183 aspartate-semialdehyde dehydrogenase putative	1.2	7.693e-03
EF0121 hypothetical protein	1.2	7.732e-03
EF0584 ABC transporter P-binding protein	1.3	7.732e-03
EF1169 UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1.3	7.734e-03
EF0093 LPX-motif cell wall anchor domain protein	1.2	7.734e-03
EF0703 conserved hypothetical protein	1.2	7.829e-03
EF1371 conserved hypothetical protein	1.5	7.913e-03
EF0601 Bacterial regulatory proteins tetR family domain protein	1.2	7.965e-03
EF2461 inositol monophosphate family protein putative	1.2	7.939e-03
EF2295 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family prote	1.2	8.113e-03
EF2367 autolysin	1.3	8.219e-03
EF2659 conserved hypothetical protein	1.2	8.262e-03
EF1473 minor capsid protein putative	1.2	8.302e-03
EF0202 phosphomethylpyrimidine kinase putative	1.4	8.401e-03
EF2625 NH(3)-dependent NAD+ synthetase	1.2	8.401e-03
EF2615 hypothetical protein	1.2	8.470e-03
EF2180 glycosyl transferase domain protein	1.2	8.470e-03
aggregation substance Asa1	1.2	8.500e-03
EF2438 PTS system component	1.2	8.534e-03
EF2860 hypothetical protein	1.2	8.746e-03
EF0941 ABC transporter P-binding/permease protein	1.3	8.746e-03
EF0700 hemolysin	1.3	8.886e-03
EF3083 iron compound ABC transporter P-binding protein	1.2	8.914e-03
EF1280 conserved hypothetical protein	1.4	8.952e-03
EF3148 CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltran	1.3	9.120e-03
EF2607 P synthase F1 epsilon subunit	1.2	9.125e-03
EF1485 hypothetical protein	1.3	9.149e-03
EF1185 conserved hypothetical protein	1.2	9.184e-03
EF1147 P synthase	1.2	9.431e-03
EF0280 cation efflux family protein	1.2	9.820e-03
EF1613 pflB formate acetyltransferase	1.3	9.820e-03
EF2303 conserved hypothetical protein	1.5	9.999e-03
EF3029 PTS system component	1.3	1.005e-02
EF2469 transcriptional regulator	1.5	1.006e-02
EF0419 hypothetical protein	1.2	1.020e-02
EF1138 oxidoreductase aldo/keto reductase family	1.4	1.028e-02
EF0209 ribosomal protein L2	1.2	1.034e-02
EF2404 hypothetical protein	1.2	1.036e-02
EF1509 hypothetical protein	1.2	1.036e-02
EF2731 ribosomal protein L33	1.2	1.037e-02
EF2871 conserved hypothetical protein TIGR00482	1.2	1.050e-02
EF2876 acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase beta subunit	1.2	1.060e-02

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF2108 hypothetical protein	1.2	1.067e-02
conserved domain protein	1.6	1.067e-02
EF3096 chromosome segregation SMC protein putative	1.2	1.077e-02
EF3306 PTS system component	1.2	1.086e-02
EF0942 ABC transporter P-binding/permease protein	1.3	1.094e-02
EF2620 preprotein translocase SecG subunit	1.3	1.116e-02
EF0799 autolysin	1.4	1.159e-02
EF0132 hypothetical protein	1.2	1.161e-02
EF1093 LPX-motif cell wall anchor domain protein	1.4	1.166e-02
EF3041 peptide ABC transporter peptide-binding protein putative	1.2	1.190e-02
EF0915 ribosomal protein L35	1.3	1.202e-02
EF2528 transcriptional regulator	1.2	1.204e-02
EF0006 DNA gyrase A subunit	1.4	1.220e-02
EF2930 conserved hypothetical protein	1.2	1.244e-02
EF2919 ABC transporter P-binding/permease protein	1.4	1.246e-02
EF0158 conjugal transfer protein	1.3	1.250e-02
EF0394 secreted antigen SagA	1.3	1.277e-02
EF1243 glycosyl hydrolase family 1	1.4	1.287e-02
EF2534 hypothetical protein	1.3	1.300e-02
EF1421 gp35	1.6	1.318e-02
EF2703 transcriptional regulator	1.2	1.337e-02
EF0878 DNA polymerase I	1.3	1.348e-02
EF0851 hypothetical protein	1.3	1.358e-02
EF0671 dipeptidase	1.2	1.356e-02
EF2478 conserved hypothetical protein	1.2	1.370e-02
EF0221 ribosomal protein L6	1.2	1.372e-02
EF0919 acetyltransferase GN family	1.1	1.381e-02
EF0477 hypothetical protein	1.2	1.381e-02
EF2094	1.2	1.386e-02
EF2104	1.4	1.424e-02
EF0098 L-serine dehydratase iron-sulfur-dependent beta subunit	1.5	1.489e-02
EF1271 N utilization substance protein A	1.3	1.491e-02
EF0960 hypothetical protein	1.2	1.494e-02
EF0970 ribosomal protein L27	1.3	1.496e-02
EF1170 transcription termination factor Rho	1.2	1.501e-02
EF0407 Helix-turn-helix domain fis-type protein putative	1.2	1.533e-02
EF0984 DNA repair protein RecN	1.3	1.527e-02
EF3193 conserved hypothetical protein TIGR00659	1.2	1.561e-02
replication-associated protein RepB	1.3	1.591e-02
EF1451 hypothetical protein	1.2	1.623e-02
EF3271 hypothetical protein	1.2	1.640e-02
conserved domain protein	1.2	1.642e-02
EF1537 integrase/recombinase XerD	1.2	1.654e-02
EF2440 glucosidase putative	1.2	1.655e-02
EF0660 ME efflux family protein	1.1	1.683e-02
EF0885 hypothetical protein	1.2	1.704e-02
EF3051 hypothetical protein	1.2	1.708e-02
EF1302 transcriptional regulator LysR family putative	1.3	1.744e-02
EF2167 glycosyl transferase domain protein	1.4	1.776e-02

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF0128 hypothetical protein	1.2	1.776e-02
EF3155 hypothetical protein	1.2	1.777e-02
EF1047 conserved hypothetical protein	1.2	1.781e-02
EF1225 thiamin biosynthesis ApbE putative	1.2	1.856e-02
EF0943 hypothetical protein	1.2	1.873e-02
EF3032 conserved hypothetical protein	1.2	1.887e-02
EF2755 anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating p	1.4	1.922e-02
EF1538 COG1354 family protein	1.2	1.925e-02
EF1171 ribosomal protein L31	1.2	1.925e-02
EF0774 conserved domain protein	1.2	1.944e-02
EF2527 conserved hypothetical protein	1.4	1.947e-02
EF2414 phoH family protein	1.3	1.948e-02
EF3072 BioY family protein putative	1.2	1.986e-02
pheromone shutdown protein TraB	1.3	1.989e-02
EF3073 Signal peptidase I	1.2	2.003e-02
EF2266 2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-o	1.2	2.036e-02
EF1365 hypothetical protein	1.2	2.114e-02
EF0715 trigger factor	1.2	2.087e-02
restriction endonuclease related protein	1.2	2.095e-02
EF3277 cytosine permease putative	1.2	2.095e-02
EF2471 arginyl-tRNA synthetase	1.4	2.112e-02
EF0380 conserved hypothetical protein	1.2	2.114e-02
EF1181 nitroreductase family protein	1.2	2.176e-02
EF0997 cell division protein FtsZ	1.2	2.155e-02
EF2405 hypothetical protein	1.2	2.155e-02
EF1023 conserved domain protein	1.2	2.176e-02
EF2036 hypothetical protein	1.2	2.190e-02
EF2729 transcription antitermination protein NusG	1.2	2.198e-02
EF1549 P-binding protein	1.2	2.198e-02
EF0452 AMP-binding family protein	1.4	2.201e-02
EF1260 DNA-binding response regulator	1.2	2.204e-02
EF0726 glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase B subunit	1.1	2.207e-02
EF0102 transcriptional regulator putative	1.2	2.219e-02
EF1838 PTS system component	1.2	2.221e-02
EF1614	1.3	2.221e-02
EF2485 ABC transporter permease protein putative	1.2	2.228e-02
EF0476 ferrous iron transport protein B	1.2	2.248e-02
EF1116 phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	1.2	2.276e-02
EF0397 conserved hypothetical protein	1.2	2.291e-02
EF1585 ferric uptake regulator family protein	1.3	2.297e-02
EF2811 conserved domain protein	1.2	2.304e-02
EF1472 hypothetical protein	1.2	2.309e-02
EF1319 conserved domain protein	1.4	2.309e-02
EF1432 hypothetical protein	1.3	2.309e-02
EF2395 ribosome recycling factor	1.2	2.316e-02
EF2428 conserved hypothetical protein	1.2	2.333e-02
EF1321 permease putative	1.2	2.367e-02
EF1095 hypothetical protein	1.2	2.377e-02
EF2599 transcription antiterminator BglG family	1.3	2.379e-02

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF3313 hypothetical protein	1.2	2.391e-02
EF1364 acetyl-CoA acetyltransferase	1.1	2.398e-02
EF1515 transcription antiterminator BglG family protein	1.1	2.405e-02
EF2110	1.2	2.434e-02
EF1435 recombination protein U putative	1.4	2.465e-02
EF1608 cardiolipin synthetase putative	1.2	2.465e-02
EF0262 S1 RNA binding domain protein	1.2	2.492e-02
EF1146 DNA-directed RNA polymerase delta subunit putative	1.1	2.520e-02
EF0228 adenylate kinase	1.2	2.567e-02
EF0447 menaquinone-specific isochorismate synthase putative	1.2	2.568e-02
EF3066 polypeptide deformylase	1.2	2.595e-02
EF2752 ABC transporter P-binding protein	1.2	2.620e-02
EF0616 ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family protein	1.2	2.644e-02
EF2715 ribosomal protein L7/L12	1.2	2.671e-02
EF0105 ornithine carbamoyltransferase catabolic	1.2	2.693e-02
EF0853 hypothetical protein	1.1	2.711e-02
EF0882 replication initiation and membrane attachment protein putative	1.2	2.714e-02
EF0211 ribosomal protein L22	1.2	2.744e-02
EF2705 recX family protein	1.3	2.751e-02
EF2093 endolysin domain-containing protein	1.2	2.757e-02
EF2872 conserved hypothetical protein TIGR00253	1.3	2.776e-02
EF1964 Gap!!glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.1	2.811e-02
EF0001 chromosomal replication initiator protein DnaA	1.4	2.826e-02
EF1544 conserved hypothetical protein	1.1	2.827e-02
EF0877 oxidoreductase aldo/keto reductase 2 family	1.4	2.835e-02
EF0178 sugar ABC transporter P-binding protein	1.2	2.884e-02
EF2857 penicillin-binding protein Pbp2B	1.2	2.890e-02
conserved domain protein	1.2	2.984e-02
EF0686 hypothetical protein	1.2	2.984e-02
EF3317 oxaloacetate decarboxylase alpha subunit	1.2	2.996e-02
EF0727 conserved hypothetical protein TIGR00147	1.2	2.996e-02
EF0320 hypothetical protein	1.1	2.996e-02
EF0336 hypothetical protein	1.3	3.006e-02
EF0716 hypothetical protein	1.1	3.019e-02
EF3084 iron compound ABC transporter permease protein	1.2	3.023e-02
EF1948 conserved hypothetical protein	1.3	3.071e-02
EF0973 proline dipeptidase putative	1.2	3.091e-02
EF3303 antigen 67 kDa	1.1	3.096e-02
EF0730 thioredoxin family protein	1.2	3.096e-02
EF3054 conserved hypothetical protein	1.2	3.170e-02
EF0324 hypothetical protein	1.2	3.166e-02
EF0818 polysaccharide lyase family 8	1.3	3.180e-02
EF0236 peptidase M20/M25/M40 family	1.2	3.180e-02
EF2542 conserved domain protein	1.2	3.180e-02
EF1228 hypothetical protein	1.4	3.180e-02
EF0040 DNA repair protein Rada	1.2	3.180e-02
EF1145 conserved hypothetical protein	1.2	3.180e-02
EF2309 hypothetical protein	1.2	3.204e-02
EF0782 Sigma-54 factor family protein	1.2	3.231e-02

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF1160 PTS system component	1.2	3.241e-02
EF2215 hypothetical protein	1.3	3.255e-02
EF0817 PTS system component	1.2	3.284e-02
EF3060 secreted antigen SagaA putative	1.2	3.284e-02
EF3094 cell division protein FtsY	1.1	3.296e-02
EF2316 conserved hypothetical protein	1.2	3.284e-02
EF0519 hypothetical protein	1.2	3.284e-02
EF3069 formate/nitrite transporter family protein	1.3	3.294e-02
EF1414 conserved hypothetical protein TIGR00275	1.2	3.307e-02
EF2492 glycosyl transferase domain protein	1.2	3.308e-02
EF2067 conserved hypothetical protein TIGR00481	1.1	3.322e-02
EF0794 conserved hypothetical protein	1.4	3.355e-02
EF3321 citrate lyase gamma subunit	1.2	3.396e-02
EF2963 esterase putative	1.1	3.451e-02
EF2114 adenine methyltransferase	1.3	3.489e-02
EF3187 LPX-motif cell wall anchor domain protein	1.3	3.492e-02
EF2932 AhpC/TSA family protein	1.2	3.604e-02
pheromone binding protein	1.2	3.622e-02
EF0913 transposase-like protein PS3IS	1.2	3.635e-02
EF2219 histidine kinase	1.2	3.635e-02
EF0687 HIT family protein	1.2	3.635e-02
EF2230 hypothetical protein	1.2	3.635e-02
EF3265 dihydropteroate synthase	1.2	3.635e-02
EF1165 conserved hypothetical protein	1.2	3.732e-02
EF2189 conserved hypothetical protein	1.1	3.661e-02
EF1268 cation-transporting Pase E1-E2 family	1.3	3.663e-02
hypothetical protein	1.2	3.680e-02
EF2193 dTDP-4-dehydrorhamnose 3 5-epimerase	1.2	3.750e-02
EF0231 ribosomal protein S13	1.1	3.750e-02
EF0168 pantothenate kinase	1.2	3.772e-02
EF2198 glycosyl transferase domain protein	1.2	3.772e-02
EF3268 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine pyropl	1.1	3.772e-02
EF0664 hypothetical protein	1.2	3.798e-02
EF1816 conserved hypothetical protein	1.2	3.798e-02
EF3079 acetyltransferase GN family	1.3	3.829e-02
EF3108 peptide ABC transporter permease protein	1.1	3.829e-02
EF1328 transcriptional regulator GntR family	1.2	3.829e-02
EF2085 hypothetical protein	1.1	3.853e-02
EF0212 ribosomal protein S3	1.4	3.880e-02
EF2213 PTS system component	1.1	3.895e-02
EF2911 DNA-binding response regulator	1.1	3.895e-02
EF1310 dnaJ protein	1.1	3.948e-02
EF3078 conserved hypothetical protein	1.1	3.948e-02
EF0446 O-succinylbenzoic acid--CoA ligase putative	1.2	4.058e-02
EF0896 queuine tRNA-ribosyltransferase	1.2	4.089e-02
EF0967 hypothetical protein	1.1	4.105e-02
EF3256 lipoprotein putative	1.2	4.111e-02
EF2775 phosphomethylpyrimidine kinase	1.2	4.116e-02
EF2608 P synthase F1 beta subunit	1.2	4.166e-02

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Identificación del gen y función	diff expr.	Valor P
EF0058 transcriptional regulator	1.1	4.227e-02
EF1442 hypothetical protein	1.1	4.227e-02
EF1232 sugar ABC transporter sugar-binding protein	1.3	4.231e-02
EF0297 transcriptional repressor CopY	1.2	4.232e-02
EF3173 conserved hypothetical protein	1.1	4.239e-02
EF1403 conserved hypothetical protein	1.2	4.265e-02
EF1668 transcriptional regulator MarR family	1.1	4.271e-02
EF1431 hypothetical protein	1.2	4.275e-02
EF0400 conserved hypothetical protein	1.2	4.329e-02
EF2397 translation elongation factor Ts	1.1	4.322e-02
EF0117 transcriptional regulator GntR family	1.2	4.393e-02
EF0862 amino acid ABC transporter permease protein	1.2	4.394e-02
EF2096 tail protein	1.2	4.394e-02
EF3034 transcriptional regulator GntR family	1.3	4.420e-02
EF1427 hypothetical protein	1.2	4.420e-02
replication protein	1.1	4.499e-02
EF1427 hypothetical protein	1.2	4.525e-02
EF2158 pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase	1.3	4.627e-02
EF0371 aminotransferase class-V	1.2	4.653e-02
EF2698 tellurite resistance protein	1.2	4.684e-02
EF3126 DNA-directed RNA polymerase omega subunit putative	1.2	4.757e-02
EF0638 conserved hypothetical protein	1.1	4.765e-02
EF3241 hypothetical protein	1.3	4.765e-02
EF0065 conserved hypothetical protein	1.2	4.783e-02
EF1313 sprT protein	1.2	4.791e-02
EF2583 conserved hypothetical protein	1.2	4.801e-02
EF0761 amino acid ABC transporter permease protein	1.1	4.814e-02
EF0199 ribosomal protein S7	1.1	4.875e-02
EF0717 PTS system fructose-specific transporter subunit IIABC	1.2	4.876e-02
EF0011 conserved hypothetical protein	1.2	4.876e-02
EF0898 hypothetical protein	1.1	4.908e-02
EF0110 transcriptional regulator ArsR family	1.2	4.920e-02
EF0582 hypothetical protein	1.2	4.967e-02
EF2406 glycyl-tRNA synthetase beta subunit	1.3	4.986e-02
EF1028 hydrolase alpha/beta hydrolase fold family	1.1	4.992e-02
EF1499 V-type Pase subunit B	1.5	4.998e-02

Tabla S1: Genes que presentan una expresión estadísticamente significativa en la cepa V583 LexA- respecto a V583 WT. Se indica el gen, su función, su diferencia de expresión (diff expr.) y el valor P. En negrita están los genes cuya expresión aumenta.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Aakra, A., H. Vebø, L. Snipen, H. Hirt, A. Aastveit, V. Kapur, G. Dunny, B. E. Murray, B. Murray, and I. F. Nes, 2005, Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* V583 to erythromycin: Antimicrob Agents Chemother, v. 49, p. 2246-59.
- Abella, M., I. Erill, M. Jara, G. Mazón, S. Campoy, and J. Barbé, 2004, Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum: Mol Microbiol, v. 54, p. 212-22.
- Abraham, E. P., and E. Chain, 1988, An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940: Rev Infect Dis, v. 10, p. 677-8.
- Abranches, J., A. R. Martinez, J. K. Kajfasz, V. Chávez, D. A. Garsin, and J. A. Lemos, 2009, The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*: J Bacteriol, v. 191, p. 2248-56.
- Abrantes, M. C., M. e. F. Lopes, and J. Kok, 2011, Impact of manganese, copper and zinc ions on the transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583: PLoS One, v. 6, p. e26519.
- Ackerley, D. F., Y. Barak, S. V. Lynch, J. Curtin, and A. Matin, 2006, Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12: J Bacteriol, v. 188, p. 3371-81.
- Acosta, M. B., R. C. Ferreira, G. Padilla, L. C. Ferreira, and S. O. Costa, 2000, Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains: J Med Microbiol, v. 49, p. 409-13.
- Aertsen, A., and C. W. Michiels, 2005, Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*: Mol Microbiol, v. 58, p. 1381-91.
- Aminov, R. I., 2010, A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future: Front Microbiol, v. 1, p. 134.
- Amoils, S., 2004, Under attack! SOS!: Nat Rev Micro, v. 2, p. 852-852.
- Andersen, R. N., N. Ganeshkumar, and P. E. Kolenbrander, 1993, Cloning of the *Streptococcus gordonii* PK488 gene, encoding an adhesin which mediates coaggregation with *Actinomyces naeslundii* PK606: Infect Immun, v. 61, p. 981-7.
- Anderson, D. G., J. J. Churchill, and S. C. Kowalczykowski, 1999, A single mutation, RecB(D1080A), eliminates RecA protein loading but not Chi recognition by RecBCD enzyme: J Biol Chem, v. 274, p. 27139-44.
- Andrews, J., J. Ashby, G. Jevons, T. Marshall, N. Lines, and R. Wise, 2000, A comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998: J Antimicrob Chemother, v. 45, p. 285-93.
- Arbeloa, A., H. Segal, J. E. Hugonnet, N. Josseaume, L. Dubost, J. P. Brouard, L. Gutmann, D. Mengin-Lecreulx, and M. Arthur, 2004, Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*: J Bacteriol, v. 186, p. 1221-8.
- Archibald, A. R., I. C. Hancock, and C. R. Harwood, 1993, Cell Wall Structure, Synthesis, and Turnover, *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, American Society of Microbiology.
- Arduino, R. C., B. E. Murray, and R. M. Rakita, 1994, Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci: Infect Immun, v. 62, p. 987-93.
- Argüello, J. M., D. Raimunda, and T. Padilla-Benavides, 2013, Mechanisms of copper homeostasis in bacteria: Front Cell Infect Microbiol, v. 3, p. 73.
- Arias, C. A., and B. E. Murray, 2008, Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections: Expert Rev Anti Infect Ther, v. 6, p. 637-55.
- Arias, C. A., and B. E. Murray, 2012, The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance: Nat Rev Microbiol, v. 10, p. 266-78.
- Arias, C. A., and B. E. Murray, 2015, A new antibiotic and the evolution of resistance: N Engl J Med, v. 372, p. 1168-70.

- Arias, C. A., D. Panesso, D. M. McGrath, X. Qin, M. F. Mojica, C. Miller, L. Diaz, T. T. Tran, S. Rincon, E. M. Barbu, J. Reyes, J. H. Roh, E. Lobos, E. Sodergren, R. Pasqualini, W. Arap, J. P. Quinn, Y. Shamoo, B. E. Murray, and G. M. Weinstock, 2011, Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci: *N Engl J Med*, v. 365, p. 892-900.
- Arsène, S., and R. Leclercq, 2007, Role of a qnr-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, p. 3254-8.
- Au, K. G., M. Cabrera, J. H. Miller, and P. Modrich, 1988, *Escherichia coli* mutY gene product is required for specific A-G----C.G mismatch correction: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 9163-6.
- Au, N., E. Kuester-Schoeck, V. Mandava, L. E. Bothwell, S. P. Canny, K. Chachu, S. A. Colavito, S. N. Fuller, E. S. Groban, L. A. Hensley, T. C. O'Brien, A. Shah, J. T. Tierney, L. L. Tomm, T. M. O'Gara, A. I. Goranov, A. D. Grossman, and C. M. Lovett, 2005, Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system: *J Bacteriol*, v. 187, p. 7655-66.
- Austin, D. J., M. J. Bonten, R. A. Weinstein, S. Slaughter, and R. M. Anderson, 1999, Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 6908-13.
- Bagdasarian, M., A. Bailone, M. M. Bagdasarian, P. A. Manning, R. Lurz, K. N. Timmis, and R. Devore, 1986, An inhibitor of SOS induction, specified by a plasmid locus in *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 83, p. 5723-6.
- Bagg, A., C. J. Kenyon, and G. C. Walker, 1981, Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 78, p. 5749-53.
- Baharoglu, Z., and D. Mazel, 2014, SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions: *FEMS Microbiol Rev*, v. 38, p. 1126-45.
- Ball, P. R., S. W. Shales, and I. Chopra, 1980, Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 93, p. 74-81.
- Barbé, J., J. A. Vericat, J. Cairó, and R. Guerrero, 1985, Further characterization of SOS system induction in recBC mutants of *Escherichia coli*: *Mutat Res*, v. 146, p. 23-32.
- Baroud, M., I. Dandache, G. F. Araj, R. Wakim, S. Kanj, Z. Kanafani, M. Khairallah, A. Sabra, M. Shehab, G. Dbaibo, and G. M. Matar, 2013, Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases: *Int J Antimicrob Agents*, v. 41, p. 75-9.
- Baureder, M., and L. Hederstedt, 2012, Genes important for catalase activity in *Enterococcus faecalis*: *PLoS One*, v. 7, p. e36725.
- Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor, 2004, SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes: *Nature*, v. 427, p. 72-4.
- Bellio, P., F. Brisdelli, M. Perilli, A. Sabatini, C. Bottoni, B. Segatore, D. Setacci, G. Amicosante, and G. Celenza, 2014, Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in *Escherichia coli*: *Phytomedicine*, v. 21, p. 430-4.
- Bhavsar, A. P., and E. D. Brown, 2006, Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms: *Mol Microbiol*, v. 60, p. 1077-90.
- Bi, E., and J. Lutkenhaus, 1993, Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring: *J Bacteriol*, v. 175, p. 1118-25.
- Bierne, H., and P. Cossart, 2007, *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 71, p. 377-97.
- Blair, J. M., M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. Piddock, 2015, Molecular mechanisms of antibiotic resistance: *Nat Rev Microbiol*, v. 13, p. 42-51.
- Bonner, C. A., S. Hays, K. McEntee, and M. F. Goodman, 1990, DNA polymerase II is encoded by the DNA damage-inducible *dinA* gene of *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, p. 7663-7.
- Bonner, C. A., S. K. Randall, C. Rayssiguier, M. Radman, R. Eriřa, B. E. Kaplan, K. McEntee, and M. F. Goodman, 1988, Purification and characterization of an inducible *Escherichia coli* DNA

polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA: *J Biol Chem*, v. 263, p. 18946-52.

Borek, E., and A. Ryan, 1958, THE TRANSFER OF IRRADIATION-ELICITED INDUCTION IN A LYSOGENIC ORGANISM: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 44, p. 374-7.

Bork, J. M., M. M. Cox, and R. B. Inman, 2001, The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single-stranded DNA: *EMBO J*, v. 20, p. 7313-22.

Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett, 2009, Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America: *Clin Infect Dis*, v. 48, p. 1-12.

Bourgogne, A., D. A. Garsin, X. Qin, K. V. Singh, J. Sillanpaa, S. Yerrapragada, Y. Ding, S. Dugan-Rocha, C. Buhay, H. Shen, G. Chen, G. Williams, D. Muzny, A. Maadani, K. A. Fox, J. Gioia, L. Chen, Y. Shang, C. A. Arias, S. R. Nallapareddy, M. Zhao, V. P. Prakash, S. Chowdhury, H. Jiang, R. A. Gibbs, B. E. Murray, S. K. Highlander, and G. M. Weinstock, 2008, Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF: *Genome Biol*, v. 9, p. R110.

Brandsma, J. A., D. Bosch, M. de Ruÿter, and P. van de Putte, 1985, Analysis of the regulatory region of the *ssb* gene of *Escherichia coli*: *Nucleic Acids Res*, v. 13, p. 5095-109.

Brinster, S., B. Posteraro, H. Bierre, A. Alberti, S. Makhzami, M. Sanguinetti, and P. Serror, 2007, Enterococcal leucine-rich repeat-containing protein involved in virulence and host inflammatory response: *Infect Immun*, v. 75, p. 4463-71.

BROCK, T. D., B. PEACHER, and D. PIERSON, 1963, SURVEY OF THE BACTERIOCINES OF ENTEROCOCCI: *J Bacteriol*, v. 86, p. 702-7.

Burckhardt, S. E., R. Woodgate, R. H. Scheuermann, and H. Echols, 1988, UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 1811-5.

Burns, E. H., A. M. Marciel, and J. M. Musser, 1996, Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease: *Infect Immun*, v. 64, p. 4744-50.

Byappanahalli, M. N., M. B. Nevers, A. Korajkic, Z. R. Staley, and V. J. Harwood, 2012, Enterococci in the environment: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 76, p. 685-706.

Cambray, G., N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, E. Guerin, S. Da Re, B. González-Zorn, M. C. Ploy, J. Barbé, D. Mazel, and I. Erill, 2011, Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons: *Mob DNA*, v. 2, p. 6.

Campoy, S., A. Hervàs, N. Busquets, I. Erill, L. Teixidó, and J. Barbé, 2006, Induction of the SOS response by bacteriophage lytic development in *Salmonella enterica*: *Virology*, v. 351, p. 360-7.

Canepari, P., M. M. Lleò, G. Cornaglia, R. Fontana, and G. Satta, 1986, In *Streptococcus faecium* penicillin-binding protein 5 alone is sufficient for growth at sub-maximal but not at maximal rate: *J Gen Microbiol*, v. 132, p. 625-31.

Carrasco, B., S. Ayora, R. Lurz, and J. C. Alonso, 2005, *Bacillus subtilis* RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities: *Nucleic Acids Res*, v. 33, p. 3942-52.

Centeno, J. A., S. Menendez, M. Hermida, and J. L. Rodríguez-Otero, 1999, Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture: *Int J Food Microbiol*, v. 48, p. 97-111.

Chang, S., D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. Shah, J. T. Rudrik, G. R. Pupp, W. J. Brown, D. Cardo, S. K. Fridkin, and V.-R. S. a. I. Team, 2003, Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene: *N Engl J Med*, v. 348, p. 1342-7.

Chirouze, C., E. Athan, F. Alla, V. H. Chu, G. Ralph Corey, C. Selton-Suty, M. L. Erpelding, J. M. Miro, L. Olaison, B. Hoen, and I. C. o. E. S. Group, 2013, Enterococcal endocarditis in the beginning of the 21st century: analysis from the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study: *Clin Microbiol Infect*, v. 19, p. 1140-7.

Chopra, I., L. Hesse, and A. J. O'Neill, 2002, Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs: *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, p. 4S-15S.

- Chow, J. W., L. A. Thal, M. B. Perri, J. A. Vazquez, S. M. Donabedian, D. B. Clewell, and M. J. Zervos, 1993, Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, p. 2474-7.
- Churchill, J. J., and S. C. Kowalczykowski, 2000, Identification of the RecA protein-loading domain of RecBCD enzyme: *J Mol Biol*, v. 297, p. 537-42.
- Cirz, R. T., J. K. Chin, D. R. Andes, V. de Crécy-Lagard, W. A. Craig, and F. E. Romesberg, 2005, Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance: *PLoS Biol*, v. 3, p. e176.
- Cirz, R. T., B. M. O'Neill, J. A. Hammond, S. R. Head, and F. E. Romesberg, 2006, Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin: *J Bacteriol*, v. 188, p. 7101-10.
- Clancy, J., J. Petitpas, F. Dib-Hajj, W. Yuan, M. Cronan, A. V. Kamath, J. Bergeron, and J. A. Retsema, 1996, Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*: *Mol Microbiol*, v. 22, p. 867-79.
- Clark, N. C., R. C. Cooksey, B. C. Hill, J. M. Swenson, and F. C. Tenover, 1993, Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, p. 2311-7.
- Clewell, D. B., P. K. Tomich, M. C. Gawron-Burke, A. E. Franke, Y. Yagi, and F. Y. An, 1982, Mapping of *Streptococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAD2 and studies relating to transposition of Tn917: *J Bacteriol*, v. 152, p. 1220-30.
- Comenge, Y., R. Quintiliani, L. Li, L. Dubost, J. P. Brouard, J. E. Hugonnet, and M. Arthur, 2003, The CroRS two-component regulatory system is required for intrinsic beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*: *J Bacteriol*, v. 185, p. 7184-92.
- Costa de Oliveira, R., J. Laval, and S. Boiteux, 1987, Induction of SOS and adaptive responses by alkylating agents in *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase activities: *Mutat Res*, v. 183, p. 11-20.
- Courcelle, J., and P. C. Hanawalt, 2003, RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks: *Annu Rev Genet*, v. 37, p. 611-46.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt, 2001, Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*: *Genetics*, v. 158, p. 41-64.
- Cox, D. H., J. J. Carvajal, and P. W. Rigby, 2002, Enhanced efficiency of pSV1-RecA-based BAC recombinering: *Biotechniques*, v. 33, p. 1206-8.
- Cox, M. M., 1999, Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, v. 63, p. 311-66.
- Cox, M. M., 2003, The bacterial RecA protein as a motor protein: *Annu Rev Microbiol*, v. 57, p. 551-77.
- Cox, M. M., 2007, Regulation of bacterial RecA protein function: *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 42, p. 41-63.
- Cremniter, J., J. L. Mainardi, N. Josseume, J. C. Quincampoix, L. Dubost, J. E. Hugonnet, A. Marie, L. Gutmann, L. B. Rice, and M. Arthur, 2006, Novel mechanism of resistance to glycopeptide antibiotics in *Enterococcus faecium*: *J Biol Chem*, v. 281, p. 32254-62.
- Crowley, D. J., and J. Courcelle, 2002, Answering the Call: Coping with DNA Damage at the Most Inopportune Time: *J Biomed Biotechnol*, v. 2, p. 66-74.
- d'Ari, R., 1985, The SOS system: *Biochimie*, v. 67, p. 343-7.
- de Kraker, M. E., V. Jarlier, J. C. Monen, O. E. Heuer, N. van de Sande, and H. Grundmann, 2013, The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System: *Clin Microbiol Infect*, v. 19, p. 860-8.
- Djorić, D., and C. J. Kristich, 2015, Oxidative stress enhances cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis* through activation of a two-component signaling system: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 59, p. 159-69.
- Doumith, M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, and P. Martin, 2004, Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR: *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 3819-22.

- Drabløs, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbø, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Peña-Díaz, M. Otterlei, G. Slupphaug, and H. E. Krokan, 2004, Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance: DNA Repair (Amst), v. 3, p. 1389-407.
- Drees, J. C., S. Chitteni-Pattu, D. R. McCaslin, R. B. Inman, and M. M. Cox, 2006, Inhibition of RecA protein function by the RdgC protein from *Escherichia coli*: J Biol Chem, v. 281, p. 4708-17.
- Drees, J. C., S. L. Lusetti, S. Chitteni-Pattu, R. B. Inman, and M. M. Cox, 2004, A RecA filament capping mechanism for RecX protein: Mol Cell, v. 15, p. 789-98.
- Duesbery, N. S., C. P. Webb, S. H. Leppla, V. M. Gordon, K. R. Klimpel, T. D. Copeland, N. G. Ahn, M. K. Oskarsson, K. Fukasawa, K. D. Paull, and G. F. Vande Woude, 1998, Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor: Science, v. 280, p. 734-7.
- Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, L. Devriese, M. Baele, and P. Butaye, 2006, The Genus *Enterococcus*, The Prokaryotes, Springer US, p. 163-174.
- Eaton, T. J., and M. J. Gasson, 2001, Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates: Appl Environ Microbiol, v. 67, p. 1628-35.
- ECDC, 2009, ECDC/EMEA, Stockholm, European Center for Disease Prevention and Control.
- Echols, H., and M. F. Goodman, 1991, Fidelity mechanisms in DNA replication: Annu Rev Biochem, v. 60, p. 477-511.
- Egglar, A. L., S. L. Lusetti, and M. M. Cox, 2003, The C terminus of the *Escherichia coli* RecA protein modulates the DNA binding competition with single-stranded DNA-binding protein: J Biol Chem, v. 278, p. 16389-96.
- Ehrlich, P., and S. Hata, 1910, Die experimentelle chemotherapie der Spirilososen, in H. S. ed., Berlin, Julius Springer.
- Erill, I., S. Campoy, and J. Barbé, 2007, Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response: FEMS Microbiol Rev, v. 31, p. 637-56.
- Fantin, B., R. Leclercq, L. Garry, and C. Carbon, 1997, Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in *Enterococcus faecium* on activity of quinupristin-dalfopristin in vitro and in rabbits with experimental endocarditis: Antimicrob Agents Chemother, v. 41, p. 931-5.
- Fernández De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, and R. Woodgate, 2000, Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*: Mol Microbiol, v. 35, p. 1560-72.
- Fernández Guerrero, M. L., A. Goyenechea, C. Verdejo, R. F. Roblas, and M. de Górgolas, 2007, Enterococcal endocarditis on native and prosthetic valves: a review of clinical and prognostic factors with emphasis on hospital-acquired infections as a major determinant of outcome: Medicine (Baltimore), v. 86, p. 363-77.
- Fijalkowska, I. J., R. L. Dunn, and R. M. Schaaper, 1997, Genetic requirements and mutational specificity of the *Escherichia coli* SOS mutator activity: J Bacteriol, v. 179, p. 7435-45.
- Fish, D. N., and A. T. Chow, 1997, The clinical pharmacokinetics of levofloxacin: Clin Pharmacokinet, v. 32, p. 101-19.
- Fisher, K., and C. Phillips, 2009, In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils: Br J Biomed Sci, v. 66, p. 180-5.
- Focus, 1986, BRL pUC host: *E. coli* DH5 α competent cells., in B. R. Laboratories, ed., Focus 8(2):9.
- Frankenberg, L., M. Brugna, and L. Hederstedt, 2002, *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase: J Bacteriol, v. 184, p. 6351-6.
- Franz, C. M., M. E. Stiles, K. H. Schleifer, and W. H. Holzapfel, 2003, Enterococci in foods--a conundrum for food safety: Int J Food Microbiol, v. 88, p. 105-22.
- Friedberg, E. C., A. J. Bardwell, L. Bardwell, W. J. Feaver, R. D. Kornberg, J. Q. Svejstrup, A. E. Tomkinson, and Z. Wang, 1995, Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its

relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 347, p. 63-8.

Friedman, N., S. Vardi, M. Ronen, U. Alon, and J. Stavans, 2005, Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria: *PLoS Biol*, v. 3, p. e238.

Fritsche, T. R., M. Castanheira, G. H. Miller, R. N. Jones, and E. S. Armstrong, 2008, Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 1843-5.

Galletto, R., I. Amitani, R. J. Baskin, and S. C. Kowalczykowski, 2006, Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules: *Nature*, v. 443, p. 875-8.

Gao, P., K. L. Pinkston, A. Bourgogne, M. R. Cruz, D. A. Garsin, B. E. Murray, and B. R. Harvey, 2013, Library screen identifies *Enterococcus faecalis* CcpA, the catabolite control protein A, as an effector of Ace, a collagen adhesion protein linked to virulence: *J Bacteriol*, v. 195, p. 4761-8.

Garsin, D. A., 2010, Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation: *Nat Rev Microbiol*, v. 8, p. 290-5.

Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel, 2001, A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 10892-7.

George, J. W., R. M. Brosh, and S. W. Matson, 1994, A dominant negative allele of the *Escherichia coli* *uvrD* gene encoding DNA helicase II. A biochemical and genetic characterization: *J Mol Biol*, v. 235, p. 424-35.

Giard, J. C., A. Rince, H. Capiiaux, Y. Auffray, and A. Hartke, 2000, Inactivation of the stress- and starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*: *J Bacteriol*, v. 182, p. 4512-20.

Gilmore, M. S., 2014, *Enterococci*, in M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds., *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*: Boston, Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Gilmore, M. S., F. Lebreton, and W. van Schaik, 2013, Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era: *Curr Opin Microbiol*, v. 16, p. 10-6.

Giraffa, G., 2003, Functionality of enterococci in dairy products: *Int J Food Microbiol*, v. 88, p. 215-22.

Godfree, A. F., D. Kay, and M. D. Wyer, 1997, Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water: *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, v. 26, p. 110S-119S.

Goodman, M. F., 2002, Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: *Annu Rev Biochem*, v. 71, p. 17-50.

Graninger, W., and R. Ragette, 1992, Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis: *Clin Infect Dis*, v. 15, p. 49-57.

Green, M. H., J. Donch, and J. Greenberg, 1969, An immediate effect of inhibition of DNA synthesis on cell division in a Lon strain of *Escherichia coli*: *Mutat Res*, v. 8, p. 409-11.

Gudas, L. J., and A. B. Pardee, 1975, Model for regulation of *Escherichia coli* DNA repair functions: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 72, p. 2330-4.

Guinane, C. M., P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill, 2006, Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, p. 2824-8.

Guiton, P. S., C. S. Hung, L. E. Hancock, M. G. Caparon, and S. J. Hultgren, 2010, Enterococcal biofilm formation and virulence in an optimized murine model of foreign body-associated urinary tract infections: *Infect Immun*, v. 78, p. 4166-75.

Gutierrez, B., S. Douthwaite, and B. Gonzalez-Zorn, 2013, Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs: *RNA Biol*, v. 10, p. 1324-32.

Guérin, E., T. Jové, A. Tabesse, D. Mazel, and M. C. Ploy, 2011, High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons: *J Bacteriol*, v. 193, p. 5675-82.

- Haas, W., and M. S. Gilmore, 1999, Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*: *Med Microbiol Immunol*, v. 187, p. 183-90.
- Haas, W., B. D. Shepard, and M. S. Gilmore, 2002, Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction: *Nature*, v. 415, p. 84-7.
- Hakenbeck, R., and H. Hof, 1991, Relatedness of penicillin-binding proteins from various *Listeria* species: *FEMS Microbiol Lett*, v. 68, p. 191-5.
- Hall, C. L., M. Tschannen, E. A. Worthey, and C. J. Kristich, 2013, IreB, a Ser/Thr kinase substrate, influences antimicrobial resistance in *Enterococcus faecalis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, p. 6179-86.
- Hancock, L. E., and M. Perego, 2004, Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583: *J Bacteriol*, v. 186, p. 7951-8.
- Hegde, S. P., M. H. Qin, X. H. Li, M. A. Atkinson, A. J. Clark, M. Rajagopalan, and M. V. Madiraju, 1996a, Interactions of RecF protein with RecO, RecR, and single-stranded DNA binding proteins reveal roles for the RecF-RecO-RecR complex in DNA repair and recombination: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 14468-73.
- Hegde, S. P., M. Rajagopalan, and M. V. Madiraju, 1996b, Preferential binding of *Escherichia coli* RecF protein to gapped DNA in the presence of adenosine (gamma-thio) triphosphate: *J Bacteriol*, v. 178, p. 184-90.
- Heikens, E., M. J. Bonten, and R. J. Willems, 2007, Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162: *J Bacteriol*, v. 189, p. 8233-40.
- Heikens, E., K. V. Singh, K. D. Jacques-Palaz, M. van Luit-Asbroek, E. A. Oostdijk, M. J. Bonten, B. E. Murray, and R. J. Willems, 2011, Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis: *Microbes Infect*, v. 13, p. 1185-90.
- Hertman, L., and S. E. Luria, 1967, Transduction studies on the role of a *rec+* gene in the ultraviolet induction of prophage lambda: *J Mol Biol*, v. 23, p. 117-33.
- Hidron, A. I., J. R. Edwards, J. Patel, T. C. Horan, D. M. Sievert, D. A. Pollock, S. K. Fridkin, N. H. S. N. Team, and P. N. H. S. N. Facilities, 2008, NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007: *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 29, p. 996-1011.
- Hoch, J. A., 1976, Genetics of bacterial sporulation: *Adv Genet*, v. 18, p. 69-98.
- Hoch, J. A., 1993, Regulation of the onset of the stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*: *Adv Microb Physiol*, v. 35, p. 111-33.
- Hoge, C. W., J. Adams, B. Buchanan, and S. D. Sears, 1991, Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal: *Rev Infect Dis*, v. 13, p. 600-5.
- Hollenbeck, B. L., and L. B. Rice, 2012, Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*: *Virulence*, v. 3, p. 421-33.
- Hollingshead, S., and D. Vapnek, 1985, Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyllyltransferase: *Plasmid*, v. 13, p. 17-30.
- Horii, T., T. Ogawa, and H. Ogawa, 1981, Nucleotide sequence of the *lexA* gene of *E. coli*: *Cell*, v. 23, p. 689-97.
- Hoskins, J., W. E. Alborn, J. Arnold, L. C. Blaszcak, S. Burgett, B. S. DeHoff, S. T. Estrem, L. Fritz, D. J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J. S. Glass, H. Khoja, A. R. Kraft, R. E. Lagace, D. J. LeBlanc, L. N. Lee, E. J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S. M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C. W. Mundy, T. I. Nicas, F. H. Norris, M. O'Gara, R. B. Peery, G. T. Robertson, P. Rockey, P. M. Sun, M. E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C. A. Zook, R. H. Baltz, S. R. Jaskunas, P. R. Rosteck, P. L. Skatrud, and J. I. Glass, 2001, Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6: *J Bacteriol*, v. 183, p. 5709-17.
- Howden, B. P., J. K. Davies, P. D. Johnson, T. P. Stinear, and M. L. Grayson, 2010, Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and

heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications: *Clin Microbiol Rev*, v. 23, p. 99-139.

Huebner, J., Y. Wang, W. A. Krueger, L. C. Madoff, G. Martirosian, S. Boisot, D. A. Goldmann, D. L. Kasper, A. O. Tzianabos, and G. B. Pier, 1999, Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: *Infect Immun*, v. 67, p. 1213-9.

Huycke, M. M., V. Abrams, and D. R. Moore, 2002, *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA: *Carcinogenesis*, v. 23, p. 529-36.

Huycke, M. M., W. Joyce, and M. F. Wack, 1996, Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*: *J Infect Dis*, v. 173, p. 743-6.

Huycke, M. M., D. F. Sahm, and M. S. Gilmore, 1998, Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future: *Emerg Infect Dis*, v. 4, p. 239-49.

Huycke, M. M., C. A. Spiegel, and M. S. Gilmore, 1991, Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, p. 1626-34.

Ike, Y., and D. B. Clewell, 1992, Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome: *J Bacteriol*, v. 174, p. 8172-7.

Ike, Y., H. Hashimoto, and D. B. Clewell, 1984, Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice: *Infect Immun*, v. 45, p. 528-30.

Ike, Y., H. Hashimoto, and D. B. Clewell, 1987, High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections: *J Clin Microbiol*, v. 25, p. 1524-8.

Imlay, J. A., and S. Linn, 1987, Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide: *J Bacteriol*, v. 169, p. 2967-76.

Iwasaki, H., A. Nakata, G. C. Walker, and H. Shinagawa, 1990, The *Escherichia coli* *polB* gene, which encodes DNA polymerase II, is regulated by the SOS system: *J Bacteriol*, v. 172, p. 6268-73.

Jacob, A. E., and S. J. Hobbs, 1974, Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*: *J Bacteriol*, v. 117, p. 360-72.

Janion, C., 2008, Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*: *Int J Biol Sci*, v. 4, p. 338-44.

Janky, R., and J. van Helden, 2008, Evaluation of phylogenetic footprint discovery for predicting bacterial cis-regulatory elements and revealing their evolution: *BMC Bioinformatics*, v. 9, p. 37.

Jarosz, D. F., P. J. Beuning, S. E. Cohen, and G. C. Walker, 2007, Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*: *Trends Microbiol*, v. 15, p. 70-7.

Jarosz, D. F., V. G. Godoy, J. C. Delaney, J. M. Essigmann, and G. C. Walker, 2006, A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates: *Nature*, v. 439, p. 225-8.

Jett, B. D., M. M. Huycke, and M. S. Gilmore, 1994, Virulence of enterococci: *Clin Microbiol Rev*, v. 7, p. 462-78.

Jett, B. D., H. G. Jensen, R. E. Nordquist, and M. S. Gilmore, 1992, Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis: *Infect Immun*, v. 60, p. 2445-52.

Johnson, A., 2006, *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals* Andre Bryskier, Ed. ASM Press, Washington, USA, 2005. ISBN 1-55581-237-6. \$189.95, 1456 pp: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 231.

Jonas, B. M., B. E. Murray, and G. M. Weinstock, 2001, Characterization of *emeA*, a *NorA* homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, p. 3574-9.

Joo, C., S. A. McKinney, M. Nakamura, I. Rasnik, S. Myong, and T. Ha, 2006, Real-time observation of RecA filament dynamics with single monomer resolution: *Cell*, v. 126, p. 515-27.

- Jung, Y. H., E. S. Shin, O. Kim, J. S. Yoo, K. M. Lee, J. I. Yoo, G. T. Chung, and Y. S. Lee, 2010, Characterization of two newly identified genes, *vgaD* and *vatH*, [corrected] conferring resistance to streptogramin A in *Enterococcus faecium*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, p. 4744-9.
- Kahan, F. M., J. S. Kahan, P. J. Cassidy, and H. Kropp, 1974, The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin): *Ann N Y Acad Sci*, v. 235, p. 364-86.
- Kajfasz, J. K., J. E. Mendoza, A. O. Gaca, J. H. Miller, K. A. Koselny, M. Giambiagi-Demarval, M. Wellington, J. Abranches, and J. A. Lemos, 2012, The *Spx* regulator modulates stress responses and virulence in *Enterococcus faecalis*: *Infect Immun*, v. 80, p. 2265-75.
- Kak, V., S. M. Donabedian, M. J. Zervos, R. Kariyama, H. Kumon, and J. W. Chow, 2000, Efficacy of ampicillin plus arbekacin in experimental rabbit endocarditis caused by an *Enterococcus faecalis* strain with high-level gentamicin resistance: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 2545-6.
- Kalman, D., and S. L. Barriere, 1990, Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins: *Tex Heart Inst J*, v. 17, p. 203-15.
- Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu, 2000, A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 1549-55.
- Kau, A. L., S. M. Martin, W. Lyon, E. Hayes, M. G. Caparon, and S. J. Hultgren, 2005, *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice: *Infect Immun*, v. 73, p. 2461-8.
- Kawai, Y., S. Moriya, and N. Ogasawara, 2003, Identification of a protein, *YneA*, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*: *Mol Microbiol*, v. 47, p. 1113-22.
- Kelesidis, T., R. Humphries, D. Z. Uslan, and D. Pegues, 2012, De novo daptomycin-nonsusceptible enterococcal infections: *Emerg Infect Dis*, v. 18, p. 674-6.
- Kenyon, C. J., and G. C. Walker, 2005, DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. 1980: *DNA Repair (Amst)*, v. 4, p. 1049-53.
- Khil, P. P., and R. D. Camerini-Otero, 2002, Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*: *Mol Microbiol*, v. 44, p. 89-105.
- Kim, S. R., G. Maenhaut-Michel, M. Yamada, Y. Yamamoto, K. Matsui, T. Sofuni, T. Nohmi, and H. Ohmori, 1997, Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 13792-7.
- Kimmit, P. T., C. R. Harwood, and M. R. Barer, 2000, Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response: *Emerg Infect Dis*, v. 6, p. 458-65.
- Kojima, S., and H. Nikaido, 2013, Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, p. E2629-34.
- Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, R. A. Baker, and H. F. Jenkinson, 1998, The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake: *J Bacteriol*, v. 180, p. 290-5.
- Korsak, D., Z. Markiewicz, G. O. Gutkind, and J. A. Ayala, 2010, Identification of the full set of *Listeria monocytogenes* penicillin-binding proteins and characterization of PBPD2 (Lmo2812): *BMC Microbiol*, v. 10, p. 239.
- Kowalczykowski, S. C., J. Clow, R. Somani, and A. Varghese, 1987, Effects of the *Escherichia coli* SSB protein on the binding of *Escherichia coli* RecA protein to single-stranded DNA. Demonstration of competitive binding and the lack of a specific protein-protein interaction: *J Mol Biol*, v. 193, p. 81-95.
- Kristich, C. J., and J. L. Little, 2012, Mutations in the β subunit of RNA polymerase alter intrinsic cephalosporin resistance in *Enterococci*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, p. 2022-7.
- Kristich, C. J., C. L. Wells, and G. M. Dunny, 2007, A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 3508-13.

Kuch, A., R. J. Willems, G. Werner, T. M. Coque, A. M. Hammerum, A. Sundsfjord, I. Klare, P. Ruiz-Garbajosa, G. S. Simonsen, M. van Luit-Asbroek, W. Hryniewicz, and E. Sadowy, 2012, Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe: *J Antimicrob Chemother*, v. 67, p. 551-8.

Kumura, K., M. Sekiguchi, A. L. Steinum, and E. Seeberg, 1985, Stimulation of the UvrABC enzyme-catalyzed repair reactions by the UvrD protein (DNA helicase II): *Nucleic Acids Res*, v. 13, p. 1483-92.

Kuzminov, A., 1999, Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 63, p. 751-813, table of contents.

La Carbona, S., N. Sauvageot, J. C. Giard, A. Benachour, B. Posteraro, Y. Auffray, M. Sanguinetti, and A. Hartke, 2007, Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*: *Mol Microbiol*, v. 66, p. 1148-63.

Ladero, V., M. Fernández, M. Calles-Enríquez, E. Sánchez-Llana, E. Cañedo, M. C. Martín, and M. A. Alvarez, 2012, Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci?: *Food Microbiol*, v. 30, p. 132-8.

Lahue, R. S., K. G. Au, and P. Modrich, 1989, DNA mismatch correction in a defined system: *Science*, v. 245, p. 160-4.

Lahue, R. S., S. S. Su, and P. Modrich, 1987, Requirement for d(GATC) sequences in *Escherichia coli* mutHLS mismatch correction: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, p. 1482-6.

Land, K. M., and P. J. Johnson, 1999, Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa: *Drug Resist Updat*, v. 2, p. 289-294.

Lane, H. E., and D. T. Denhardt, 1975, The rep mutation. IV. Slower movement of replication forks in *Escherichia coli* rep strains: *J Mol Biol*, v. 97, p. 99-112.

Lantz, M. S., R. D. Allen, L. W. Duck, L. M. Switalski, and M. Hook, 1991, *Porphyromonas gingivalis* surface components bind and degrade connective tissue proteins: *J Periodontal Res*, v. 26, p. 283-5.

Latorre, M., J. Galloway-Peña, J. H. Roh, M. Budinich, A. Reyes-Jara, B. E. Murray, A. Maass, and M. González, 2014, *Enterococcus faecalis* reconfigures its transcriptional regulatory network activation at different copper levels: *Metallomics*, v. 6, p. 572-81.

Latorre, M., F. Olivares, A. Reyes-Jara, G. López, and M. González, 2011, CutC is induced late during copper exposure and can modify intracellular copper content in *Enterococcus faecalis*: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 406, p. 633-7.

Lavigne, J. P., A. Sotto, M. H. Nicolas-Chanoine, N. Bouziges, J. M. Pagès, and A. Davin-Regli, 2013, An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates: *Int J Antimicrob Agents*, v. 41, p. 130-6.

Law, J., G. Buist, A. Haandrikman, J. Kok, G. Venema, and K. Leenhouts, 1995, A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes: *J Bacteriol*, v. 177, p. 7011-8.

Layton, J. C., and P. L. Foster, 2003, Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*: *Mol Microbiol*, v. 50, p. 549-61.

Le Breton, Y., C. Muller, Y. Auffray, and A. Rincé, 2007, New insights into the *Enterococcus faecalis* CroRS two-component system obtained using a differential-display random arbitrarily primed PCR approach: *Appl Environ Microbiol*, v. 73, p. 3738-41.

Leavis, H. L., M. J. Bonten, and R. J. Willems, 2006, Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance: *Curr Opin Microbiol*, v. 9, p. 454-60.

Lebreton, F., E. Riboulet-Bisson, P. Serror, M. Sanguinetti, B. Posteraro, R. Torelli, A. Hartke, Y. Auffray, and J. C. Giard, 2009, ace, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence: *Infect Immun*, v. 77, p. 2832-9.

Lebreton, F., W. van Schaik, A. M. McGuire, P. Godfrey, A. Griggs, V. Mazumdar, J. Corander, L. Cheng, S. Saif, S. Young, Q. Zeng, J. Wortman, B. Birren, R. J. Willems, A. M. Earl, and M. S.

Gilmore, 2013, Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains: *MBio*, v. 4.

Lebreton, F., W. van Schaik, M. Sanguinetti, B. Posteraro, R. Torelli, F. Le Bras, N. Verneuil, X. Zhang, J. C. Giard, A. Dhalluin, R. J. Willems, R. Leclercq, and V. Cattoir, 2012, *AsrR* is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity: *PLoS Pathog*, v. 8, p. e1002834.

Lee, E. W., M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya, 2003, *EfrAB*, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 3733-8.

Leendertse, M., E. Heikens, L. M. Wijnands, M. van Luit-Asbroek, G. J. Teske, J. J. Roelofs, M. J. Bonten, T. van der Poll, and R. J. Willems, 2009, Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice: *J Infect Dis*, v. 200, p. 1162-5.

Lefort, A., A. Saleh-Mghir, L. Garry, C. Carbon, and B. Fantin, 2000, Activity of LY333328 combined with gentamicin in vitro and in rabbit experimental endocarditis due to vancomycin-susceptible or -resistant *Enterococcus faecalis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 3017-21.

Lesca, C., C. Petit, and M. Defais, 1991, UV induction of LexA independent proteins which could be involved in SOS repair: *Biochimie*, v. 73, p. 407-9.

Lewis, L. K., G. R. Harlow, L. A. Gregg-Jolly, and D. W. Mount, 1994, Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*: *J Mol Biol*, v. 241, p. 507-23.

Ling, L. L., T. Schneider, A. J. Peoples, A. L. Spoering, I. Engels, B. P. Conlon, A. Mueller, T. F. Schäberle, D. E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides, V. A. Steadman, D. R. Cohen, C. R. Felix, K. A. Fetterman, W. P. Millett, A. G. Nitti, A. M. Zullo, C. Chen, and K. Lewis, 2015, A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance: *Nature*, v. 517, p. 455-9.

Little, J. W., 1991, Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease: *Biochimie*, v. 73, p. 411-21.

Little, J. W., and D. W. Mount, 1982, The SOS regulatory system of *Escherichia coli*: *Cell*, v. 29, p. 11-22.

Lovett, S. T., 2006, Replication arrest-stimulated recombination: Dependence on the RecA paralog, RadA/Sms and translesion polymerase, DinB: *DNA Repair (Amst)*, v. 5, p. 1421-7.

Low, Y. L., N. S. Jakubovics, J. C. Flatman, H. F. Jenkinson, and A. W. Smith, 2003, Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*: *J Med Microbiol*, v. 52, p. 113-9.

Lu, A. L., X. Li, Y. Gu, P. M. Wright, and D. Y. Chang, 2001, Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions: *Cell Biochem Biophys*, v. 35, p. 141-70.

Lu, Z. H., and M. Solioz, 2002, Bacterial copper transport: *Adv Protein Chem*, v. 60, p. 93-121.

Lusetti, S. L., and M. M. Cox, 2002, The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks: *Annu Rev Biochem*, v. 71, p. 71-100.

Lusetti, S. L., M. D. Hobbs, E. A. Stohl, S. Chitteni-Pattu, R. B. Inman, H. S. Seifert, and M. M. Cox, 2006, The RecF protein antagonizes RecX function via direct interaction: *Mol Cell*, v. 21, p. 41-50.

Létoffé, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman, 2006, The housekeeping dipeptide permease is the *Escherichia coli* heme transporter and functions with two optional peptide binding proteins: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 12891-6.

López, E., M. Elez, I. Matic, and J. Blázquez, 2007, Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*: *Mol Microbiol*, v. 64, p. 83-93.

Macallum, W. G., and T. W. Hastings, 1899, A CASE OF ACUTE ENDOCARDITIS CAUSED BY MICROCOCCUS ZYMOGENES (NOV. SPEC.), WITH A DESCRIPTION OF THE MICROORGANISM: *J Exp Med*, v. 4, p. 521-34.

Madiraju, M. V., A. Templin, and A. J. Clark, 1988, Properties of a mutant *recA*-encoded protein reveal a possible role for *Escherichia coli recF*-encoded protein in genetic recombination: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 6592-6.

- Maeda, H., and T. Yamamoto, 1996, Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections: *Biol Chem Hoppe Seyler*, v. 377, p. 217-26.
- Maestro, B., L. Novaková, D. Heseck, M. Lee, E. Leyva, S. Mobashery, J. M. Sanz, and P. Branny, 2011, Recognition of peptidoglycan and β -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*: *FEBS Lett*, v. 585, p. 357-63.
- Mainardi, J. L., R. Legrand, M. Arthur, B. Schoot, J. van Heijenoort, and L. Gutmann, 2000, Novel mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*: *J Biol Chem*, v. 275, p. 16490-6.
- Maiques, E., C. Ubeda, S. Campoy, N. Salvador, I. Lasa, R. P. Novick, J. Barbé, and J. R. Penadés, 2006, beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*: *J Bacteriol*, v. 188, p. 2726-9.
- Majhi, A., R. Adhikary, A. Bhattacharyya, S. Mahanti, and B. Bishayi, 2014, Levofloxacin-ceftriaxone combination attenuates lung inflammation in a mouse model of bacteremic pneumonia caused by multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* via inhibition of cytolytic activities of pneumolysin and autolysin: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, p. 5164-80.
- Maki, D. G., and W. A. Agger, 1988, Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis, and management: *Medicine (Baltimore)*, v. 67, p. 248-69.
- Malik, M., X. Zhao, and K. Drlica, 2006, Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones: *Mol Microbiol*, v. 61, p. 810-25.
- Malone, D. A., R. A. Wagner, J. P. Myers, and C. Watanakunakorn, 1986, Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals: *Am J Med*, v. 81, p. 601-6.
- Manson, J. M., L. E. Hancock, and M. S. Gilmore, 2010, Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 12269-74.
- Manson, J. M., M. Rauch, and M. S. Gilmore, 2008, The commensal microbiology of the gastrointestinal tract: *Adv Exp Med Biol*, v. 635, p. 15-28.
- Maor-Shoshani, A., N. B. Reuven, G. Tomer, and Z. Livneh, 2000, Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 565-70.
- Martínez-Martínez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby, 1998, Quinolone resistance from a transferable plasmid: *Lancet*, v. 351, p. 797-9.
- Mayers, D., V. D'Costa, and G. Wright, 2009, Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification, *Antimicrobial Drug Resistance: Infectious Disease*, Humana Press, p. 81-95.
- McBride, S. M., V. A. Fischetti, D. J. Leblanc, R. C. Moellering, and M. S. Gilmore, 2007, Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*: *PLoS One*, v. 2, p. e582.
- McKenzie, G. J., R. S. Harris, P. L. Lee, and S. M. Rosenberg, 2000, The SOS response regulates adaptive mutation: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 6646-51.
- McMurry, L., R. E. Petrucci, and S. B. Levy, 1980, Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 77, p. 3974-7.
- Mendonca, V. M., and S. W. Matson, 1995, Genetic analysis of delta *helD* and delta *uvrD* mutations in combination with other genes in the RecF recombination pathway in *Escherichia coli*: suppression of a *ruvB* mutation by a *uvrD* deletion: *Genetics*, v. 141, p. 443-52.
- Mesnage, S., F. Chau, L. Dubost, and M. Arthur, 2008, Role of N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism: *J Biol Chem*, v. 283, p. 19845-53.
- Michaels, M. L., J. Tchou, A. P. Grollman, and J. H. Miller, 1992, A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine: *Biochemistry*, v. 31, p. 10964-8.
- Michel, B., 2005, After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us: *PLoS Biol*, v. 3, p. e255.

Miller, C., H. Ingmer, L. E. Thomsen, K. Skarstad, and S. N. Cohen, 2003, DpiA binding to the replication origin of *Escherichia coli* plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response: *J Bacteriol*, v. 185, p. 6025-31.

Miller, C., L. E. Thomsen, C. Gaggero, R. Mosseri, H. Ingmer, and S. N. Cohen, 2004, SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality: *Science*, v. 305, p. 1629-31.

Mir, M., J. Asong, X. Li, J. Cardot, G. J. Boons, and R. N. Husson, 2011, The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization: *PLoS Pathog*, v. 7, p. e1002182.

Mizrahi, V., and S. J. Andersen, 1998, DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence?: *Mol Microbiol*, v. 29, p. 1331-9.

Modrich, P., and R. Lahue, 1996, Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology: *Annu Rev Biochem*, v. 65, p. 101-33.

Moellering, R. C., C. Wennersten, and A. N. Weinberg, 1971, Studies on antibiotic synergism against enterococci. I. Bacteriologic studies: *J Lab Clin Med*, v. 77, p. 821-8.

Mohamed, J. A., W. Huang, S. R. Nallapareddy, F. Teng, and B. E. Murray, 2004, Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*: *Infect Immun*, v. 72, p. 3658-63.

Moolenaar, G. F., S. van Rossum-Fikkert, M. van Kesteren, and N. Goosen, 2002, Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 1467-72.

Moore, T., P. McGlynn, H. P. Ngo, G. J. Sharples, and R. G. Lloyd, 2003, The RdgC protein of *Escherichia coli* binds DNA and counters a toxic effect of RecFOR in strains lacking the replication restart protein PriA: *EMBO J*, v. 22, p. 735-45.

MS, G., 2014, *Enterococci*, in M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds., *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*: Boston, Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Mukherjee, A., C. Cao, and J. Lutkenhaus, 1998, Inhibition of FtsZ polymerization by SulA, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 2885-90.

Muller, C., Y. Le Breton, T. Morin, A. Benachour, Y. Auffray, and A. Rincé, 2006, The response regulator CroR modulates expression of the secreted stress-induced SalB protein in *Enterococcus faecalis*: *J Bacteriol*, v. 188, p. 2636-45.

MUNDT, J. O., 1963, Occurrence of enterococci on plants in a wild environment: *Appl Microbiol*, v. 11, p. 141-4.

Mundy, L. M., D. F. Sahn, and M. Gilmore, 2000, Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance: *Clin Microbiol Rev*, v. 13, p. 513-22.

Murdoch, D. R., G. R. Corey, B. Hoen, J. M. Miró, V. G. Fowler, A. S. Bayer, A. W. Karchmer, L. Olaison, P. A. Pappas, P. Moreillon, S. T. Chambers, V. H. Chu, V. Falcó, D. J. Holland, P. Jones, J. L. Klein, N. J. Raymond, K. M. Read, M. F. Tripodi, R. Utili, A. Wang, C. W. Woods, C. H. Cabell, and I. C. o. E.-P. C. S. I.-P. Investigators, 2009, Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study: *Arch Intern Med*, v. 169, p. 463-73.

Nallapareddy, S. R., X. Qin, G. M. Weinstock, M. Höök, and B. E. Murray, 2000, *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I: *Infect Immun*, v. 68, p. 5218-24.

Nallapareddy, S. R., K. V. Singh, J. Sillanpää, D. A. Garsin, M. Höök, S. L. Erlandsen, and B. E. Murray, 2006, Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*: *J Clin Invest*, v. 116, p. 2799-807.

Nallapareddy, S. R., K. V. Singh, J. Sillanpää, M. Zhao, and B. E. Murray, 2011, Relative contributions of Ebp Pili and the collagen adhesin ace to host extracellular matrix protein adherence and experimental urinary tract infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF: *Infect Immun*, v. 79, p. 2901-10.

- Nannini, E. C., F. Teng, K. V. Singh, and B. E. Murray, 2005, Decreased virulence of a *gls24* mutant of *Enterococcus faecalis* OG1RF in an experimental endocarditis model: *Infect Immun*, v. 73, p. 7772-4.
- Napolitano, R., R. Janel-Bintz, J. Wagner, and R. P. Fuchs, 2000, All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis: *EMBO J*, v. 19, p. 6259-65.
- 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*, v. 63, p. 174-229.
- Neu, H. C., 1983, Beta-lactamase stability of cefoxitin in comparison with other beta-lactam compounds: *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 1, p. 313-6.
- Neu, H. C., 1986, beta-Lactam antibiotics: structural relationships affecting in vitro activity and pharmacologic properties: *Rev Infect Dis*, v. 8 Suppl 3, p. S237-59.
- Neu, H. C., N. X. Chin, and P. Labthavikul, 1985, The activity of cefbuperazone, a 7 alpha-methoxy 7 beta acyl ureido cephalosporin: *Chemioterapia*, v. 4, p. 415-23.
- Nichols, D., N. Cahoon, E. M. Trakhtenberg, L. Pham, A. Mehta, A. Belanger, T. Kanigan, K. Lewis, and S. S. Epstein, 2010, Use of icip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species: *Appl Environ Microbiol*, v. 76, p. 2445-50.
- Nikaido, H., W. Liu, and E. Y. Rosenberg, 1990, Outer membrane permeability and beta-lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 34, p. 337-42.
- Noble, C. J., 1978, Carriage of group D streptococci in the human bowel: *J Clin Pathol*, v. 31, p. 1182-6.
- Nohmi, T., 2006, Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases: *Annu Rev Microbiol*, v. 60, p. 231-53.
- Nohmi, T., J. R. Battista, L. A. Dodson, and G. C. Walker, 1988, RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 1816-20.
- Norris, A. L., and E. H. Serspersu, 2013, Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa: *Protein Sci*, v. 22, p. 916-28.
- O'Reilly, E. K., and K. N. Kreuzer, 2004, Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*: *J Bacteriol*, v. 186, p. 7149-60.
- Olmsted, S. B., S. M. Kao, L. J. van Putte, J. C. Gallo, and G. M. Dunny, 1991, Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: *J Bacteriol*, v. 173, p. 7665-72.
- Opperman, T., S. Murli, B. T. Smith, and G. C. Walker, 1999, A model for a umuDC-dependent prokaryotic DNA damage checkpoint: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 9218-23.
- Oyamada, Y., H. Ito, K. Fujimoto, R. Asada, T. Niga, R. Okamoto, M. Inoue, and J. Yamagishi, 2006a, Combination of known and unknown mechanisms confers high-level resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecium*: *J Med Microbiol*, v. 55, p. 729-36.
- Oyamada, Y., H. Ito, M. Inoue, and J. Yamagishi, 2006b, Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*: *J Med Microbiol*, v. 55, p. 1395-401.
- O'Neill, J., 2014, Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, Wellcome Trust.
- Pagès, V., N. Koffel-Schwartz, and R. P. Fuchs, 2003, *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli*: *DNA Repair (Amst)*, v. 2, p. 273-84.
- Palmer, K. L., A. Daniel, C. Hardy, J. Silverman, and M. S. Gilmore, 2011, Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, p. 3345-56.
- Palmer, K. L., and M. S. Gilmore, 2010, Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas: *MBio*, v. 1.
- Palmer, K. L., P. Godfrey, A. Griggs, V. N. Kos, J. Zucker, C. Desjardins, G. Cerqueira, D. Gevers, S. Walker, J. Wortman, M. Feldgarden, B. Haas, B. Birren, and M. S. Gilmore, 2012,

Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*: *MBio*, v. 3, p. e00318-11.

Palmer, K. L., V. N. Kos, and M. S. Gilmore, 2010, Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance: *Curr Opin Microbiol*, v. 13, p. 632-9.

Pammi, M., D. Zhong, Y. Johnson, P. Revell, and J. Versalovic, 2014, Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality: a case-control study: *BMC Infect Dis*, v. 14, p. 390.

Papavinasundaram, K. G., M. J. Colston, and E. O. Davis, 1998, Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect *RecA* function: *Mol Microbiol*, v. 30, p. 525-34.

Paradis-Bleau, C., A. Lloyd, F. Sanschagrin, T. Clarke, A. Blewett, T. D. Bugg, and R. C. Levesque, 2008, Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF: *BMC Biochem*, v. 9, p. 33.

Parsons, C. A., A. Stasiak, R. J. Bennett, and S. C. West, 1995, Structure of a multisubunit complex that promotes DNA branch migration: *Nature*, v. 374, p. 375-8.

Parte, A. C., 2014, LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature: *Nucleic Acids Res*, v. 42, p. D613-6.

Patterson, J. E., A. H. Sweeney, M. Simms, N. Carley, R. Mangi, J. Sabetta, and R. W. Lyons, 1995, An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome: *Medicine (Baltimore)*, v. 74, p. 191-200.

Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, and C. M. Fraser, 2003, Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: *Science*, v. 299, p. 2071-4.

Perego, M., C. F. Higgins, S. R. Pearce, M. P. Gallagher, and J. A. Hoch, 1991, The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation: *Mol Microbiol*, v. 5, p. 173-85.

Peterson, K. R., and D. W. Mount, 1987, Differential repression of SOS genes by unstable *lexA41* (*tsl-1*) protein causes a "split-phenotype" in *Escherichia coli* K-12: *J Mol Biol*, v. 193, p. 27-40.

Petranović, M., K. Zahradka, D. Zahradka, D. Petranović, B. Nagy, and E. Salaj-Smic, 2001, Genetic evidence that the elevated levels of *Escherichia coli* helicase II antagonize recombinational DNA repair: *Biochimie*, v. 83, p. 1041-7.

Pham, P., J. G. Bertram, M. O'Donnell, R. Woodgate, and M. F. Goodman, 2001, A model for SOS-lesion-targeted mutations in *Escherichia coli*: *Nature*, v. 409, p. 366-70.

Pham, P., E. M. Seitz, S. Saveliev, X. Shen, R. Woodgate, M. M. Cox, and M. F. Goodman, 2002, Two distinct modes of *RecA* action are required for DNA polymerase V-catalyzed translesion synthesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 11061-6.

Pietta, E., M. C. Montealegre, J. H. Roh, P. S. Cocconcelli, and B. E. Murray, 2014, *Enterococcus faecium* BBP5-S/R, the missing link between BBP5-S and BBP5-R: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, p. 6978-81.

Pinkston, K. L., P. Gao, D. Diaz-Garcia, J. Sillanpää, S. R. Nallapareddy, B. E. Murray, and B. R. Harvey, 2011, The *Fsr* quorum-sensing system of *Enterococcus faecalis* modulates surface display of the collagen-binding MSCRAMM *Ace* through regulation of *gelE*: *J Bacteriol*, v. 193, p. 4317-25.

Plaut, A. G., 1983, The IgA1 proteases of pathogenic bacteria: *Annu Rev Microbiol*, v. 37, p. 603-22.

Pohlhaus, J. R., D. T. Long, E. O'Reilly, and K. N. Kreuzer, 2008, The epsilon subunit of DNA polymerase III is involved in the nalidixic acid-induced SOS response in *Escherichia coli*: *J Bacteriol*, v. 190, p. 5239-47.

Poulou, A., E. Voulgari, G. Vrioni, V. Koumaki, G. Xidopoulos, V. Chatzipantazi, F. Markou, and A. Tsakris, 2013, Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella*

pneumoniae sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant: *J Clin Microbiol*, v. 51, p. 3176-82.

Pérez-Capilla, T., M. R. Baquero, J. M. Gómez-Gómez, A. Ionel, S. Martín, and J. Blázquez, 2005, SOS-independent induction of *dinB* transcription by beta-lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*: *J Bacteriol*, v. 187, p. 1515-8.

Qin, X., J. R. Galloway-Peña, J. Sillanpaa, J. H. Roh, S. R. Nallapareddy, S. Chowdhury, A. Bourgogne, T. Choudhury, D. M. Muzny, C. J. Buhay, Y. Ding, S. Dugan-Rocha, W. Liu, C. Kovar, E. Sodergren, S. Highlander, J. F. Petrosino, K. C. Worley, R. A. Gibbs, G. M. Weinstock, and B. E. Murray, 2012, Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes: *BMC Microbiol*, v. 12, p. 135.

Qin, X., K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray, 2000, Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence: *Infect Immun*, v. 68, p. 2579-86.

Qin, X., K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray, 2001, Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF: *J Bacteriol*, v. 183, p. 3372-82.

Quillardet, P., M. A. Rouffaud, and P. Bouige, 2003, DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*: *Res Microbiol*, v. 154, p. 559-72.

Quinones, M., H. H. Kimsey, and M. K. Waldor, 2005, LexA cleavage is required for CTX prophage induction: *Mol Cell*, v. 17, p. 291-300.

Radman, M., 1975, SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which is Accompanied by Mutagenesis, in P. Hanawalt, and R. Setlow, eds., *Molecular Mechanisms for Repair of DNA: Basic Life Sciences*, Springer US, p. 355-367.

Rakita, R. M., V. C. Quan, K. Jacques-Palaz, K. V. Singh, R. C. Arduino, M. Mee, and B. E. Murray, 2000, Specific antibody promotes opsonization and PMN-mediated killing of phagocytosis-resistant *Enterococcus faecium*: *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 28, p. 291-9.

Rakita, R. M., N. N. Vanek, K. Jacques-Palaz, M. Mee, M. M. Mariscalco, G. M. Dunny, M. Snuggs, W. B. Van Winkle, and S. I. Simon, 1999, *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation: *Infect Immun*, v. 67, p. 6067-75.

Rangarajan, S., R. Woodgate, and M. F. Goodman, 1999, A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 9224-9.

Rees, D. C., E. Johnson, and O. Lewinson, 2009, ABC transporters: the power to change: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 10, p. 218-27.

Reith, J., and C. Mayer, 2011, Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 92, p. 1-11.

Reuven, N. B., G. Arad, A. Maor-Shoshani, and Z. Livneh, 1999, The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication: *J Biol Chem*, v. 274, p. 31763-6.

Reyes-Jara, A., M. Latorre, G. López, A. Bourgogne, B. E. Murray, V. Cambiazo, and M. González, 2010, Genome-wide transcriptome analysis of the adaptive response of *Enterococcus faecalis* to copper exposure: *Biomaterials*, v. 23, p. 1105-12.

Riboldi, G. P., C. G. Bierhals, E. P. Mattos, A. P. Frazzon, P. A. d'Azevedo, and J. Frazzon, 2014, Oxidative stress enhances the expression of sulfur assimilation genes: preliminary insights on the *Enterococcus faecalis* iron-sulfur cluster machinery regulation: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 109, p. 408-13.

Rice, L. B., 2005, Antibiotics and gastrointestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 24, p. 804-14.

Rice, L. B., L. L. Carias, S. Rudin, V. Lakticová, A. Wood, and R. Hutton-Thomas, 2005, *Enterococcus faecium* low-affinity *php5* is a transferable determinant: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 5007-12.

- Rigottier-Gois, L., A. Alberti, A. Houel, J. F. Taly, P. Palcy, J. Manson, D. Pinto, R. C. Matos, L. Carrilero, N. Montero, M. Tariq, H. Karsens, C. Repp, A. Kropec, A. Budin-Verneuil, A. Benachour, N. Sauvageot, A. Bizzini, M. S. Gilmore, P. Bessières, J. Kok, J. Huebner, F. Lopes, B. Gonzalez-Zorn, A. Hartke, and P. Serror, 2011, Large-scale screening of a targeted *Enterococcus faecalis* mutant library identifies envelope fitness factors: *PLoS One*, v. 6, p. e29023.
- Roca, I., M. Akova, F. Baquero, J. Carlet, M. Cavaleri, S. Coenen, J. Cohen, D. Findlay, I. Gyssens, O. E. Heure, G. Kahlmeter, H. Kruse, R. Laxminarayan, E. Liébana, L. López-Cerero, A. MacGowan, M. Martins, J. Rodríguez-Baño, J. M. Rolain, C. Segovia, B. Sigauque, E. Taconelli, E. Wellington, and J. Vila, 2015, The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention: *New Microbes New Infect*, v. 6, p. 22-9.
- Roseeuw, E., V. Coessens, E. Schacht, B. Vrooman, D. Domurado, and G. Marchal, 1999, Polymeric prodrugs of antibiotics with improved efficiency: *J Mater Sci Mater Med*, v. 10, p. 743-6.
- Rudner, D. Z., J. R. LeDeaux, K. Ireton, and A. D. Grossman, 1991, The *spo0K* locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence: *J Bacteriol*, v. 173, p. 1388-98.
- Ruiz-Garbajosa, P., M. J. Bonten, D. A. Robinson, J. Top, S. R. Nallapareddy, C. Torres, T. M. Coque, R. Cantón, F. Baquero, B. E. Murray, R. del Campo, and R. J. Willems, 2006, Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination: *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 2220-8.
- Sahm, D. F., C. N. Baker, R. N. Jones, and C. Thornsberry, 1984, Influence of growth medium on the in vitro activities of second- and third-generation cephalosporins against *Streptococcus faecalis*: *J Clin Microbiol*, v. 20, p. 561-7.
- Sahm, D. F., J. Kissinger, M. S. Gilmore, P. R. Murray, R. Mulder, J. Solliday, and B. Clarke, 1989, In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 33, p. 1588-91.
- Sancar, A., and G. B. Sancar, 1988, DNA repair enzymes: *Annu Rev Biochem*, v. 57, p. 29-67.
- Sava, I. G., E. Heikens, A. Kropec, C. Theilacker, R. Willems, and J. Huebner, 2010, Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host but is not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection: *J Med Microbiol*, v. 59, p. 1001-4.
- Schlacher, K., M. M. Cox, R. Woodgate, and M. F. Goodman, 2006a, RecA acts in trans to allow replication of damaged DNA by DNA polymerase V: *Nature*, v. 442, p. 883-7.
- Schlacher, K., P. Pham, M. M. Cox, and M. F. Goodman, 2006b, Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation: *Chem Rev*, v. 106, p. 406-19.
- Schleifer, K. H., and O. Kandler, 1972, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications: *Bacteriol Rev*, v. 36, p. 407-77.
- Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Bälz, 1984, Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 34, p. 31-34.
- Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Bälz, 1987, Molecular and Chemotaxonomic Approaches to the Classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A Review: *Systematic and Applied Microbiology*, v. 10, p. 1-19.
- Schröder, W., C. Goerke, and C. Wolz, 2013, Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*: *J Antimicrob Chemother*, v. 68, p. 529-38.
- Sebkova, A., D. Karasova, M. Crhanova, E. Budinska, and I. Rychlik, 2008, *aro* mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer membrane integrity: *J Bacteriol*, v. 190, p. 3155-60.
- Selby, C. P., and A. Sancar, 1994, Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline: *Microbiol Rev*, v. 58, p. 317-29.
- Shafer, W. M., and J. J. Iandolo, 1979, Genetics of staphylococcal enterotoxin B in methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*: *Infect Immun*, v. 25, p. 902-11.

Shah, I. M., M. H. Laaberki, D. L. Popham, and J. Dworkin, 2008, A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments: *Cell*, v. 135, p. 486-96.

Shan, Q., J. M. Bork, B. L. Webb, R. B. Inman, and M. M. Cox, 1997, RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins: *J Mol Biol*, v. 265, p. 519-40.

Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore, 2002, Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: *Nature*, v. 417, p. 746-50.

Shankar, N., C. V. Lockett, A. S. Baghdayan, C. Drachenberg, M. S. Gilmore, and D. E. Johnson, 2001, Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection: *Infect Immun*, v. 69, p. 4366-72.

Shepard, B. D., and M. S. Gilmore, 2002, Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance: *Microbes Infect*, v. 4, p. 215-24.

Shinagawa, H., 1996, SOS response as an adaptive response to DNA damage in prokaryotes: *EXS*, v. 77, p. 221-35.

Shlaes, D. M., A. Bouvet, C. Devine, J. H. Shlaes, S. al-Obeid, and R. Williamson, 1989, Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A256: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 33, p. 198-203.

Sifri, C. D., E. Mylonakis, K. V. Singh, X. Qin, D. A. Garsin, B. E. Murray, F. M. Ausubel, and S. B. Calderwood, 2002, Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice: *Infect Immun*, v. 70, p. 5647-50.

Simmons, L. A., J. J. Foti, S. E. Cohen, and G. C. Walker, 2008, The SOS Regulatory Network: *Ecosal Plus*, v. 2008.

Singh, K. V., and B. E. Murray, 2005, Differences in the *Enterococcus faecalis* *Isa* locus that influence susceptibility to quinupristin-dalfopristin and clindamycin: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 32-9.

Singh, K. V., S. R. Nallapareddy, J. Sillanpää, and B. E. Murray, 2010, Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis: *PLoS Pathog*, v. 6, p. e1000716.

Smith, M. H., M. M. Cavenagh, and J. W. Little, 1991, Mutant LexA proteins with an increased rate of in vivo cleavage: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, p. 7356-60.

Soler-Bistué, A., J. A. Mondotte, M. J. Bland, M. E. Val, M. C. Saleh, and D. Mazel, 2015, Genomic location of the major ribosomal protein gene locus determines *Vibrio cholerae* global growth and infectivity: *PLoS Genet*, v. 11, p. e1005156.

Solheim, M., M. C. Brekke, L. G. Snipen, R. J. Willems, I. F. Nes, and D. A. Brede, 2011, Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface structure-proteins in hospital-associated clonal complex 2 *Enterococcus faecalis*: *BMC Microbiol*, v. 11, p. 3.

Soloz, M., 2002, Role of proteolysis in copper homeostasis: *Biochem Soc Trans*, v. 30, p. 688-91.

Soloz, M., and J. V. Stoyanov, 2003, Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*: *FEMS Microbiol Rev*, v. 27, p. 183-95.

Sousa, F. J., L. M. Lima, A. B. Pacheco, C. L. Oliveira, I. Torriani, D. F. Almeida, D. Foguel, J. L. Silva, and R. Mohana-Borges, 2006, Tetramerization of the LexA repressor in solution: implications for gene regulation of the *E. coli* SOS system at acidic pH: *J Mol Biol*, v. 359, p. 1059-74.

STARK, J. M., 1960, Antibiotic activity of haemolytic enterococci: *Lancet*, v. 1, p. 733-4.

Stohl, E. A., J. P. Brockman, K. L. Burkle, K. Morimatsu, S. C. Kowalczykowski, and H. S. Seifert, 2003, *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities in vitro and in vivo: *J Biol Chem*, v. 278, p. 2278-85.

Story, R. M., I. T. Weber, and T. A. Steitz, 1992, The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer: *Nature*, v. 355, p. 318-25.

Sutton, M. D., T. Opperman, and G. C. Walker, 1999, The *Escherichia coli* SOS mutagenesis proteins UmuD and UmuD' interact physically with the replicative DNA polymerase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 12373-8.

Sutton, M. D., B. T. Smith, V. G. Godoy, and G. C. Walker, 2000, The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance: *Annu Rev Genet*, v. 34, p. 479-497.

Sutton, M. D., and G. C. Walker, 2001, umuDC-mediated cold sensitivity is a manifestation of functions of the UmuD(2)C complex involved in a DNA damage checkpoint control: *J Bacteriol*, v. 183, p. 1215-24.

Suzuki, S., T. Horinouchi, and C. Furusawa, 2014, Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles: *Nat Commun*, v. 5, p. 5792.

Süssmuth, S. D., A. Muscholl-Silberhorn, R. Wirth, M. Susa, R. Marre, and E. Rozdzinski, 2000, Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst: *Infect Immun*, v. 68, p. 4900-6.

Taddei, F., I. Matic, and M. Radman, 1995, cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 11736-40.

Tamber, S., and R. E. Hancock, 2003, On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*: *Front Biosci*, v. 8, p. s472-83.

Tang, M., I. Bruck, R. Eritja, J. Turner, E. G. Frank, R. Woodgate, M. O'Donnell, and M. F. Goodman, 1998, Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: reconstitution of in vitro lesion bypass dependent on the UmuD'2C mutagenic complex and RecA protein: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 9755-60.

Tang, M., P. Pham, X. Shen, J. S. Taylor, M. O'Donnell, R. Woodgate, and M. F. Goodman, 2000, Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis: *Nature*, v. 404, p. 1014-8.

Tang, M., X. Shen, E. G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate, and M. F. Goodman, 1999, UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 8919-24.

Tariq, M., C. Bruijs, J. Kok, and B. P. Krom, 2012, Link between culture zeta potential homogeneity and Ebp in *Enterococcus faecalis*: *Appl Environ Microbiol*, v. 78, p. 2282-8.

Templin, M. F., D. H. Edwards, and J. V. Höltje, 1992, A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*: *J Biol Chem*, v. 267, p. 20039-43.

Tendolkar, P. M., A. S. Baghdayan, and N. Shankar, 2006, Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*: *J Bacteriol*, v. 188, p. 2063-72.

Teng, F., K. D. Jacques-Palaz, G. M. Weinstock, and B. E. Murray, 2002, Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*: *Infect Immun*, v. 70, p. 2010-5.

Toledo-Arana, A., J. Valle, C. Solano, M. J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J. R. Penadés, and I. Lasa, 2001, The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation: *Appl Environ Microbiol*, v. 67, p. 4538-45.

Troxler, R., A. von Graevenitz, G. Funke, B. Wiedemann, and I. Stock, 2000, Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains: *Clin Microbiol Infect*, v. 6, p. 525-35.

Trusca, D., S. Scott, C. Thompson, and D. Bramhill, 1998, Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein: *J Bacteriol*, v. 180, p. 3946-53.

Tsai, C. C., L. F. Huang, C. C. Lin, and H. Y. Tsen, 2004, Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strain of *Enterococcus faecium* TM39: *Int J Food Microbiol*, v. 96, p. 1-12.

Ubeda, C., E. Maiques, E. Knecht, I. Lasa, R. P. Novick, and J. R. Penadés, 2005, Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci: *Mol Microbiol*, v. 56, p. 836-44.

van Schaik, W., J. Top, D. R. Riley, J. Boekhorst, J. E. Vrijenhoek, C. M. Schapendonk, A. P. Hendrickx, I. J. Nijman, M. J. Bonten, H. Tettelin, and R. J. Willems, 2010, Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island: *BMC Genomics*, v. 11, p. 239.

Van Tyne, D., and M. S. Gilmore, 2014, Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance: *Annu Rev Microbiol*, v. 68, p. 337-56.

Van Tyne, D., M. J. Martin, and M. S. Gilmore, 2013, Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin: *Toxins (Basel)*, v. 5, p. 895-911.

Vargiu, A. V., and H. Nikaido, 2012, Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, p. 20637-42.

Verneuil, N., A. Mazé, M. Sanguinetti, J. M. Laplace, A. Benachour, Y. Auffray, J. C. Giard, and A. Hartke, 2006, Implication of (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages: *Microbiology*, v. 152, p. 2579-89.

Vesic, D., and C. J. Kristich, 2012, MurAA is required for intrinsic cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis*: *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, p. 2443-51.

Vetting, M. W., S. S. Hegde, M. Wang, G. A. Jacoby, D. C. Hooper, and J. S. Blanchard, 2011, Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor: *J Biol Chem*, v. 286, p. 25265-73.

Viscount, H. B., C. L. Munro, D. Burnette-Curley, D. L. Peterson, and F. L. Macrina, 1997, Immunization with FimA protects against *Streptococcus parasanguis* endocarditis in rats: *Infect Immun*, v. 65, p. 994-1002.

Volkert, M. R., F. H. Gately, and L. I. Hajec, 1989, Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents: *Mutat Res*, v. 217, p. 109-15.

Vollmer, A. C., S. Kwakye, M. Halpern, and E. C. Everbach, 1998, Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles: *Appl Environ Microbiol*, v. 64, p. 3927-31.

Voloshin, O. N., B. E. Ramirez, A. Bax, and R. D. Camerini-Otero, 2001, A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA: *Genes Dev*, v. 15, p. 415-27.

Wagner, D., P. Wiemann, K. Huß, U. Brandt, A. Fleißner, and B. Tudzynski, 2013, A sensing role of the glutamine synthetase in the nitrogen regulation network in *Fusarium fujikuroi*: *PLoS One*, v. 8, p. e80740.

Wagner, J., P. Gruz, S. R. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R. P. Fuchs, and T. Nohmi, 1999, The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis: *Mol Cell*, v. 4, p. 281-6.

Walker, G. C., 1984, Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*: *Microbiol Rev*, v. 48, p. 60-93.

Walker, G. C., 2000, Understanding the complexity of an organism's responses to DNA damage: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 65, p. 1-10.

Wang, X., and M. M. Huycke, 2007, Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells: *Gastroenterology*, v. 132, p. 551-61.

Warnes, S. L., and C. W. Keevil, 2011, Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact: *Appl Environ Microbiol*, v. 77, p. 6049-59.

Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore, and F. C. Tenover, 2003, Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*: *Science*, v. 302, p. 1569-71.

Weigle, J. J., 1953, Induction of Mutations in a Bacterial Virus: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 39, p. 628-36.

Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E.

- Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte, and N. Woodford, 2008, Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe: *Euro Surveill*, v. 13.
- Werner, G., C. Fleige, B. Ewert, J. A. Laverde-Gomez, I. Klare, and W. Witte, 2010, High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17): *Int J Antimicrob Agents*, v. 35, p. 119-25.
- Wessels, D., P. J. Jooste, and J. F. Mostert, 1990, Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products: *Int J Food Microbiol*, v. 10, p. 349-52.
- Witkin, E. M., 1969, Ultraviolet-induced mutation and DNA repair: *Annu Rev Microbiol*, v. 23, p. 487-514.
- Woodgate, R., and D. G. Ennis, 1991, Levels of chromosomally encoded Umu proteins and requirements for in vivo UmuD cleavage: *Mol Gen Genet*, v. 229, p. 10-6.
- Wozniak, R. A., and M. K. Waldor, 2010, Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow: *Nat Rev Microbiol*, v. 8, p. 552-63.
- Wright, G. D., 2005, Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification: *Adv Drug Deliv Rev*, v. 57, p. 1451-70.
- Wunderli-Ye, H., and M. Solioz, 1999, Effects of promoter mutations on the in vivo regulation of the cop operon of *Enterococcus hirae* by copper(I) and copper(II): *Biochem Biophys Res Commun*, v. 259, p. 443-9.
- Xu, Y., K. V. Singh, X. Qin, B. E. Murray, and G. M. Weinstock, 2000, Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis: *Infect Immun*, v. 68, p. 815-23.
- Yancey-Wrona, J. E., E. R. Wood, J. W. George, K. R. Smith, and S. W. Matson, 1992, *Escherichia coli* Rep protein and helicase IV. Distributive single-stranded DNA-dependent ATPases that catalyze a limited unwinding reaction in vitro: *Eur J Biochem*, v. 207, p. 479-85.
- Yasuda, T., K. Morimatsu, T. Horii, T. Nagata, and H. Ohmori, 1998, Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI: *EMBO J*, v. 17, p. 3207-16.
- Yasuda, T., K. Morimatsu, R. Kato, J. Usukura, M. Takahashi, and H. Ohmori, 2001, Physical interactions between DinI and RecA nucleoprotein filament for the regulation of SOS mutagenesis: *EMBO J*, v. 20, p. 1192-202.
- Yeats, C., R. D. Finn, and A. Bateman, 2002, The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain: *Trends Biochem Sci*, v. 27, p. 438.
- Yeiser, B., E. D. Pepper, M. F. Goodman, and S. E. Finkel, 2002, SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 8737-41.
- Zeng, J., F. Teng, G. M. Weinstock, and B. E. Murray, 2004, Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells: *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 1149-54.
- Zhang, B., J. An, T. Shimada, S. Liu, and K. Maeyama, 2012a, Oral administration of *Enterococcus faecalis* FK-23 suppresses Th17 cell development and attenuates allergic airway responses in mice: *Int J Mol Med*, v. 30, p. 248-54.
- Zhang, X., F. L. Paganelli, D. Bierschenck, A. Kuipers, M. J. Bonten, R. J. Willems, and W. van Schaik, 2012b, Genome-wide identification of ampicillin resistance determinants in *Enterococcus faecium*: *PLoS Genet*, v. 8, p. e1002804.