



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

Supresión de la respuesta SOS como estrategia para la sensibilización de bacterias Gram-negativas resistentes a quinolonas

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por la Licenciada en Biología y Bioquímica Dña. Esther Recacha Villamor

Sevilla, Noviembre de 2018



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

El Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y el Dr. D. José Manuel Rodríguez Martínez, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “SUPRESIÓN DE LA RESPUESTA SOS COMO ESTRATEGIA PARA LA SENSIBILIZACIÓN DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES A QUINOLONAS” ha sido realizada por Dña. Esther Recacha Villamor bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Sevilla, a 14 de Noviembre de 2018.

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

Dr. D. José Manuel Rodríguez Martínez

AGRADECIMIENTOS

...¿Quieres realizar la Tesis Doctoral, aunque eso implique quedarte todas las tardes realizando experimentos, sin horario fijo y combinando tus obligaciones de residente con las de doctorando? “Sí, quiero”, un compromiso personal más allá de lo laboral. Así empezó todo, recién aterrizada en el servicio de Microbiología del H. U. V. Macarena, cuando Álvaro, me brindó esta gran oportunidad.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores, Álvaro y José Manuel, por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Gracias Álvaro por hacer accesible la investigación a los residentes e inculcarnos la importancia de una formación de calidad, en la que clínica e investigación deben ir de la mano. Gracias por tus consejos e ideas, siempre necesarias. A José Manuel, pilar básico de este proyecto, gracias por muchas cosas...por tu generosidad al incluirme en tu equipo, la investigación requiere muchas horas...; por servirme de referente; pero sobre todo por estar ahí siempre que te he necesitado y apostar por mí.

Por supuesto, también quisiera agradecer a todo el personal investigador y técnico de la “Cátedra”, su gran amabilidad e inmejorable predisposición a ayudarte. En especial, a Paula y María, un placer haber trabajado con vosotras en este proyecto y gracias por todo lo que me enseñásteis. Imposible no mencionar a Fernando, de esa clase de personas necesarias en cualquier parte.

Y porque el equipo une, muchas gracias Jesús, por explicarme cada cosa que no entendía, resolver mis dudas y aconsejarme cuando te lo pedía, ya fuera en el laboratorio o tomando una cerveza.

Tantas horas trabajando juntas, trae consigo además de una Tesis, la amistad. Gracias a todas las residentes por vuestro apoyo, las amigas que mejor te entienden.

Gracias a todos los adjuntos del servicio, por comprender la importante carga de trabajo que con lleva la realización de una Tesis a la vez que la residencia y su capacidad para facilitarme el trabajo, sin dejar de transmitir el compromiso fundamental del residente. Sin su ayuda, hubiera sido imposible.

Por último, agradecer a mi familia su eterno apoyo, por aconsejarme en todos los momentos importantes y confiar en mí siempre.

TESIS POR COMPENDIO DE ARTÍCULOS PREVIAMENTE PUBLICADOS

Esta tesis, de acuerdo con el informe correspondiente y la autorización de los directores de la misma y del órgano responsable del Programa de Doctorado, se presenta como un compendio de dos artículos. Las referencias completas a los artículos que componen el cuerpo de la tesis son las siguientes:

Quinolone Resistance Reversion by Targeting the SOS Response. Recacha E, Machuca J, Díaz de Alba P, Ramos-Guelfo M, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Beltrán J, Blázquez J, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM. *mBio*. 2017 Oct 10;8(5). pii: e00971-17. doi: 10.1128/mBio.00971-17. Factor de impacto: 6,689 (1^{er} decil, JCR 2017).

Suppression of the SOS response modifies spatiotemporal evolution, post-antibiotic effect, bacterial fitness and biofilm formation in quinolone-resistant Escherichia coli. Recacha E, Machuca J, Díaz-Díaz S, García-Duque A, Ramos-Guelfo M, Docobo-Pérez F, Blázquez J, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Oct 16. doi: 10.1093/jac/dky407. Factor de impacto: 5,217 (1^{er} decil, JCR 2017).

Índice

| | |
|---|-----------|
| I. ABREVIATURAS | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1. Resistencia bacteriana | 7 |
| 2. La resistencia bacteriana como un problema de salud pública..... | 9 |
| 3. Estrategias para la lucha contra la resistencia antimicrobiana | 13 |
| 3.1. Prevención de las infecciones..... | 13 |
| 3.2. Uso racional y optimizado de los antimicrobianos..... | 13 |
| 3.3. Reducir el uso de agentes antimicrobianos con fines no terapéuticos..... | 14 |
| 3.4. Desarrollo de nuevos antimicrobianos | 15 |
| 3.5. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas | 17 |
| 4. Respuesta SOS y multirresistencia | 18 |
| 5. Quinolonas..... | 19 |
| 5.1. Origen e historia..... | 19 |
| 5.2. Estructura y clasificación | 20 |
| 5.3. Mecanismo de acción de las quinolonas | 22 |
| 5.3.1. Estructura y función de las topoisomerasas..... | 23 |
| 5.3.2. Mecanismo de acción de las quinolonas | 26 |
| 5.4. Efecto de las quinolonas sobre las células bacterianas..... | 30 |
| 5.5. Especies reactivas del oxígeno y acción bactericida de las quinolonas..... | 32 |
| 5.6. Mecanismos de resistencia a quinolonas | 34 |
| 5.6.1. Mecanismos cromosómicos..... | 36 |
| 5.6.2. Mecanismos plasmídicos | 39 |
| 5.7. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de las quinolonas | 44 |
| 6. Respuesta SOS..... | 45 |
| 6.1. Definición de la repuesta SOS y grado de conservación | 45 |
| 6.2. Agentes inductores de la respuesta SOS | 47 |
| 6.2.1. Inducción de la respuesta SOS en ausencia de agentes genotóxicos | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2.2. <i>Inducción de la respuesta SOS por agentes genotóxicos</i> | 48 |
| 6.3. Reguladores de la respuesta SOS: RecA y LexA | 49 |
| 6.3.1. <i>RecA</i> | 50 |
| 6.3.2. <i>LexA</i> | 50 |
| 6.4. Regulación de la respuesta SOS..... | 52 |
| 6.4.1. <i>Regulación transcripcional</i> | 52 |
| 6.4.2. <i>Regulación post-transcripcional</i> | 53 |
| 6.5. Funciones del regulón SOS..... | 54 |
| 6.5.1. <i>Recombinación homóloga</i> | 54 |
| 6.5.2. <i>Reparación por escisión de nucleótidos</i> | 57 |
| 6.5.3. <i>Síntesis por translesión</i> | 58 |
| 6.5.4. <i>Otras funciones</i> | 60 |
| 7. Estrategias para inhibir la respuesta SOS..... | 61 |
| 7.1. Evidencia genética | 62 |
| 7.2. Evidencia farmacológica | 63 |
| III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 67 |
| 1. Justificación del estudio e hipótesis de trabajo..... | 69 |
| 2. Objetivos del estudio | 70 |
| IV. PUBLICACIONES..... | 73 |
| Artículo 1: Reversion de la resistencia a quinolonas mediante supresión de la respuesta SOS | 77 |
| Artículo 2: La supresión de la respuesta SOS modifica la evolución espaciotemporal, el efecto post-antibiótico, el <i>fitness</i> bacteriano y la formación de biopelículas en cepas de <i>Escherichia coli</i> resistente a quinolonas | 93 |
| V. DISCUSIÓN..... | 107 |
| VI. CONCLUSIONES | 121 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 125 |
| VIII. ANEXOS..... | 155 |

I. ABREVIATURAS

ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*)

EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*)

BLEE (*Betalactamasas de Espectro Extendido*)

QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region, región determinante de resistencia a quinolonas*)

PRP (*Proteínas con Repeticiones Pentapeptídicas*)

ADNcs (ADN de cadena sencilla)

ADNcd (ADN de cadena doble)

DSB (*Double Strand Breaks, roturas de doble hebra*)

DSE (*Double Strand Ends, extremos libres*)

ROS (*Reactive Oxygen Species, especies reactivas del oxígeno*)

NER (*Nucleotide Excision Repair, reparación por escisión de nucleótidos*)

TLS (*Translesion Synthesis, síntesis por translesión*)

Pol (Polimerasas)

CMI (*Concentración Mínima Inhibitoria*)

VSM (*Ventana de Selección de Mutantes*)

EPA (*Efecto Post-Antibiótico*)

EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

CLSI (*Clinical of Laboratory Standards Institute*)

LLQR (*Low-Level Quinolone Resistance, fenotipo de resistencia a quinolonas de bajo nivel*)

AUC (*Area Under the Curve, área bajo la curva*)

UFC (*Unidades Formadoras de Colonias*)

II. INTRODUCCIÓN

1. Resistencia bacteriana

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, los antibióticos han sido los fármacos más efectivos, su éxito se ha reflejado por su uso continuado y el descenso en la morbi-mortalidad causada por las infecciones bacterianas en los últimos 50 años. Tras la comercialización de la penicilina en los años 40, se han ido desarrollando un gran número de compuestos con actividad antimicrobiana de origen natural (derivados del metabolismo de los microorganismos), sintéticos o por modificación de versiones anteriores. Sin embargo, los microorganismos poseen las herramientas moleculares necesarias para desarrollar resistencia y poder adaptarse a las nuevas condiciones de su entorno, haciendo ineficaces agentes antimicrobianos al poco de ser comercializados (Figura 1).¹

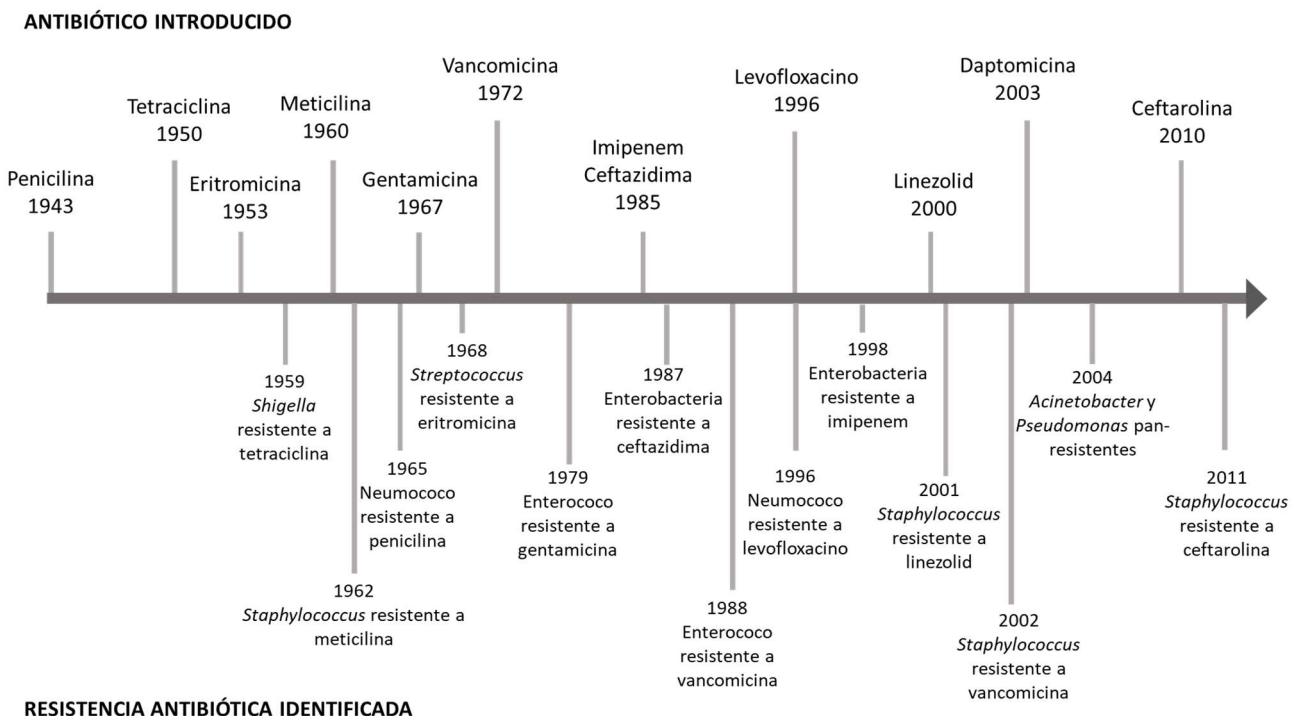


Figura 1. Desarrollo de los agentes antimicrobianos y aparición de cepas resistentes a lo largo del tiempo.¹

INTRODUCCIÓN

A pesar de que el desarrollo de resistencia precede a la era antibiótica moderna, con la presencia de un resistoma antibiótico (conjunto de todos los genes microbianos involucrados en la resistencia antimicrobiana) muy diverso genéticamente como han demostrado varios estudios,²⁻⁴ el uso de enormes cantidades de antimicrobianos para controlar la infección en las enfermedades desarrolladas en el hombre y en los animales y su uso en la agricultura han propiciado e incrementado la movilización de elementos de resistencia en poblaciones bacterianas y su captura por patógenos previamente sensibles.⁵

A lo largo del tiempo, estas condiciones han permitido cada vez más la selección de bacterias resistentes a antibióticos a través de tres mecanismos principales: (i) la captura secuencial de genes de resistencia, principalmente a través de la movilización de transposones, integrones y plásmidos y transferencia génica horizontal de fuentes ambientales; (ii) adquisición de mutaciones de resistencia antibiótica junto con mutaciones compensatorias que neutralicen el coste del *fitness*⁶ y (iii) la sobreexpresión de los mecanismos intrínsecos de resistencia como son las bombas^{7,8} o las enzimas que inactivan antibióticos.⁹

En estas circunstancias, se desarrollan microorganismos con diferentes patrones de resistencia a antimicrobianos por adquisición de determinantes de resistencia y se acuñan y definen tres términos para clasificarlas en categorías: bacterias multirresistentes (no son sensibles a al menos un antimicrobiano de tres o más familias), bacterias extremadamente resistentes (no son sensibles a al menos un antimicrobiano en todas las familias excepto en una o dos), bacterias panresistentes (no son sensibles a ningún antimicrobiano de ninguna familia).¹⁰ Estos microorganismos son difíciles de tratar con el arsenal antibiótico actual poniendo en riesgo los avances en la medicina moderna como los trasplantes, cirugías complicadas, tratamiento de recién nacidos pretérmino, quimioterapia en pacientes con cáncer que no serían posibles sin el acceso a la antibioterapia.¹¹

2. La resistencia bacteriana como un problema de salud pública

El rápido incremento de patógenos resistentes a la mayoría de antimicrobianos de uso habitual en clínica se ha proclamado como un problema de salud pública mundial. Esto ha hecho que diversas instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) hayan elaborado documentos para proponer soluciones. En 2014, el informe denominado “*Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*” sobre la situación de la multirresistencia en respuesta a la sospecha sobre su expansión a nivel mundial,¹² alertó a la OMS y dio pie a la elaboración de otros documentos. En 2015, mediante “*Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*” se marcan una serie de objetivos para abordar el problema de forma conjunta, incluyendo a todos los sectores implicados como la medicina, veterinaria, agricultura, medio ambiente, mundo financiero, y los consumidores.¹³ Mediante el documento titulado “*Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*” (GLASS)¹⁴ se trata de abordar uno de los cinco objetivos del plan de acción global referente a la consolidación del conocimiento sobre las bases de la resistencia antimicrobiana a través de la investigación, haciendo especial hincapié en una serie de “patógenos prioritarios”.¹⁵ También se encargará de tareas como la coordinación global de los estudios y análisis de las tendencias que ya se vienen haciendo a nivel regional. De hecho, el ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), a través de la EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) se encarga de monitorizar la resistencia en esta localización geográfica y elaborar mapas de resistencia por países.¹⁶ Una red similar se crea a iniciativa de la región europea de la OMS incluyendo aquellos países que no forman parte de la EARS-Net formando CAESAR (*Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance*).¹⁷ Organizaciones como el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), en Estados Unidos, también llevan a cabo la monitorización de la resistencia por regiones y han establecido una lista de “patógenos prioritarios” por categorías.¹⁸ En 2014 se aprueba en nuestro país el PRAN (*Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos*) a iniciativa de la unión europea, cuyo objetivo es reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antimicrobianos y, consecuentemente, reducir el impacto de este problema sobre la salud de las personas

INTRODUCCIÓN

y los animales, preservando de manera sostenible la eficacia de los antibióticos existentes; propone seis líneas estratégicas que abarcan la salud humana y la sanidad animal.¹⁹

Es patente que el consumo antibiótico es el principal factor desencadenante de la resistencia a agentes antimicrobianos. La asociación entre consumo de antibióticos y resistencia está bien documentada a nivel espacial y temporal en hospitales,²⁰ residencias de ancianos,²¹ instalaciones de atención primaria²² y en el ámbito comunitario,²³ así como en los distintos países.²⁴ Estudios epidemiológicos ya han demostrado la relación directa entre el consumo antibiótico y la emergencia y diseminación de cepas bacterianas resistentes.²⁵ Éste aumentó un 65% en el período comprendido entre 2000 y 2015 y se estima que se eleve por encima de un 200% en 2030, si no se adoptan políticas correctoras.²⁶ Además, se ha registrado un importante incremento global en el consumo de antimicrobianos de último recurso como son los carbapenémicos y la colistina, consistente con el aumento en el número de infecciones resistentes a estos agentes antimicrobianos.²⁶

Este rápido incremento de bacterias resistentes se explica de la siguiente manera, los genes que codifican para estos mecanismos de resistencia pueden ser heredados de una cepa parental o pueden ser adquiridos desde cepas no relacionadas mediante elementos genéticos móviles como integrones, transposones o plásmidos. Esta transferencia horizontal hace posible que la resistencia se transmita entre bacterias de diferentes especies.²⁷

Los plásmidos son elementos extracromosómicos de ADN circular presentes en la bacteria, capaces de replicarse independientemente del genoma del hospedador. La transferencia horizontal de plásmidos que contienen genes de resistencia es un mecanismo esencial para la dispersión de resistencia antimicrobiana.²⁸ Este libre movimiento de genes de resistencia transmitidos por plásmidos ha sido clave en la reciente y rápida expansión global de la resistencia antimicrobiana.²⁹

En este contexto, los clones bacterianos “exitosos” son una fuente poderosa para la propagación de componentes genéticos resistentes a antimicrobianos, proporcionando plataformas estables para el mantenimiento y propagación de genes

responsables de la resistencia antimicrobiana desempeñando un papel esencial en la reciente emergencia global de microorganismos Gram-negativos multirresistentes, especialmente en el caso de las *Enterobacteriaceae*.²⁹ Esta expansión ha sido facilitada por otros factores como bajas condiciones higiénico-sanitarias tanto en el ambiente hospitalario como en el comunitario y el creciente aumento de los viajes, el comercio y la transmisión de enfermedades a nivel mundial.¹¹

Las *Enterobacteriaceae*, especialmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son agentes etiológicos comunes de infecciones nosocomiales y comunitarias entre humanos. La expansión de clones exitosos de *E. coli* ST131, con frecuencia resistente a fluoroquinolonas y asociado con la producción de betalactamasas de tipo CTX-M-15 y de *K. pneumoniae* ST258, asociado con la producción de carbapenemasas de tipo KPC-2 y KPC-3 con mayor frecuencia,²⁹ ha provocado un rápido incremento en la resistencia a antimicrobianos frecuentemente usados como las fluoroquinolonas y betalactámicos, como son las cefalosporinas y carbapenémicos, reduciendo las opciones de tratamiento.

La terapia antibiótica con betalactámicos es considerada uno de los tratamientos de primera elección para infecciones graves por *Klebsiella spp* y *E. coli* y la presencia de betalactamasas es la causa más común de resistencia a estos agentes.²⁹ Concretamente, las betalactamasas con mayor relevancia clínica son las de “espectro expandido”, enzimas con actividad frente a cefalosporinas con cadena lateral oximinio y/o carbapenémicos. Estas enzimas se clasifican en: betalactamasas de tipo AmpC plasmídico (por ejemplo los tipos CMY), betalactamasas de espectro extendido de tipo A (BLEE) (por ejemplo los tipos CTX-M, SHV y TEM), y carbapenemasas, de clase A (por ejemplo los tipos KPC); metalobetalactamasas de clase B (por ejemplo los tipos VIM, IMP y NDM) y las oxacilinasas de clase D como las enzimas tipo OXA-48.²⁹ El tipo de BLEE más extendido a nivel mundial es la betalactamasa CTX-M,³⁰ siendo las betalactamasas NDM, OXA-48 y KPC, las carbapenemasas más frecuentes entre los aislados de *Enterobacteriaceae* nosocomiales y comunitarios.³¹

Dentro de los “patógenos prioritarios” de importancia crítica descritos por la OMS destacan otros bacilos Gram-negativos como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y *Enterobacteriaceae* resistente

INTRODUCCIÓN

a carbapenémicos y a cefalosporinas de 3ª generación.¹⁵ Los datos de resistencia de estos patógenos a esos antimicrobianos están recogidos en el informe anual de resistencias elaborado por el ECDC, a través de la EARS-Net, en el que se analizan los datos correspondientes al año 2016 y se evalúa la tendencia seguida desde 2013.³² La situación de la resistencia antimicrobiana en Europa muestra amplias variaciones entre regiones, con mayor porcentaje de datos de resistencias recogidos en el sur y este de Europa que en el norte.

Para *E. coli*, el mayor porcentaje medio de resistencia en 2016 fue informado para aminopenicilinas (57,4%), seguido por fluoroquinolonas (21%, siendo >40% en países como Bulgaria, Chipre, Italia, Malta y Eslovaquia), cefalosporinas de tercera generación (12,4%) y aminoglucósidos (9,8%); siendo la resistencia a carbapenémicos poco frecuente (<0,1%). Así mismo se registró un incremento significativo en la resistencia combinada a cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos en el período de 2013-2016.³²

Para *K. pneumoniae*, el mayor porcentaje de resistencia en 2016 fue informado para cefalosporinas de tercera generación (25,7%), seguido por fluoroquinolonas (24,6%; alcanzando valores >60% en Grecia, Polonia, Rumania y Eslovaquia), aminoglucósidos (19%) y carbapenémicos (6,1%; con enormes variaciones entre países, >30% en Italia y Rumania y >60% en Grecia). Sin embargo, se observó un descenso significativo en la resistencia combinada al contrario que en *E. coli*.³²

Para *Acinetobacter spp*, la resistencia registrada a carbapenémicos en 2016 fue de >60% para los países del sur y Este de Europa, alcanzando valores de 62,3% en España y >90% en Croacia y Grecia. Para *Pseudomonas aeruginosa*, la resistencia a carbapenémicos se centra fundamentalmente en las regiones del Este con valores >25% y en Grecia donde alcanza 40% y desde 2013 ha aumentado de forma significativa en España y Croacia.³²

Con todo esto, se pone de manifiesto el aumento creciente de patógenos bacterianos multirresistentes, su rápida expansión a nivel mundial y la necesidad de llevar a cabo un plan conjunto que incluya a todos los sectores implicados para establecer estrategias que frenen su avance.

3. Estrategias para la lucha contra la resistencia antimicrobiana

El uso de los agentes antimicrobianos se ha hecho extensivo también a áreas no humanas, como la veterinaria y la agricultura, estando insuficientemente regulado en muchas ocasiones. Sin embargo, hay que tener especial precaución con este tipo de fármacos, diferentes a otras clases, ya que los efectos que se derivan de su uso van más allá del paciente individual tratado, contribuyendo al desarrollo de resistencia antimicrobiana.¹¹ Las estrategias implementadas a nivel nacional han resultado ser las más exitosas en el control de la resistencia.³³⁻³⁶ De forma general se proponen varias estrategias para frenar este problema.

3.1. Prevención de las infecciones

En la época actual, donde nos encontramos con un importante número de bacterias multirresistentes o panresistentes y donde el número de nuevos antimicrobianos es muy escaso, adquiere especial importancia las medidas de vigilancia y control de infecciones, especialmente relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS), como estrategia eficaz en la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

Entre las medidas a tomar destacan la limpieza ambiental y sistemas de gestión de los residuos, controlando por ejemplo los métodos de saneamiento de aguas residuales, “puntos calientes” para la transferencia horizontal de genes de resistencia entre microorganismos.³⁷ Así mismo, es necesario educar a la población en medidas de higiene básicas como es el lavado de manos.³⁸ Éste ha demostrado ser de gran ayuda para reducir las infecciones asociadas a los cuidados sanitarios junto con las medidas de aislamiento de pacientes infectados/colonizados.^{39,40}

3.2. Uso racional y optimizado de los antimicrobianos

Se trata de una política de uso racional y optimizado de los antimicrobianos que incluya un paquete de medidas que establezca una lista de fármacos de uso restringido;

se realicen estudios de resistencia local que permitan elaborar guías de tratamiento estándar en función del tipo de infección y del mapa de resistencia local del momento; se controle el cumplimiento de dichas medidas; se realicen cursos masivos de formación y reciclaje a los profesionales sanitarios implicados.^{41,42} En nuestro país, estas medidas de vigilancia y control de la infección se llevan a cabo en el marco de los programas PROA (Programas de Optimización de uso de Antimicrobianos).⁴³ A nivel autonómico también es necesario implementar estos programas para recabar información acerca de los datos de resistencia local y regional. En la comunidad autónoma de Andalucía se ha desarrollado el programa PIRASOA (Programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos). Estos programas aplicados de forma efectiva han demostrado un descenso en el uso de agentes antimicrobianos en torno a un 20-40%, en la incidencia de las infecciones asociadas a los cuidados sanitarios (*Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), en la duración de la estancia y en la prevalencia de la resistencia bacteriana.^{44,45} Estos programas están desarrollados por equipos PROA multidisciplinares que integran a infectólogos, farmacéuticos, microbiólogos, preventivistas, enfermeros y otros especialistas de áreas implicadas.^{46,47}

3.3. Reducir el uso de agentes antimicrobianos con fines no terapéuticos

Desde su descubrimiento, los antimicrobianos se han utilizado en el ámbito de la veterinaria con distintos fines además del terapéutico. Desde finales de la década de los 40, cuando se demostró la capacidad de estos agentes como promotores del crecimiento, se han venido utilizando como suplemento alimenticio en los animales de granja.⁴⁸ A pesar de que algunos de estos fármacos eran de uso exclusivo en veterinaria, otras clases no, como los macrólidos, de uso en humanos. A lo largo de estos años, cada país se ha pronunciado al respecto, en 1986, Suecia prohibió su uso con este objetivo, a finales de la década de los 90 lo hizo Dinamarca, Finlandia y Noruega y en 2006, los países europeos restantes decidieron abandonar el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento. Sin embargo en otras regiones del mundo esto no es así.¹¹ En China, por ejemplo, la prohibición de la colistina con este fin no fue efectiva hasta

2017.⁴⁹ Este antimicrobiano se considera de último recurso en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes en humanos y la posible transmisión de este determinante de resistencia de animales a humanos ha alarmado e impulsado regulaciones específicas en Europa que restrinjan su uso en veterinaria.⁵⁰ El efecto que estas concentraciones subterapéuticas de antimicrobianos tienen en la emergencia de resistencia ya se ha demostrado para varias sustancias.⁵¹ Este hecho, junto al uso de los antimicrobianos con finalidad terapéutica ya sea como profilaxis o para el tratamiento de las enfermedades comunes en animales, como diarreas en las crías y de las mastitis, frecuentes en vacas que producen leche, han ocasionado la emergencia de aislados de enterobacterias productoras de BLEE, enterobacterias productoras de carbapenemasas y de *S. aureus* resistentes a meticilina en piensos y derivados cárnicos y en la leche.⁵¹⁻⁵⁵ Existen programas de optimización del uso de antimicrobianos en el ámbito de la agricultura y la ganadería dirigidos por la FAO (*Food and Agriculture Organization*) dependiente de las naciones unidas, integrados en el plan de acción global frente a la resistencia antimicrobiana.⁵⁶ Así mismo, son necesarios programas de vigilancia, prevención y control de la infección, equivalentes a los de la medicina en humanos, aplicados al sector veterinario.⁵⁷

3.4. Desarrollo de nuevos antimicrobianos

La resistencia, es un fenómeno natural que desarrollan los microorganismos cuando son sometidos a presión antibiótica y el uso que se haga de estos antimicrobianos solo va a determinar la rapidez con que esta aparezca. Por ello, además de llevar a cabo programas de prevención y uso racional de antimicrobianos, es necesaria la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos. Sin embargo, el desafío científico en la búsqueda de nuevos antimicrobianos, los requerimientos legales para su aplicación en clínica y un fracaso en la industria que los comercializa, debido por ejemplo a la ausencia de incentivos a las empresas para desarrollar fármacos, los cuales tendrán un uso restringido, ha hecho que los antimicrobianos en fase de estudio sean muy limitados.¹¹

INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 80, el número total de antimicrobianos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) ha disminuido significativamente, con un ligero ascenso en los últimos 10 años. En este periodo han sido aprobados ocho antimicrobianos: ceftarolina, fidaxomicina, bedaquilina, dalbavancina, tedizolid, oritavancina, ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam⁵⁸ y más recientemente delafloxacino y meropenem-vaborbactam, entre otros.⁵⁹

Sin embargo, muchos de los nuevos antimicrobianos, son activos frente a bacterias Gram-positivas, cuando el principal desafío sigue siendo encontrar nuevos antimicrobianos que tengan como diana las bacterias Gram-negativas, identificadas como patógenos de prioridad crítica según la OMS para las políticas de investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos.⁶⁰

De los 48 nuevos antimicrobianos en fase de desarrollo, de administración intravenosa, solo 18 muestran actividad frente a bacterias Gram-negativa y solo 6 (todos ellos fármacos modificados de clases de antimicrobianos conocidas) han progresado a fase 3.⁶¹

Hay diversas instituciones que ya se han hecho eco del problema y han elaborado documentos y tomado medidas al respecto marcándose objetivos a medio-largo plazo. El programa impulsado por la OMS en 2015, denominado “*Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*”, tiene entre sus objetivos fomentar políticas de investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. Por otro lado, la sociedad científica IDSA, (*Infectious Disease Society of America*) lanzó la “*10 x 20 Initiative*” en 2010, mediante la cual se propuso como objetivo desarrollar diez antimicrobianos nuevos, seguros y eficaces para el 2020.⁶² En 2011, la Comisión Europea inició un programa denominado IMI, “*Innovative Medicines Initiative*” destinado a mejorar la eficiencia en la investigación y en la búsqueda de nuevos antimicrobianos mediante un intercambio de conocimientos abiertos. El resultado es el programa ND4BB, “*New Drugs 4 Bad Bugs*”, formado por varios proyectos que abarcan los distintos aspectos del desarrollo de un antimicrobiano: TRANSLOCATION, se encarga del estudio de las bases moleculares de la resistencia; ENABLE, del descubrimiento de nuevos fármacos; familia COMBACTE e iABC, del desarrollo de fármacos y DRIVE-AB, que abarca la parte económica y de vigilancia.⁶³

3.5. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas

La rápida expansión de la resistencia antibiótica al poco de ser introducida una nueva clase de antimicrobianos para uso en clínica se ha producido por varias razones: i) algunos mecanismos de resistencia antibiótica ya existían, aunque a bajos niveles, antes del uso de estos agentes;^{2,64} ii) la masa biológica de las bacterias es muy importante, de tal manera que incluso mutaciones raras se producen frecuentemente permitiendo la selección de mutantes; iii) los determinantes de resistencia antibiótica se localizan con frecuencia en elementos genéticos móviles y pueden ser propagados de unas bacterias a otras por transferencia génica horizontal incluso entre distintas especies;^{4,65} iv) la diana fundamental de los antimicrobianos son los mecanismos de crecimiento bacteriano que son compartidos por los diversos microorganismos y la interrupción de estos mecanismos impone una presión selectiva severa a través de la cual la bacteria se debate entre la muerte o la mutación para sobrevivir lo que favorece la resistencia.

Tradicionalmente, los antimicrobianos han bloqueado procesos celulares clave como la síntesis de ADN, como es el caso de las fluoroquinolonas o del trimetoprima-sulfametoxazol; de ARN, como las rifamicinas; de proteínas, algunos ejemplos son las tetraciclinas, aminoglucósidos y macrólidos o de la pared celular, este es el caso de los betalactámicos o de los glucopéptidos; estrategias exitosas y suficientes hasta el momento para el tratamiento de la infección.⁶⁶

Sin embargo, con el aumento de las tasas de resistencia y su expansión a nivel mundial son necesarias además de las medidas expuestas anteriormente y de los antimicrobianos clásicos, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para tratar o prevenir infecciones bacterianas. Se ha observado que concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos, cuyas causas son diversas y a las que estamos expuestos con frecuencia,⁶⁷ además de seleccionar bacterias resistentes, inducen cambios fisiológicos en la bacteria relacionados con el proceso de intercambio genético, mutagénesis, virulencia y producción de *biofilm*^{67,68} contribuyendo a la multiresistencia antibiótica. Se han propuesto estrategias anti-virulencia que poseen ciertas ventajas con respecto a los antimicrobianos tradicionales.⁶⁹ El principal potencial de estos agentes sería su

capacidad para reducir, eliminar o incluso revertir la presión selectiva causada por los antimicrobianos; la existencia de una enorme cantidad de posibles dianas virulentas, ayudaría a combatir el problema de la escasez de antimicrobianos en desarrollo y el poco impacto sobre la flora comensal, la convierten en una estrategia de interés. La lista de factores de virulencia es enorme y diversa e incluye adhesinas, toxinas, sistemas de secreción, sideróforos, factores de evasión y modulación inmune, factores que promueven la producción de *biofilm*, además de factores reguladores como el *quorum sensing*. Este último es de gran relevancia, inhibidores del *quorum sensing* pueden prevenir la producción de múltiples factores de virulencia.⁶⁹

Por lo tanto, la utilización combinada de antimicrobianos tradicionales con compuestos capaces de inhibir estos procesos que favorecen el desarrollo de bacterias resistentes y con mayor grado de patogenicidad, podría ser una eficiente estrategia terapéutica para combatir infecciones bacterianas de difícil tratamiento. Entre estos mecanismos destaca la respuesta SOS bacteriana,^{66,70,71} debido a su implicación en los procesos anteriormente mencionados, como una posible diana terapéutica en combinación con antimicrobianos bactericidas ampliamente utilizados como las fluoroquinolonas.⁷²

4. Respuesta SOS y multirresistencia

En respuesta al daño en el ADN, como el causado por algunos antimicrobianos, se van a inducir variaciones genéticas en la bacteria, con el objetivo de reparar su genoma y sobrevivir. En este proceso están involucrados sistemas bacterianos de respuesta al estrés, entre los que destaca la respuesta SOS. La inducción de la respuesta SOS bacteriana, además de reparar el ADN, conduce a un estado de alta mutabilidad (hipermutación transitoria) debido a las polimerasas de la síntesis por translesión que permite a las bacterias incrementar su oportunidad de sobrevivir en condiciones de estrés, por ejemplo tras contacto con antimicrobianos. Muchos trabajos apoyan la idea de que concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos inducen mutagénesis mediada por la respuesta SOS.⁷³⁻⁷⁷ De hecho, para antimicrobianos como las

fluoroquinolonas las mutaciones puntuales suponen el principal mecanismo de resistencia adquirida.⁷⁸ La facilidad con que esta clase de antimicrobianos desarrollan resistencia asociada a la inducción de la respuesta SOS, unido a su amplio uso en clínica, hacen que la combinación de fluoroquinolonas y la inhibición de la respuesta SOS, pueda ser una buena estrategia terapéutica para combatir la multiresistencia antibiótica, tanto en términos de restricción de su desarrollo como de reversión de la misma.

5. Quinolonas

5.1. Origen e historia

Las quinolonas son agentes antimicrobianos de amplio espectro que se descubrieron en los años 40 de forma accidental en el contexto de la síntesis de agentes antimaláricos. En 1962, Leshner y colaboradores desarrollaron la primera quinolona de uso clínico: el ácido nalidíxico, con actividad frente a ciertos bacilos Gram-negativos,⁷⁹ derivada del compuesto 1,8-naftiridona (Figura 2) y formada por dos anillos, con dos nitrógenos en la posición 1 y 8, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4;⁸⁰ a diferencia del núcleo básico de las quinolonas, constituido por una molécula de 4-quinolona con un grupo carboxilo en posición 3 (Figura 3).

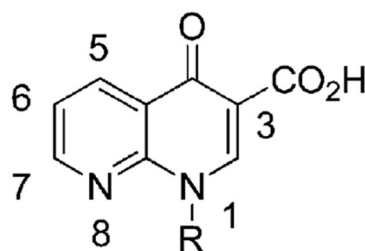


Figura 2. Estructura básica de 1,8-naftiridona

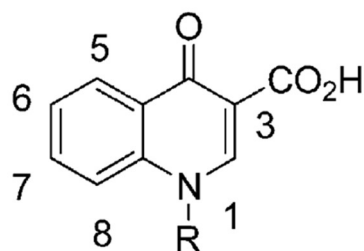


Figura 3. Estructura básica de la quinolona

Sobre este compuesto, se han llevado a cabo diversas modificaciones para obtener moléculas con mayor espectro de acción y mejores características farmacocinéticas que el ácido nalidíxico.⁸¹ A pesar de que su uso fue limitado a causa de su estrecho espectro

de acción y toxicidad, en la década de los 80, se recuperó para el tratamiento de infecciones urinarias y gastrointestinales debido al desarrollo de resistencia en aislados de *Shigella* y *E. coli* a otras clases de antimicrobianos usados.⁸²

Las modificaciones más relevantes fueron la adición de un átomo de flúor en la posición 6 y la adición de un grupo piperacínico o metil-piperacínico en posición 7. Estas modificaciones condujeron a una mayor actividad biológica y mejores propiedades farmacocinéticas (buena absorción oral y amplia distribución tisular). Este grupo de quinolonas se conoce como fluoroquinolonas, antimicrobianos de primera línea utilizados para el tratamiento de múltiples procesos infecciosos.^{83,84}

5.2. Estructura y clasificación

La estructura de las quinolonas de uso clínico está formada por dos anillos, con 1 átomo de nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. Las quinolonas, pueden clasificarse al igual que otras familias de antibióticos, en generaciones, en función de su espectro de acción y perfil farmacocinético (Figura 4 y Tabla 1). En esta clasificación las quinolonas quedan agrupadas en cuatro generaciones, quedando fuera las quinolonas híbridas.⁸⁵ Sin embargo, existen ligeras variaciones según autores.^{81,82,84,86,87}

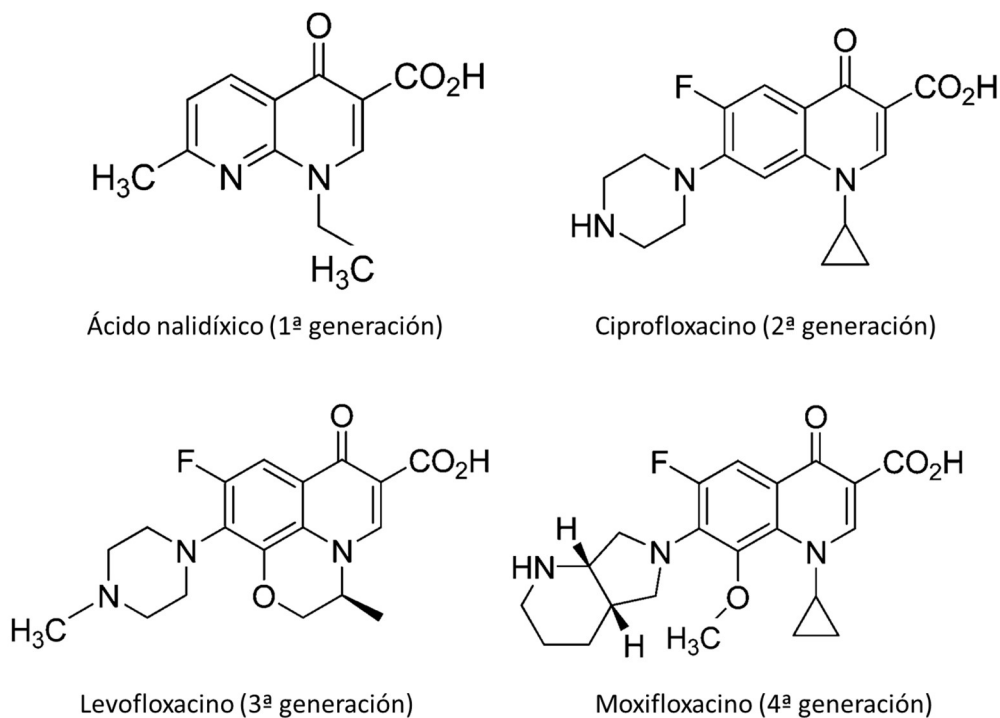


Figura 4. Estructura química de diferentes quinolonas correspondientes a distintas generaciones.

La primera generación de quinolonas (ácido nalidíxico y ácido pipemídico), es activa frente a algunas bacterias Gram-negativas, se utilizan para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas ya que debido a sus parámetros farmacocinéticos solo alcanzan una concentración adecuada en las vías urinarias.

Las quinolonas de segunda generación (norfloxacino y ciprofloxacino) presentan un átomo de flúor en posición 6 y un grupo piperacínico o metil-piperacínico en posición 7, mejorando las propiedades farmacocinéticas de las anteriores, pudiendo llegar a actuar también frente a microorganismos Gram-positivos e incluso *Pseudomonas spp.*

Las quinolonas de tercera generación (levofloxacino), además de presentar un átomo de flúor en posición 6, presentan una gran variedad de sustituciones en las posiciones 1, 7 y 8 permitiendo ampliar el espectro de acción sobre bacterias Gram-positivas, siendo activas frente a *Streptococcus pneumoniae* y *S. aureus*.^{81,85}

INTRODUCCIÓN

| Generación | Quinolona | Actividad | Indicaciones |
|--------------------------------|---|--|---|
| Primera generación | Ácido nalidíxico Cinoxacina Ácido pipemídico | Gram-negativos (salvo <i>Pseudomonas</i>) | Infecciones del tracto urinario no complicadas |
| Segunda generación Clase I | Norfloxacinó Lomefloxacinó | Gram-negativos (salvo <i>Pseudomonas</i>) | Infecciones del tracto urinario no complicadas |
| Segunda generación Clase II | Ciprofloxacino Ofloxacino | Gram-negativos, algunos Gram-positivos y patógenos atípicos | Infecciones del tracto urinario e infecciones sistémicas |
| Tercera generación | Levofloxacino Esparfloxacino Gatifloxacino | Gram-negativos, algunos Gram-positivos (alternativa frente a <i>S. pneumoniae</i> y estafilococos sensibles a metilina) y patógenos atípicos | Infecciones del tracto urinario, infecciones sistémicas e infecciones respiratorias |
| Cuarta generación | Moxifloxacino Trovafoxacino Clinafloxacino Sitafloxacino | Gram-negativos, Gram-positivos, anaerobios y patógenos atípicos | Infecciones del tracto urinario, infecciones sistémicas, infecciones respiratorias e infecciones intrabdominales. |

Tabla 1. Características generales de las quinolonas clasificadas por generaciones

Las quinolonas de cuarta generación (moxifloxacino) presentan una elevada potencia y un espectro de acción más amplio, pudiendo actuar frente a algunas especies de micobacterias y anaerobios.

5.3. Mecanismo de acción de las quinolonas

Esta familia de antimicrobianos tiene como diana las enzimas topoisomerasas del ADN tipo II, ADN girasa y topoisomerasa IV. Se trata de enzimas esenciales para el enrollamiento adecuado de la molécula de ADN garantizando procesos celulares como la replicación o la transcripción. El corte en las hebras de ADN llevado a cabo por las topoisomerasas, será aprovechado por estos antimicrobianos que van a impedir la

ligación de las hebras ocasionando la fragmentación del cromosoma y la muerte celular si los mecanismos de reparación del ADN bacteriano no son suficientes.

5.3.1. Estructura y función de las topoisomerasas

Las topoisomerasas son enzimas que controlan la topología del ADN. Se clasifican en dos tipos, I y II en función de si provocan la rotura de una o de ambas hebras del ADN, respectivamente. De forma general, ambas actúan de manera similar: provocan rotura en el ADN, promueven el paso de la hebra a través de la rotura y finalmente llevan a cabo el sellado de la rotura. Su condición de enzimas esenciales en la bacteria y el hecho de que sus reacciones lleven consigo roturas en el ADN, han ocasionado que las topoisomerasas sean importantes dianas terapéuticas.⁸⁸

Las topoisomerasas de tipo I, actúan eliminando superenrollamientos negativos y relajando el ADN. Por su parte, las topoisomerasas de tipo II constituyen la diana de las quinolonas, concretamente la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Estas enzimas son imprescindibles para procesos celulares como el empaquetamiento del ADN, la replicación, la transcripción o la recombinación.⁸⁹

La ADN girasa y la topoisomerasa IV son heterotetrámeros formados por dos subunidades A y dos subunidades B (Figura 5). Las subunidades de la ADN girasa están codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, siendo para la topoisomerasa IV, *parC* y *parE* en bacterias Gram-negativas y *griA* y *griB* en bacterias Gram-positivas.⁹⁰

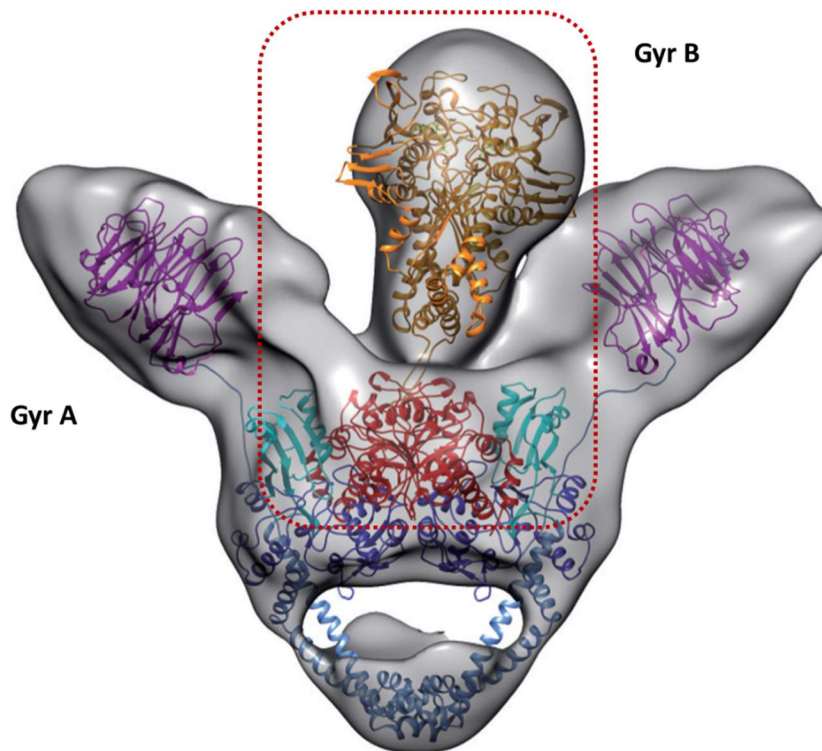


Figura 5. Estructura de la ADN girasa de *Thermus thermophilus*. Adaptado de Papillon y cols.⁹¹

En bacterias Gram-negativas, la topoisomerasa inhibida principalmente por las quinolonas es la ADN girasa, mientras que en bacterias Gram-positivas, la principal diana inhibida por estos antimicrobianos es la topoisomerasa IV, aunque esto no es siempre así y para una especie bacteriana determinada la principal diana puede ser dependiente del tipo de quinolona utilizada.^{81,88,90}

A pesar de que ambas enzimas pertenezcan a las topoisomerasas de tipo II, poseen distintas funciones en la célula. La topoisomerasa IV tiene un papel clave en la separación de las hebras de ADN tras cada replicación y en la relajación de la molécula de ADN por eliminación de superenrollamientos. Por otra parte, la ADN girasa se encarga de mantener un nivel de enrollamiento adecuado en la molécula que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y en la transcripción y es la única enzima capaz de introducir superenrollamientos negativos en el ADN. Estas diferencias funcionales se derivan de su estructura.⁸¹

En ambas enzimas, la subunidad B (GyrB/ ParE) consta de un dominio amino-terminal responsable de la unión al ATP y de su hidrólisis, permitiendo los cambios conformacionales necesarios en las proteínas para la reacción, y un dominio carboxi-terminal que interacciona con la subunidad A (GyrA/ParC) formando la enzima funcional, y con la molécula de ADN; alberga el dominio TOPRIM, que une iones metálicos necesarios para la escisión y rotura de la molécula (Figura 6). Por otro lado, la subunidad A (GyrA/ ParC), contiene el residuo de tirosina (en posición 122 para GyrA y 120 para ParC) en el dominio amino-terminal,⁹² constituyendo el sitio activo del enzima; se trata de una región muy conservada, donde se localiza la región QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) donde se concentran las mutaciones responsables de la resistencia a quinolonas. Finalmente, su extremo carboxi-terminal permite la envoltura del ADN.^{88,90,93–95} Resumiendo, la subunidad A de la enzima se encarga de la rotura y ligación de las hebras de ADN, mientras que la subunidad B presenta función ATPasa.

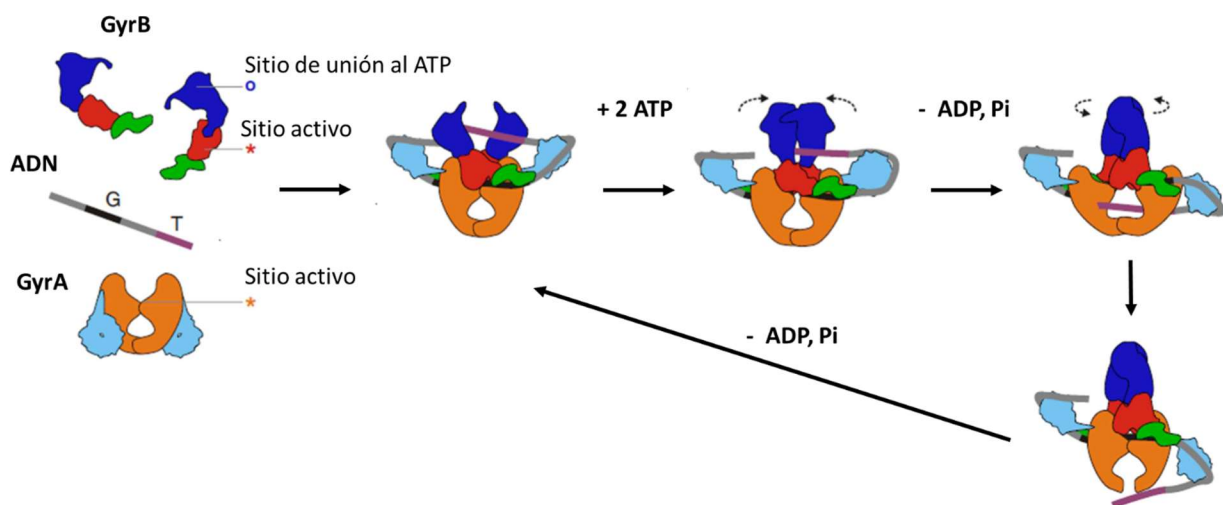


Figura 6. Mecanismo de acción de la ADN girasa, adaptado de Costenaro y cols.⁹⁶

A pesar de que ambas enzimas, tienen dominios funcionales similares, hay una región en el extremo carboxi-terminal de GyrA, cuya estructura difiere con la de ParC. Se trata de una secuencia de 7 aminoácidos conservados en todas las ADN girasas (“GyrA box”), responsable de la actividad específica de la enzima que consiste en introducir superenrollamientos negativos.^{93,97}

5.3.2. Mecanismo de acción de las quinolonas

Estudios cristalográficos de las topoisomerasas tipo II, ADN girasa y topoisomerasa IV, han permitido analizar las interacciones que se producen entre estas enzimas y las quinolonas.

Estructuras iniciales situaron al fármaco en un lugar próximo a los residuos de serina y residuos ácidos (ubicados cuatro residuos más abajo), pero pronto se observó que los aminoácidos no se encontraban lo suficientemente próximos en el espacio para que esta interacción tuviera lugar de forma directa.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Finalmente, una estructura más tardía permitió distinguir un complejo de quinolona que contenía un ion Mg^{2+} quelado por los grupos carboxi en C-3 y ceto en C-4¹⁰¹ (Figura 7). Este ion metálico se coordinaba a 4 moléculas de agua, y dos de estas moléculas se localizaban próximas a la serina y a los residuos ácidos formando puentes de hidrógeno. En base a estos hallazgos estructurales, y a un estudio anterior que vislumbraba que los iones metálicos tenían un papel relevante en la acción de las quinolonas,¹⁰² se sugirió que el puente de hidrógeno mediado por el ion metálico “anclaba” el fármaco a la enzima con participación de los residuos de Ser83 y Asp/Glu87 en *E. coli*.¹⁰¹ Posteriormente, estudios funcionales han caracterizado el papel que desempeña en las uniones quinolona-enzima^{103,104} y se ha demostrado que supone la interacción primaria entre las quinolonas y las topoisomerasas tipo II.⁹⁰ Esto explica que las principales interacciones entre las quinolonas clínicamente relevantes y sus enzimas dianas estén mediadas por las posiciones C-3 y C-4 del fármaco, y podría explicar la tolerancia para la diversidad estructural de sustituciones en las posiciones N-1, C-7 y C-8 de esta clase de antimicrobianos.¹⁰⁵

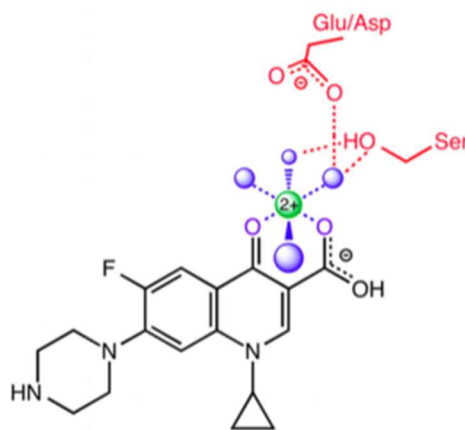


Figura 7. La unión quinolona-topoisomerasa está mediada por enlaces establecidos entre el ion magnesio y moléculas de agua que afectan a los grupos carboxilo y ceto en posiciones 3 y 4, respectivamente y a los aminoácidos señalados.⁹⁰

Según este modelo de unión a la quinolona mediado por un ion magnesio no catalítico, dos moléculas de antimicrobiano se intercalan separadas una distancia de 4 pares de bases en los dos sitios de escisión del ADN y la interacción de la enzima-ADN favorece la unión de moléculas de quinolona incrementando la formación de complejos escindidos y la fragmentación cromosómica.^{90,106} El efecto potenciador de la fragmentación cromosómica llevado a cabo por las quinolonas va más allá de la simple inhibición del resellado del ADN roto atribuido a inhibidores catalíticos.

Sin embargo, parece que existen distintas formas de unión de la quinolona a la enzima en función de si el sustituyente en C-7 interacciona con GyrB/ ParC o con GyrA/ ParE, esto condicionará los residuos implicados en la formación del puente de hidrógeno mediado por el ion metálico.

En el primer caso, el extremo del radical en C-7 se extiende hacia una región próxima al residuo en 466 de GyrB y el puente iónico afecta a los residuos 83 y 87 de GyrA y al extremo carboxilo en C-3 de la quinolona (Figura 8).

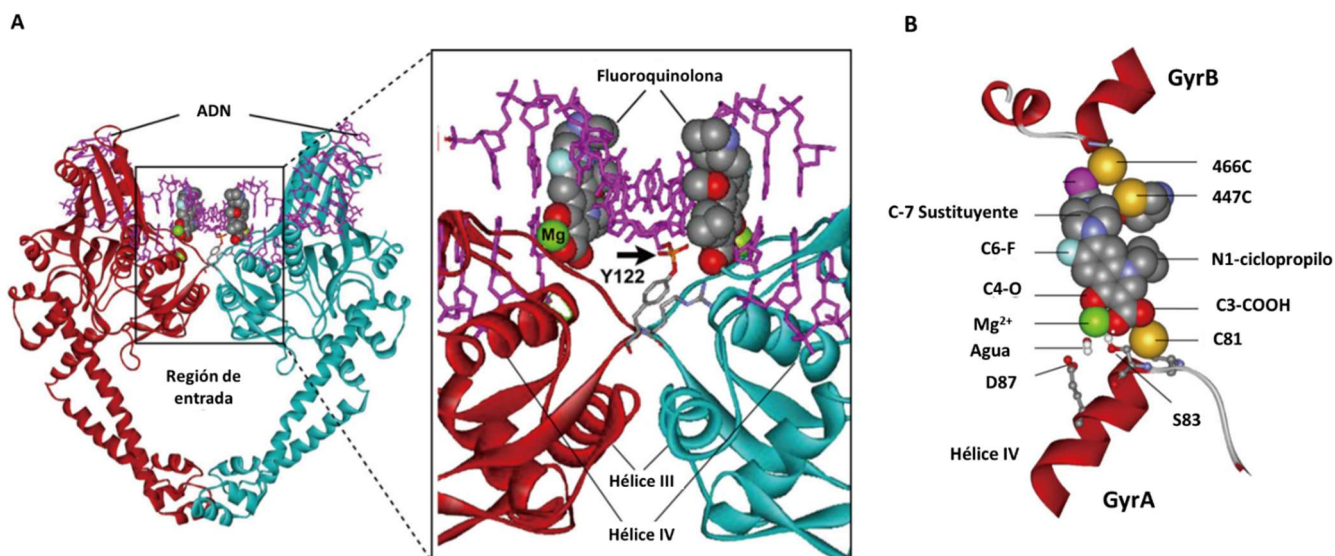


Figura 8. Estructuras del complejo topoisomerasa tipo II-ADN-quinolona. (A) Complejo escindido; estructura tridimensional de topoisomerasa IV de *A. baumannii* unido a ADN y moxifloxacino. (B) Modelo de unión del sustituyente en C-7 a los residuos en GyrB/ParC. Adaptado de Mustaev y cols.¹⁰⁷

En el segundo caso, el sustituyente en C-7 interacciona con el residuo 81 en GyrA y caben dos posibilidades. Por un lado, que se produzca una inversión en la orientación del fármaco, afectando el puente iónico a los grupos carboxilo y cetona en C-3 y C-4, respectivamente y al aminoácido Glu en posición 466 de GyrB (Figura 9A). Aunque se han observado otras uniones como la del residuo Lys en posición 447 de GyrB y el grupo carboxilo de la fluoroquinolona, el cual es funcionalmente análogo a la interacción del grupo carboxilo de la fluoroquinolona con el residuo de Arg en posición 121 de GyrA como muestran los datos revelados por las estructuras cristalinas. La otra posibilidad implica la unión de la quinolona a otra región. Se ha identificado un potencial bolsillo de unión localizado entre las subunidades GyrA-GyrA que afectan a los residuos Gly81 y Asp87 (Figura 9B). Este modelo explica los efectos de las sustituciones aminoacídicas que con frecuencia confieren resistencia al permitir la formación de un puente iónico mediado por el grupo carboxilo de la quinolona y el Asp en posición 87, y situar el sustituyente en C-7 en la proximidad del residuo 81 de GyrA.¹⁰⁷

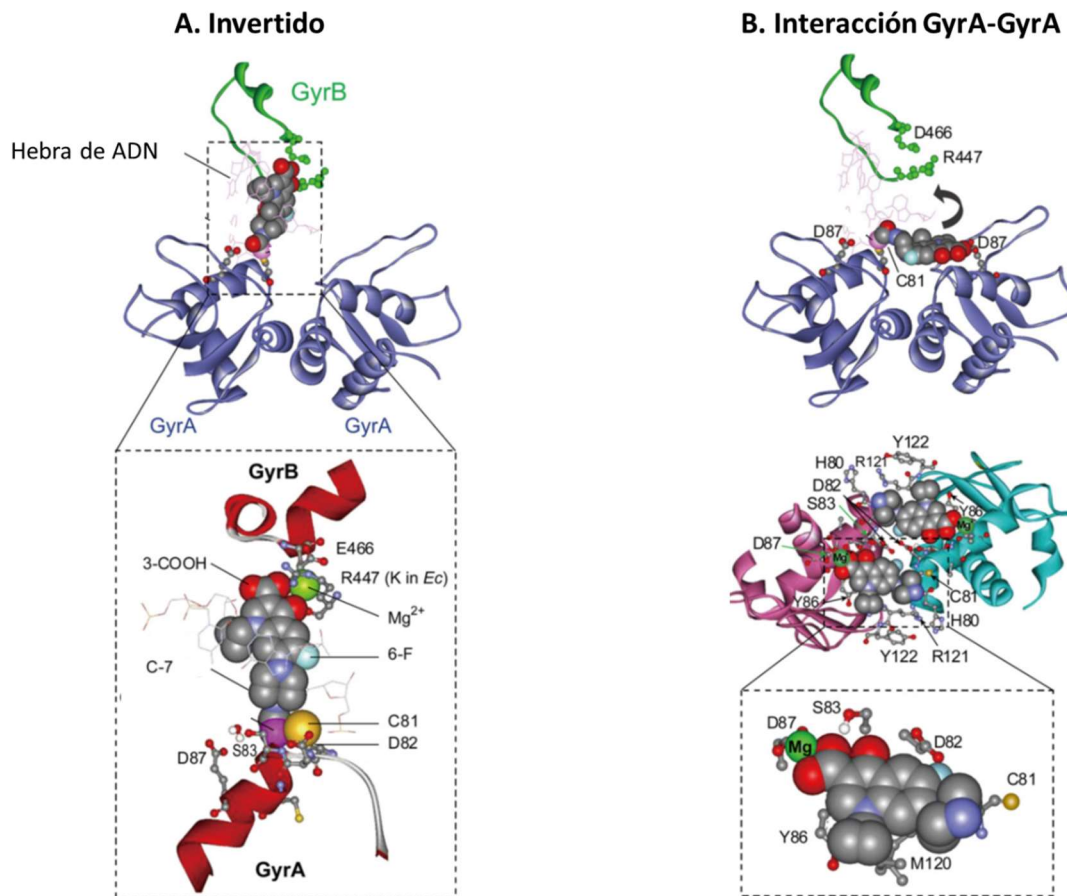


Figura 9. Modelos de unión de ciprofloxacino a los complejos de la ADN-girasa en los que se produce interacción entre el sustituyente en C-7 de la fluoroquinolona y el residuo en posición 81 de GyrA. Adaptado de Mustaev y cols.¹⁰⁷

Recientemente, otro estudio revela la importancia de las interacciones de apilamiento entre la fluoroquinolona-ADN para la estabilidad del complejo escindido en *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁰⁸ Se ha demostrado que la baja sensibilidad intrínseca de este microorganismo a las quinolonas se debe a uniones débiles que afectan a los residuos que conforman el puente mediado por el ion magnesio. Sin embargo, algunas fluoroquinolonas como moxifloxacino se encuentran entre los fármacos de segunda línea. El estudio de una serie de fluoroquinolonas demuestra que no todas son igual de eficaces y atribuyen su mayor potencia a la interacción de los radicales en C-7 con la molécula de ADN.¹⁰⁸

5.4. Efecto de las quinolonas sobre las células bacterianas

Estos antimicrobianos van a ocasionar el bloqueo del complejo escindido compuesto por la topoisomerasa-ADN roto-quinolona, impidiendo la religación y sellado de los segmentos por la enzima. Las quinolonas tienen un doble efecto sobre las células bacterianas, por un lado, un efecto bacteriostático y por otro, un efecto bactericida (Figura 10).

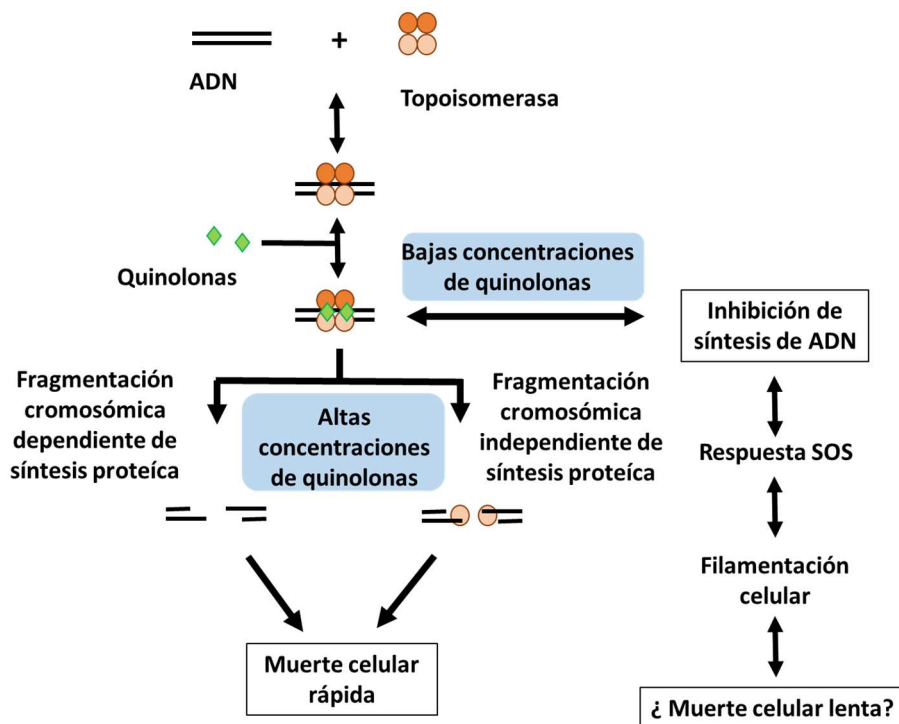


Figura 10. Representación esquemática de la acción de las quinolonas. Modificado de Cheng y cols.¹⁰⁶

El efecto bacteriostático ocurre a bajas concentraciones de quinolonas. La formación del complejo escindido, topoisomerasa-ADN roto-quinolona va a causar la detención de la horquilla de replicación, y a su vez la colisión de ambos complejos va a ocasionar en el ADN roturas de doble hebra.^{106,109,110} La detención del movimiento de la horquilla de replicación trae como consecuencia la inhibición de la replicación y del crecimiento celular. Sin embargo, se trata de un fenómeno reversible, no asociado a la acción letal de las quinolonas.¹⁰⁶ Durante esta etapa se podrían liberar fragmentos

monocatenarios de ADN (sin llegar a provocar una fragmentación extensa del cromosoma) que inducen la activación de la respuesta SOS.^{106,111} Este sistema está implicado en la reparación del ADN, recombinación y mutagénesis. Una de las consecuencias de la activación de este sistema es la expresión del gen *suIA*, gen que codifica un inhibidor de la división celular, promoviendo la filamentación celular.¹¹² Se sospecha que la inducción de esta ruta podría tener como consecuencia un enlentecimiento en la muerte celular.¹¹⁰

El efecto bactericida de las quinolonas se debe a la fragmentación cromosómica que pueden originar tras la liberación de los segmentos rotos de ADN de los complejos escindidos, distribuidos por todo el cromosoma, que llevan a la muerte celular. Las quinolonas producen fragmentación cromosómica por dos vías, una dependiente de la síntesis de proteínas y otra independiente de dicha síntesis.¹¹³ En general, las quinolonas más antiguas actúan a través de la primera vía y las más modernas mediante la segunda.¹¹⁴ En algunos casos, la acción letal de las quinolonas que actúan por la vía dependiente de la síntesis de proteínas, es inhibida en condiciones de anaerobiosis, subrayando la necesidad de la presencia de oxígeno para que algunos antimicrobianos lleven a cabo su actividad bactericida. En la ruta dependiente de la síntesis de proteínas, la fragmentación cromosómica podría deberse a 3 mecanismos: i) digestión de la girasa por proteasas, ii) corte en el ADN por una nucleasa a ambos lados del complejo quinolona-topoisomerasa-ADN o iii) desnaturalización de proteínas.¹¹⁰ En cualquiera de los casos se produce la liberación de extremos de ADN monocatenario que activan por diferentes vías la muerte celular. Por otro lado, la acción letal de las quinolonas mediante la vía independiente de síntesis de proteínas parece que está asociada a la capacidad de estos antimicrobianos de desestabilizar el complejo escindido por disociación de las subunidades GyrA ancladas a los extremos del ADN, quedando éstos al descubierto y provocando la muerte celular.¹¹⁵

5.5. Especies reactivas del oxígeno y acción bactericida de las quinolonas

Como se ha comentado anteriormente, las quinolonas pueden ejercer su acción bactericida por un mecanismo dependiente de la síntesis de proteínas, este es el caso del daño oxidativo ocasionado por las especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), derivadas de la respiración celular aerobia y la oxidación de metabolitos para la obtención de energía. Tras la entrada en la célula, el O₂ ambiental interacciona con las estructuras celulares que llevan a cabo la síntesis de ATP durante el proceso de fosforilación oxidativa. Este proceso lleva asociado la reducción del O₂ a agua y supone el mecanismo fundamental para la obtención de energía en los organismos aerobios. Las interacciones entre el O₂ y las moléculas biológicas, especialmente las flavoenzimas respiratorias, están estrechamente relacionadas con la formación de ROS. Las flavoenzimas, son cofactores catalíticos redox que rápidamente transfieren electrones al O₂ generando las ROS, formadas por los radicales superóxido (O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Sin embargo, se van a producir *in vivo* radicales hidroxilo altamente destructivos (OH[·]) vía reacción de Fenton, en la cual el H₂O₂ oxida el ion ferroso disponible (Fe²⁺) para generar OH[·] (Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH[·] + OH⁻). El O₂⁻ puede facilitar la obtención de hierro en el estado de oxidación adecuado de dos maneras, por un lado, interaccionando y reduciendo Fe³⁺ libre, o desestabilizando y/o liberando Fe²⁺ de los centros ferro-sulfurados de las enzimas. Mientras que la síntesis de enzimas bacterianas como las superóxido dismutasas y las catalasas son capaces de degradar los O₂⁻ y el H₂O₂, respectivamente, no se conoce ningún mecanismo de detoxificación celular para los OH[·].¹¹⁶

Los niveles de las ROS en la célula están sometidos a una estricta regulación. Más allá de las enzimas de detoxificación ROS (dismutasas y catalasas), la bacteria también contiene pequeñas proteínas redox (tioredoxina y peroxirredoxina) y moléculas que ayudan a mantener un ambiente intracelular reductor o eliminan el oxígeno reactivo (como son el glutatión y NADPH). Además, la bacteria produce enzimas que pueden reparar el daño oxidativo, incluyendo enzimas asociadas a la reparación del ADN, y enzimas proteolíticas y lipolíticas. Finalmente, la bacteria también produce poliaminas, cuya función se cree relacionada con la de secuestrar las ROS y proteger las membranas

de la peroxidación de los lípidos. Todas estas respuestas al estrés oxidativo están controladas por dos reguladores transcripcionales principales, OxyR y SoxRS, así como por el regulón de la respuesta general al estrés RpoS.¹¹⁷ Sin embargo, el equilibrio entre su producción y eliminación puede verse alterado con el consiguiente incremento de sus concentraciones en la bacteria ocasionando daño oxidativo. Los antibióticos bactericidas actúan induciendo una hiperactivación de la cadena respiratoria, favoreciendo la formación de ROS.^{118,119} Estos antimicrobianos van a ocasionar un aumento de O_2^- , que es convertido enzimáticamente a H_2O_2 , que lleva a la formación de OH^\cdot vía reacción de Fenton. La producción de altos niveles de OH^\cdot podría ser el mecanismo común de letalidad inducido en las bacterias por los antimicrobianos bactericidas.¹²⁰

El proceso general de formación de OH^\cdot tóxico se asocia al ciclo de los ácidos tricarbónicos y a la depleción transitoria de NADH, así como a la inestabilidad de los centros ferro-sulfurados de las enzimas y la alteración de la homeostasis del hierro.¹¹⁶ Como se ha indicado anteriormente, estos radicales no son degradados y se consideran altamente deletéreos para las células ya que pueden dañar directamente el ADN, lípidos y proteínas, o incluso oxidar el *pool* de deoxinucleótidos e indirectamente dañar el ADN. La muerte celular mediada por ROS, se asocia frecuentemente a la oxidación específica del *pool* de nucleótidos de guanina, muy sensible a la oxidación, y su incorporación posterior al ARN y ADN. Datos recientes apoyan esta hipótesis en *E. coli*, demostrando que la perturbación selectiva de la incorporación de 8-oxo-dGTP llevada a cabo por la ADN polimerasa IV condujo a una supervivencia incrementada tras el tratamiento con norfloxacin.¹¹⁷

Estudios revelan un incremento en la concentración de radicales hidroxilo tras el tratamiento con norfloxacin. El tratamiento con agentes que reducen el nivel de estos radicales, como es el caso de la tiourea, inhibieron la letalidad de la quinolona. También se observó una disminución de la letalidad causada por norfloxacin en mutantes deficientes para la enzima superóxido dismutasa, en concordancia con la implicación del H_2O_2 producido por la acción de esta enzima con la letalidad de las quinolonas. Por el

contrario, una deficiencia de la enzima catalasa elevó la actividad letal de norfloxacin, debido a que un incremento de H_2O_2 conduce a la acumulación de $OH\cdot$.¹⁰⁶

La producción de ROS mediada por antimicrobianos está asociada además de con las reacciones redox que se derivan del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, con otras rutas metabólicas como la glucólisis. Se ha observado que la utilización como fuente de carbono de moléculas con mayor número de átomos (hexosas) se asocia a una mayor letalidad que aquellas de menor tamaño (pentosas, gliceraldehído). El tratamiento de *E. coli* con antimicrobianos bactericidas también supuso un incremento en el consumo de oxígeno, confirmando de nuevo la hipótesis de que estos fármacos inducen alteraciones en la fisiología celular asociado a reacciones redox.¹¹⁷

Otro hallazgo interesante es la función protectora frente al daño oxidativo que desempeña el sulfuro de hidrógeno (H_2S) a bajas concentraciones, en contraposición con su efecto tóxico a altas concentraciones al desencadenar la reacción de Fenton con formación de $OH\cdot$ tóxicos. Se ha propuesto que el compuesto 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3MST), codificado por el gen *mstA* y principal fuente endógena de H_2S , suprime el estrés oxidativo en *E. coli* al secuestrar el hierro libre que desencadena la reacción de Fenton genotóxica.¹²¹

5.6. Mecanismos de resistencia a quinolonas

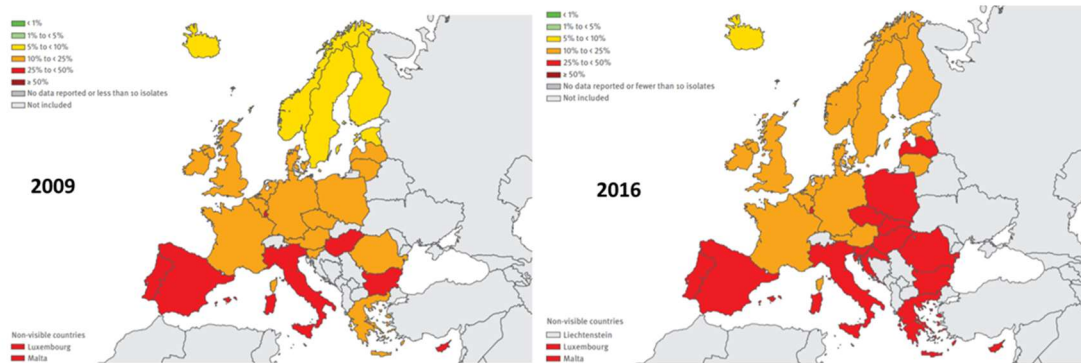
Las modificaciones estructurales del ácido nalidíxico condujeron a la mejora de las propiedades farmacocinéticas y de la actividad biológica convirtiendo a las quinolonas de segunda generación en el tratamiento de elección frente a numerosas infecciones. Sin embargo, el uso masivo de las fluoroquinolonas trajo consigo el rápido desarrollo de resistencia a las mismas. La emergencia de resistencia a quinolonas se registró inicialmente en *S. aureus*, particularmente en aislados de MRSA (*methicillin-resistant S. aureus*) y en *Pseudomonas aeruginosa*,¹²² pero pronto apareció en casi todas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.^{123,124}

En los últimos años, se ha confirmado un incremento de las tasas de resistencia a quinolonas en enterobacterias. En nuestro país, según datos de la EARS-Net,¹²⁵ la tasa

de resistencia a quinolonas ha aumentado desde que comenzaron a registrarse los primeros datos. Para *K. pneumoniae* se notificó una tasa de resistencia de 10,7%, 15,8% y 22,7% en los años 2005, 2009 y 2016, respectivamente. En el caso de *E. coli*, disponemos de datos anteriores de resistencia, siendo de un 17,3%, 28,2%, 31,5% y 32,5% para los años 2001, 2005, 2009 y 2016, respectivamente. Este incremento de resistencia no solo afecta a nuestro país, sino que se trata de una tendencia generalizada en la mayoría de los países europeos. La Figura 11 muestra la comparativa del estado de la resistencia a fluoroquinolonas en Europa en los años 2009 y 2016 de *E. coli* y *K. pneumoniae*. En los mapas se muestran los porcentajes de cepas no sensibles, incluyendo cepas con fenotipo resistente (R) y de sensibilidad intermedia (I).

A) *E. coli*

Porcentaje de resistencia (R+I)



A) *K. pneumoniae*

Porcentaje de resistencia (R+I)

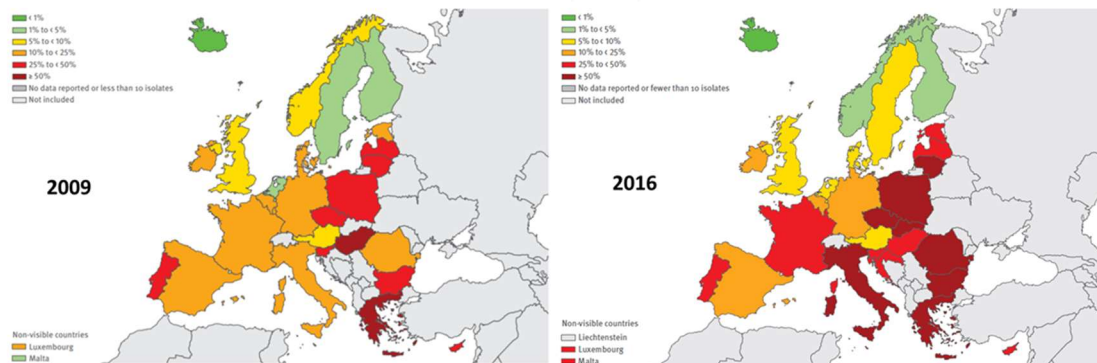


Figura 11. Mapa europeo de resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* (A) y *K. pneumoniae* (B) (fenotipos I y R) en los años 2009 y 2016. Fuente: EARS-Net.

INTRODUCCIÓN

Inicialmente se pensó que la resistencia a quinolonas tardaría en aparecer al tratarse de fármacos de origen sintético con un nuevo mecanismo de acción, sin embargo, la resistencia apareció rápidamente como muestran los datos anteriores. La adquisición de resistencia a quinolonas es un proceso secuencial, provocado por la acumulación de mutaciones cromosómicas en los genes que codifican las topoisomerasas tipo II. Aunque las mutaciones en la ADN girasa y la topoisomerasa IV, constituyen el principal mecanismo de resistencia, existen otros tanto cromosómicos como plasmídicos que se detallan a continuación (Figura 12).

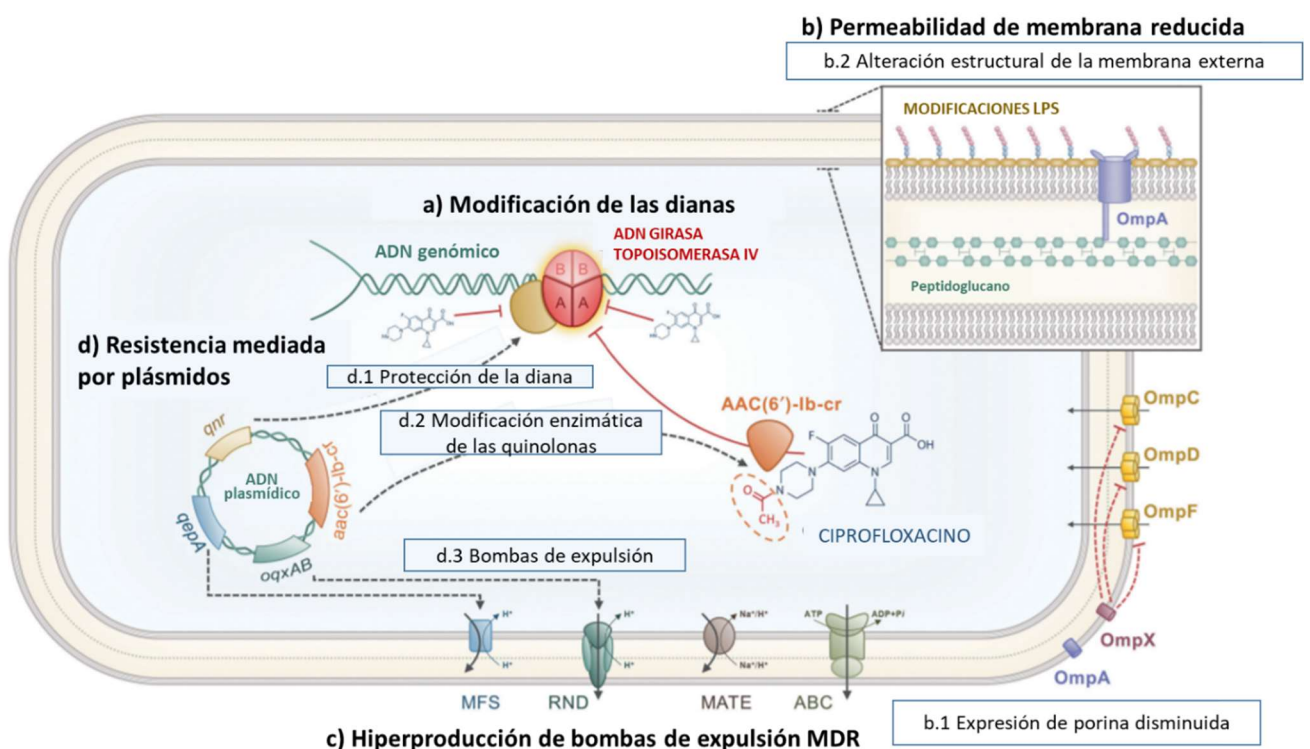


Figura 12. Mecanismos cromosómicos y plasmídicos de resistencia a quinolonas. Adaptado de Correia y cols.¹²⁶

5.6.1. Mecanismos cromosómicos

Los mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas son tres: modificaciones en los genes de las dianas (ADN girasa y topoisomerasa IV), alteraciones en las bombas de expulsión activa y cambios en la permeabilidad de la membrana debidos a mutaciones en los genes codificantes de porinas.

Modificación de las dianas

La resistencia a quinolonas se debe fundamentalmente a mutaciones en los genes codificantes de las topoisomerasas tipo II, lo que sugiere que las interacciones enzima-antimicrobiano juegan un importante papel en la estabilización de los complejos de escisión. Las mutaciones asociadas a resistencia, se localizan en su mayoría en la región amino terminal de la subunidad GyrA (entre los residuos 67 y 106 para *E. coli*) o ParC (entre los residuos 63 y 102), ambas regiones situadas cerca de los residuos de tirosina (Tyr122 para GyrA, Tyr120 para ParC) del sitio activo, las cuales están unidas transitoriamente de modo covalente a la molécula de ADN.⁹⁰ Este dominio es el QRDR de GyrA y de ParC.¹²⁷

En bacterias Gram-negativas, la resistencia a quinolonas suele estar asociada a mutaciones en el QRDR de *gyrA*, siendo las más frecuentes aquellas que afectan a las posiciones Ser83 (sustitución de Ser por Leu, aunque también por Trp, Ala o Val) y Asp87 (sustitución de Asp por Asn, aunque también por Gly, Tyr, His o Val) en *E. coli*, o a posiciones equivalentes en otros microorganismos.^{90,110,128}

En microorganismos Gram-positivos, la resistencia a quinolonas se debe inicialmente a mutaciones en *parC*, y posteriormente a mutaciones en *gyrA*.¹²⁹ Como ya se ha mencionado, existe un alto grado de conservación entre los genes de las topoisomerasas, lo que se ve reflejado en que las mutaciones asociadas a resistencia se localizan en puntos homólogos del QRDR de *gyrA* y *parC*; las posiciones 83 y 87 de GyrA equivalen a las posiciones 80 y 84 de ParC.¹³⁰

Estos aminoácidos participan en la unión de la quinolona a la enzima a través del ion Mg^{2+} y sustituciones por otros podría restringir el tipo de ion metálico unido afectando a la interacción quinolona-enzima.⁹⁰ Esto explicaría la razón por la cual las sustituciones en estas posiciones confieren mayor resistencia que otras del QRDR.^{128,131}

También se han descrito mutaciones en los genes codificantes de la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parE*), aunque su relevancia parece ser mucho menor. En el caso de *gyrB*, las sustituciones se producen principalmente en la región comprendida entre los aminoácidos 426 y 447.¹²⁸

Tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas el nivel de resistencia a quinolonas es proporcional al número de mutaciones. La alteración de la diana es un fenómeno secuencial, facilitando la presencia de una mutación la aparición de una segunda, y así sucesivamente hasta presentar 3 ó 4 mutaciones, lo que conduce a niveles de resistencia clínica. Este proceso secuencial tiene importantes consecuencias epidemiológicas, ya que existe un elevado riesgo de seleccionar microorganismos con alto nivel de resistencia durante el tratamiento con fluoroquinolonas en cepas con alguna mutación preexistente en los genes de las topoisomerasas tipo II.¹³²

Sistemas de expulsión activa

A pesar de que el mecanismo de resistencia anterior es el más relevante, un microorganismo también puede hacerse resistente al antimicrobiano por sobreexpresión de bombas de expulsión activa, transportadores localizados en la membrana que disminuyen la concentración de antibiótico en el interior de la célula, impidiendo su unión a las topoisomerasas tipo II. Estos sistemas pueden ser de codificación plasmídica o cromosómica y constituyen el principal mecanismo de disminución de la concentración del antimicrobiano en bacterias Gram-positivas.

Estas bombas de expulsión activa se clasifican en cinco familias: MFS (*Major Facilitator Superfamily*), ABC (*ATP-Binding Cassette*), RND (*Resistance/ Nodulation/ Division*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug and Toxic-compound Extrusion*).¹³³

En bacterias Gram-positivas, concretamente en *S. aureus*, la sobreexpresión de las bombas NorA, NorB y NorC, que pertenecen a la familia MFS, ha demostrado aumentar de 4-8 veces la resistencia a quinolonas.¹²⁷

En bacterias Gram-negativas, el complejo mejor estudiado ha sido la bomba AcrAB-TolC en *E. coli*, que pertenece a la superfamilia RND, cuya sobreexpresión también es capaz de conferir resistencia a quinolonas.^{127,134} Este sistema está regulado por genes como *marR*, *marA* y *soxS*. Mutaciones en el gen *acrR*, represor local de *acrAB*, incrementa la actividad de la bomba. Algo similar sucede con la inactivación de *marR*. La expresión de los genes *acrA*, *acrB* y *tolC* es activada por el producto del gen *marA*.

Este gen en condiciones normales se encuentra reprimido por MarR. Sin embargo, mutaciones en el gen *marR* ocasionan la desrepresión de *marA*, induciéndose la expresión del sistema AcrAB-TolC y disminuyendo la expresión de la porina OmpF. Esto ocasiona un aumento de la expulsión de quinolonas del interior celular, disminuyendo la concentración interna de estos antimicrobianos.¹³⁵

Alteraciones de la permeabilidad de la membrana

En bacterias Gram-negativas, el acceso de las quinolonas al interior celular sucede por difusión pasiva (quinolonas hidrofóbicas, como esparfloxacino y moxifloxacino) o a través de porinas (quinolonas hidrofílicas, como ciprofloxacino y norfloxacino). La pérdida de porinas o la expresión de porinas alteradas estructuralmente contribuyen a una disminución de la sensibilidad a quinolonas. Este mecanismo no suele tener relevancia clínica a menos que vaya asociado a otros mecanismos de resistencia, ya que no inhiben completamente la entrada de quinolonas en la célula.¹³⁶

En *E. coli*, las principales porinas están codificadas por el gen *ompF* y *ompC* y suponen la principal vía de entrada de las quinolonas hidrofílicas al interior celular. La disminución de la expresión de las porinas puede deberse a modificaciones o inactivaciones de los genes codificantes de éstas, así como en los genes reguladores, como es el caso del operón *mar* que afecta a la expresión de *ompF*, de esta forma, mutantes con una disminución en la expresión de *ompF* van a presentar un incremento en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de quinolonas de entre 2 y 4 veces.¹³⁷

5.6.2. Mecanismos plasmídicos

En 1998, se descubre en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla, el primer mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por plásmido en un aislado clínico de *K. pneumoniae* deficiente en porinas, procedente de EEUU.¹³⁸ Se observó que transconjugantes que albergaban este plásmido (pMG252) presentaban un

incremento de la CMI de quinolonas como ciprofloxacina de 4 a 32 µg/mL. Siendo este incremento en la resistencia mucho menos marcado en *E. coli* o *K. pneumoniae* con porinas intactas.¹³⁸ Estudios adicionales permitieron la identificación del gen responsable de la resistencia a quinolonas, llamado inicialmente *qnrA* (*quinolone resistance*) y renombrado posteriormente como *qnrA1*.¹³⁹ Tras este hallazgo inicial, se han descrito tres mecanismos de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos: i) protección de la diana, ii) modificación enzimática de las quinolonas y iii) sistemas de expulsión activa.

Protección de la diana: genes *qnr*

Desde el descubrimiento de los genes *qnr*, se han descrito siete familias, así como diversas variantes alélicas implicadas en la resistencia a quinolonas de origen plasmídico, existiendo actualmente: 8 *qnrA*, 92 *qnrB*, 9 *qnrS*, 1 *qnrC*, 3 *qnrD*, 9 *qnrVC* y 1 *qnrE* (revisado en Agosto de 2018 <http://www.lahey.org/qnrStudies>).

Aunque se han encontrado diversos genes tipo *qnr* tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, se desconoce el origen de la mayoría de proteínas Qnr. Parece que se generaron a partir de microorganismos acuáticos y/o ambientales. Se ha demostrado que los determinantes QnrA-like proceden de *Shewanella algae*.¹⁴⁰ Los genes *qnrS-like*, tuvieron su origen en *Vibrio splendidus*.¹⁴¹ En cuanto a los QnrB-like, se ha visto que proceden del cromosoma de especies del complejo de *Citrobacter freundii* de origen tanto clínico,¹⁴² como ambiental;¹⁴³ aunque también se ha registrado en *Stenotrophomonas maltophilia* una proteína, SmQnr, con un 88% de identidad aminoacídica con QnrB5 y QnrB19;^{144,145} así mismo se ha encontrado un 80% de identidad entre otros QnrB-like y la proteína SmaQnr cromosómica de *Serratia marcescens*. El gen *qnrVC*, ha sido frecuentemente asociado con el cromosoma de *V. cholerae* como parte de un superintegrón.¹⁴⁶ Varios estudios han demostrado que los plásmidos no conjugativos que portan el gen *qnrD* se han localizado en otras *Enterobacteriaceae*, aunque fundamentalmente en especies de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Providencia rettgeri*, pudiendo ser su origen.^{147,148} Más recientemente, se ha descrito otra familia Qnr, tras el hallazgo de *qnrE* en aislados de

K.pneumoniae. Aunque no está claro su origen, este gen ha podido ser movilizado por *ISEcp1* del cromosoma de *Enterobacter spp.*¹⁴⁹

Los genes *qnr* codifican proteínas pertenecientes a la familia de proteínas con repeticiones pentapeptídicas (PRP). Estas proteínas se caracterizan por presentar repeticiones de una secuencia de 5 aminoácidos semiconservada: [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly].¹⁵⁰

Actualmente, existe consenso a nivel mundial para la nomenclatura y definición de los genes *qnr*.¹⁵¹ Un gen *qnr* se define como un gen de origen natural que codifica una proteína de repeticiones pentapeptídicas y confiere bajo nivel de resistencia a ácido nalidíxico o a fluoroquinolonas. La expresión de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* causan incrementos de la CMI de ciprofloxacino de 8 a 32 veces en *E. coli* ATCC25922¹⁵² y de 10 veces para *qnrVC*.¹⁵³ Las familias de genes *qnr* difieren en al menos un 30% de su secuencia nucleotídica o aminoacídica. A excepción del recientemente descubierto gen *qnrE*, que es algo inferior.¹⁴⁹

La proteína de resistencia a fluoroquinolona de *Mycobacterium tuberculosis* (MfpA), fue la primera proteína perteneciente a la familia PRP en la que se determinó la estructura tridimensional. Reveló que se disponía formando una β -hélice cuadrangular y dextrógira. Esta estructura es similar en tamaño, curvatura y características electrostáticas a la forma B del ADN. De manera que MfpA se une a la ADN girasa inhibiendo su actividad.^{154,155}

Al estudiar y comparar proteínas de la familia PRP presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se observó que estaban formadas por 36 repeticiones pentapeptídicas interrumpidas por dos asas que se proyectan hacia el exterior de la proteína. Estos dos bucles están ausentes en las proteínas pentapeptídicas de *E.faecalis* (EfsQnr), y *M.tuberculosis* (MfpA).¹⁵⁶ Además, la secuencia de estos lazos se encuentra altamente conservada, sobre todo la del lazo más largo o bucle B (Figura 13). Mutaciones en el bucle B de la proteína pentapeptídica de *Aeromonas hydrophila* (AhQnr) afectan a la protección de la ADN girasa frente a quinolonas, lo que indica el posible papel de este asa para el desarrollo de la actividad de la proteína.

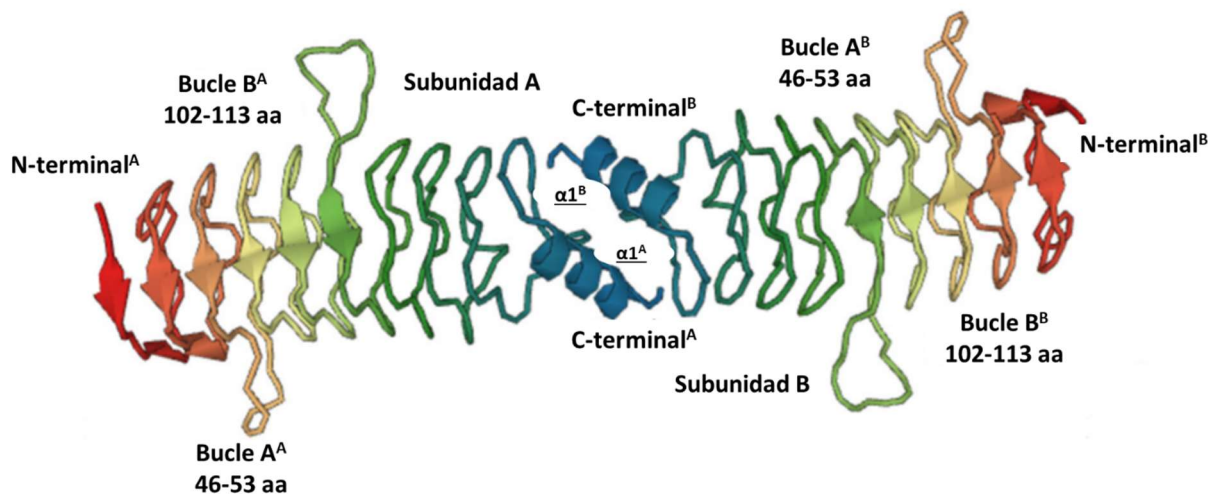


Figura 13. Estructura terciaria de QnrB1. Adaptado de Rodríguez-Martínez y cols.¹⁵²

La función fisiológica de las proteínas Qnr no se conoce actualmente. Se ha postulado que estas proteínas podrían formar parte de un sistema toxina-antitoxina; actuarían como antitoxinas protegiendo a la ADN girasa y topoisomerasa IV de alguna toxina natural aún desconocida.¹⁵⁷ Otra posible función que se le atribuye, es la de actuar como Gyrl, un regulador de la ADN girasa con efecto antiquinolona.¹⁵⁸ Por último, la presencia de secuencias de unión a LexA en las regiones promotoras de los genes *qnrB* y *qnrD*, podría indicar que estas proteínas están implicadas en la protección de las células ante daño en el ADN, causado también por antimicrobianos como las quinolonas, tras activación de la respuesta SOS.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

Las proteínas Qnr van a interactuar directamente con la ADN girasa y la topoisomerasa IV y la unión Qnr-enzima se produce antes de que la topoisomerasa se una al ADN, de forma que se reduce el efecto de las quinolonas.^{162,163}

Modificación enzimática de las quinolonas: gen *aac(6′)-Ib-cr* y CrpP

En 2006, se describió un nuevo gen responsable del aumento de la CMI de ciprofloxacino en aislados clínicos de *E. coli* en Shanghai. Se trataba de una variante de

una acetiltransferasa (AAC(6')-Ib) capaz de acetilar aminoglucósidos, confiriendo resistencia a tobramicina, amikacina y kanamicina. Esta nueva variante, denominada AAC(6')-Ib-cr es capaz de acetilar aquellas fluoroquinolonas con un nitrógeno amino localizado en el sustituyente piperacínil en posición C-7 (ciprofloxacino y norfloxacino).¹⁶⁴ La enzima AAC(6')-Ib-cr presenta dos cambios aminoacídicos con respecto a la forma clásica: Trp120Arg y Asp179Tyr, los cuales son suficientes para reducir la actividad de ciprofloxacino 4 veces.^{165,166} Este gen se ha identificado como *cassette* de resistencia en integrones de clase 1.¹⁶⁴

Recientemente, se ha descrito una enzima modificadora de ciprofloxacino, denominada CrpP, encontrada en plásmidos pUM505 de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Se trata de una proteína de 65 aminoácidos, codificada por el gen *orf131* que posee un 40% de identidad aminoacídica con la enzima aminoglucósido fosfotransferasa de *Mycobacterium smegmatis*, capaz de fosforilar aminoglucósidos e inactivarlos. La actividad de CrpP es dependiente de ATP y la fosforilación de ciprofloxacino sería previa a su degradación. Transformantes de *E. coli* que albergaban CrpP mostraron un descenso de la sensibilidad de ciprofloxacino de 7,5 veces.¹⁶⁷

Sistemas de expulsión activa: genes *qepA* y *oqxAB*

Como ya se mencionó anteriormente, las bombas de expulsión activa pueden estar codificadas por el cromosoma bacteriano o por plásmidos.

En 2007, se describió por primera vez la bomba QepA en aislados clínicos de *E. coli* de Japón y Bélgica. Esta proteína es miembro de la familia de transportadores con 14 segmentos transmembrana presentes en los microorganismos ambientales que pertenecen a la superfamilia de bombas de expulsión tipo MFS, capaz de eliminar de la célula fluoroquinolonas hidrofílicas como norfloxacino y ciprofloxacino.¹⁶⁸⁻¹⁷¹

Otro sistema de expulsión activa que confiere un descenso de la sensibilidad de las quinolonas es OqxAB. Esta bomba fue descrita por primera vez en 2004, en un aislado de *E. coli* de origen porcino.¹⁷² OqxAB pertenece a la familia RND y posee una amplia

especificidad de sustrato confiriendo resistencia a otros antimicrobianos como cloranfenicol y trimetoprima.¹⁷³ Posteriormente, se ha visto que los genes responsables de este sistema se encuentran también presentes en el cromosoma de *K. pneumoniae*.^{174,175}

La expresión de *oqxAB*, ocasiona un incremento de la CMI de las fluoroquinolonas de 16 a 128 veces,^{173,176} mientras que la presencia de QepA, induce un aumento de la CMI de ciprofloxacino de 32 veces.¹⁷⁷

5.7. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de las quinolonas

El comportamiento de los antimicrobianos y su interacción con el organismo en función de sus propiedades fisiológicas y químicas pueden abordarse mediante dos disciplinas, la farmacocinética y la farmacodinámica.

Las quinolonas presentan buena absorción a nivel del aparato digestivo anterior, con una biodisponibilidad que alcanza valores de >50%, llegando a ser aproximadamente del 100% para algunos compuestos como levofloxacino y moxifloxacino. La concentración máxima en suero se logra tras 1-3 h de administración de la dosis y aunque el grado de absorción de la quinolona no resulta alterado por factores como la ingesta de alimento o la aclorhidria, la toma de alimento puede retrasar el momento en que se alcanza la concentración máxima en suero. En cuanto a su distribución, suelen acumularse en los tejidos prostático y pulmonar, heces, bilis, y neutrófilos y macrófagos, en los cuales las concentraciones alcanzadas son superiores a la del suero. También se alcanzan concentraciones elevadas en orina y tejido renal siendo éste una de las vías de eliminación de las quinolonas.

La actividad bactericida de las quinolonas se considera dependiente de concentración, es decir, estos antimicrobianos eliminan bacterias cuando sus concentraciones están por encima del valor de la CMI del microorganismo. El parámetro que mejor define el éxito terapéutico de estos antimicrobianos es la tasa AUC (area under the curve)/ CMI. Se requiere una tasa de 30 para que el antimicrobiano ejerza su acción letal sobre *S. pneumoniae* y de >100 en el caso de patógenos Gram-negativos.

Este hecho justifica la relevancia de una concentración de antimicrobiano adecuada en el lugar de la infección para la prevención de resistencias y las consecuencias de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos.¹⁷⁸

6. Respuesta SOS

La hipótesis sobre la existencia de un mecanismo de reparación de ADN inducible (“reparación SOS”) tal y como hoy la conocemos no fue perfilada hasta la década de los 70. En este momento se describieron algunas de sus características: i) es inducida o activada tras daño en el ADN, ii) requiere la síntesis de proteínas *de novo*, iii) requiere varias funciones genéticas, de las cuáles las mejor estudiadas son las asociadas a *recA* y *lexA*, iv) los requerimientos genéticos y fisiológicos para la expresión de la reparación SOS son similares a aquellos necesarios para la inducción del profago.¹⁷⁹ Estas nociones básicas sobre la respuesta SOS, han dado pie a estudios encaminados a conocer mejor los agentes que lo estimulan, sus componentes fundamentales, la implicación de los genes que inducen así como su potencial como diana terapéutica, siendo esta respuesta extensamente desarrollada desde sus inicios hasta ahora.

6.1. Definición de la repuesta SOS y grado de conservación

La respuesta SOS, es un importante mecanismo de respuesta al estrés desencadenado por agentes internos y externos que llevan a la producción de ADN de cadena sencilla (ADNcs). Estas cantidades anormales de ADNcs constituyen una señal de alarma genotóxica que induce la activación de la respuesta SOS para reparar el daño en el ADN. Este sistema consta de dos componentes reguladores principales: LexA, un represor y RecA, un activador.¹⁸⁰

Se han descrito respuestas SOS tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, lo que sugiere la importancia de este sistema como una estrategia de supervivencia bacteriana frente al estrés.¹⁸¹ Sin embargo, a pesar de esta aparente universalidad de la respuesta SOS, se han documentado clases bacterianas y *phyla* que

INTRODUCCIÓN

carecen de secuencias homólogas *lexA*, algunos ejemplos son, la subclase *Epsilonproteobacteria*¹⁸² y el género *Streptococcus*, en particular *S. pneumoniae*.¹⁸³ La respuesta SOS se ha estudiado ampliamente en *E. coli* y es al que nos vamos a referir a partir de ahora por ser éste el microorganismo utilizado en nuestros ensayos. A continuación, se detalla el funcionamiento de la respuesta SOS.

En ausencia de daño en el ADN, LexA, reprime los genes que son inducidos por el regulón (respuesta SOS), por unión de su dominio amino-terminal a motivos palindrómicos en el operador dentro de la región del promotor de los genes SOS. Estos motivos, con secuencia consenso 5'-TACTGT(AT)₄ACAGTA-3' en *E. coli*,^{184,185} normalmente denominados cajas SOS, presentan dos tripletes muy conservados, CTG y CAG, y una región espaciadora de secuencia variable, con un espaciador invariable de 10 nucleótidos; esta secuencia consenso se localiza cerca o dentro del sitio de unión de la ARN-polimerasa. Por lo tanto, la unión del dímero de LexA a la caja SOS interfiere físicamente con la actividad de la ARN-polimerasa, teniendo como consecuencia la inhibición de la transcripción y por tanto, de la expresión de genes.¹⁸¹

En presencia de daño en el ADN, RecA es reclutado por los complejos RecBCD y RecFOR para su unión al ADNcs. RecBCD, reconoce roturas de doble hebra en el ADN (DSB, Double Strand Breaks) o extremos libres (DSE, Double Strand Ends). Sus actividades helicasa y nucleasa dan lugar a la formación de ADNcs substrato de RecA. Por otra parte, RecFOR, reconoce huecos en el ADN y recluta a RecA para su unión al ADNcs. Finalmente, RecA se une al ADNcs en forma de nucleofilamento (RecA*) y cataliza la escisión autocatalítica del represor LexA,¹⁸⁰ permitiendo la expresión de más de 40 genes^{184,186} (Figura 14). Aunque el número y el tipo de genes encontrados en el regulón varía ampliamente entre bacterias, la comparación de regulones SOS de bacterias de diferentes géneros y especies permitió la descripción de un *core* del regulón compuesto por genes muy conservados (*recA*, *uvrA*, *ruvAB* y *recN*).¹⁸¹

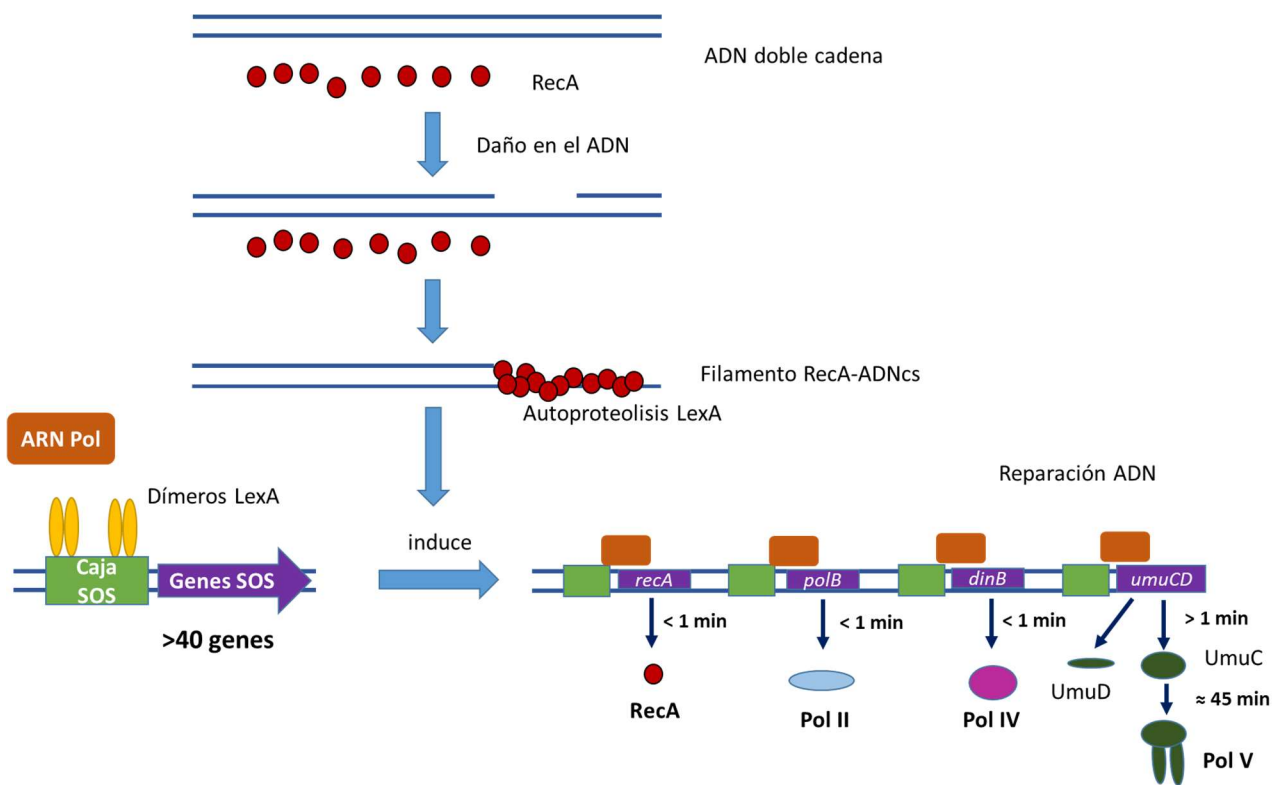


Figura 14. Proceso de inducción de la respuesta SOS. Adaptado de Goodman y cols.¹⁸⁷

6.2. Agentes inductores de la respuesta SOS

La regulación de la respuesta SOS va a depender fundamentalmente del equilibrio entre tres moléculas: RecA, LexA y ADNcs, siendo la presencia de ADNcs, el desencadenante de la puesta en marcha del regulón. Este ADNcs puede originarse por fallos que se producen en relación a los propios mecanismos vitales de la célula o por agentes genotóxicos que dañan el ADN.

6.2.1. Inducción de la respuesta SOS en ausencia de agentes genotóxicos

Durante el proceso de replicación bacteriana, es frecuente que se generen roturas espontáneas en el ADN. Diversos experimentos, en los que se mide el ADN dañado capaz de inducir la respuesta SOS en *E. coli*, utilizando citometría de flujo,

estiman que este supone en torno al 1% de una población bacteriana en crecimiento exponencial. De este ADNcs, dos terceras partes se originan por la acción de RecBCD sobre DSB, y este tipo de daño en el ADN se cree que procede en su mayoría de la rotura de la molécula tras la detención de la replicación.¹⁸⁸ Las situaciones que conllevan a la inducción de la respuesta SOS durante el proceso de replicación se exponen a continuación.

Se pueden generar DSB tras la detención de la horquilla de replicación, ocasionado principalmente cuando se producen colisiones entre los procesos de replicación-transcripción, en estos casos, aductos voluminosos pueden bloquear el complejo de la ADN polimerasa, debido a una diferencia de velocidad entre el replisoma y el complejo de transcripción o porque ambos procesos progresan en direcciones opuestas.^{189,190}

Además, estos DSB también se inducen tras la formación de estructuras ARN-ADN en bacterias que no están replicando, a lo largo del proceso de transcripción.¹⁹¹

6.2.2. Inducción de la respuesta SOS por agentes genotóxicos

Los agentes genotóxicos constituyen el clásico inductor de la respuesta SOS y se pueden clasificar de forma general en dos categorías: agentes físicos y agentes químicos. La primera categoría abarca radiaciones como los rayos gamma,¹⁹² la luz UV, ampliamente estudiada, inicialmente sirvió para poner de manifiesto la existencia de la respuesta SOS.^{193–195} Además, condiciones ambientales, como la alta presión hidrostática,¹⁹⁶ también estimulan la inducción del regulón a través de nucleasas específicas.¹⁹⁷

Con respecto a los agentes químicos, el daño oxidativo es una de las alteraciones más comunes que sufre el ADN. Las ROS son generadas por reducción del oxígeno, produciéndose, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot) por la reducción del oxígeno con uno, dos o tres electrones, respectivamente. Las ROS se producen a consecuencia del metabolismo aerobio de la bacteria¹⁹⁸ o por el tratamiento de ésta con antimicrobianos bactericidas como las quinolonas.^{118,119} La

bacteria posee diferentes mecanismos para llevar a cabo la reparación de la lesión oxidativa,¹⁹⁹ pero cuando esta falla se producen DSBs al provocar bloqueos en la horquilla de replicación²⁰⁰ que inducen la respuesta SOS.

Ciertos antimicrobianos pueden ocasionar estrés bacteriano en un amplio rango de concentraciones y son capaces de inducir la respuesta SOS a través del daño en el ADN o por detención de la replicación. En el caso de las fluoroquinolonas, esta familia de antibióticos causa detención de la replicación por bloqueo de las topoisomerasas tipo II que conlleva a la formación de DSBs.¹⁰⁹ Trimetoprima, afecta a la síntesis del tetrahidrofolato, con alteración de la producción de purinas y pirimidinas y aunque no genera lesiones directamente en el ADN, altera su replicación.²⁰¹ Por último, en betalactámicos, la inducción de la respuesta SOS, esta mediada por el sistema de dos componentes DpiAB, que se induce por daño en la pared celular.²⁰² Estos son solo ejemplos de cómo algunos agentes antimicrobianos son inductores de la respuesta SOS en *E. coli*.

Sin embargo, la inducción de SOS no es igual para todos los microorganismos ni para todos los antimicrobianos. Se ha demostrado que antimicrobianos de diferentes familias como cloranfenicol, tetraciclina y aminoglucósidos inducen la respuesta SOS en *Vibrio cholerae*.²⁰³ Y que ésta última clase de antibióticos induce SOS en otras bacterias Gram-negativas como *K. pneumoniae* y *Photobacterium luminescens*.⁷⁵ Ninguno de ellos tiene efecto sobre el regulón de *E. coli*.

6.3. Reguladores de la respuesta SOS: RecA y LexA

La respuesta SOS está inducida por la presencia de ADNcs, pero los componentes reguladores clave son el activador RecA, capaz de unir el ADN dañado y el represor LexA que en ausencia de daño se encuentra impidiendo la expresión de los genes del regulón. Se estima que una célula de *E. coli* no inducida contiene alrededor de 7.200 moléculas de RecA y 1.300 moléculas de LexA, con un 20% de LexA libre, no unido a ADN y en estado dimérico predominantemente.²⁰⁴

6.3.1. RecA

Es una proteína altamente conservada de ≈ 38 kDa que desempeña un papel crítico en la recombinación homóloga y en la degradación de LexA.²⁰⁵ Estructuralmente, RecA monomérica, contiene tres dominios: un *core* central para el plegamiento de RecA, que es flanqueado por dos subdominios reguladores en los extremos amino y carboxi²⁰⁶ (Figura 15A). Estos monómeros, pueden formar enormes nucleofilamentos de proteína por oligomerización cooperativa, mediada por el *core* de plegamiento de RecA, formando una estructura helicoidal dextrógira que se extiende sobre el ADNcs.²⁰⁷ El *core* de RecA, une ATP entre monómeros,²⁰⁶ necesario para la polimerización de las subunidades y para las reacciones de intercambio de ADNcs e hidroliza ATP para la despolimerización del filamento.²⁰⁵

El filamento de RecA también actúa como una co-proteasa para estimular la escisión autocatalítica de LexA y de UmuD en *E. coli*²⁰⁸ y del represor del fago lambda, estimulando la entrada del profago en el ciclo lítico.²⁰⁹

6.3.2. LexA

Molécula de ≈ 22 kDa que contiene dos dominios separados por un conector flexible. Es un homodímero en solución, se une al ADN mediante un motivo hélice-vuelta-hélice en el extremo amino-terminal. El extremo carboxi-terminal es responsable de la dimerización de LexA y también alberga la actividad serín-proteasa (diada catalítica: Ser119-Lys156) que cataliza la escisión del péptido entre Ala84 y Gly85 localizados en un *loop* en la región flexible del conector, determinando el estado escindible o no escindible de LexA, en función de si el *loop* está adyacente a la diada catalítica o no^{204,210,211} (Figura 15B). La actividad escindible es estimulada por RecA* y su unión a LexA constituye un paso clave. Se ha propuesto que el represor se une por su región carboxi-terminal en la hendidura formada por el filamento nucleoproteico (RecA*), por interacción con los residuos aminoacídicos, Gly22 y Gly108, mientras que su región amino-terminal interacciona con la región del *core* de RecA*.²¹²

La actividad autocatalítica de LexA comienza tras la disociación del operador y lleva a la degradación total de LexA, así como RecA* también necesita que LexA no se encuentre unido al operador para interactuar con él.²¹³

Se han caracterizado variantes de LexA no proteolizables *in vivo*, incapaces de activar la respuesta SOS. Estas mutaciones fueron localizadas en la región flexible del conector y en el extremo-carboxi, ambas implicadas en las reacciones de escisión. Además, estas mutaciones fueron agrupadas en tres regiones: i) alrededor del sitio de escisión (Ala84-Gly85), incluye residuos en las posiciones 80-85; ii) alrededor del residuo de Ser-119, incluye aminoácidos en posiciones 114-120; iii) en torno al residuo de Lys156, incluye Thr154 y Lys156. A pesar de la diversidad de posiciones afectadas, existen tres variantes clásicas descritas: LexA1 (G80D), LexA2 (T154I) y LexA3 (G85D) que aumentan notablemente la sensibilidad de la célula al ADN dañado. LexA1 fue la variante elegida para la construcción de cepas isogénicas con el sistema SOS hipoactivado.²¹⁴

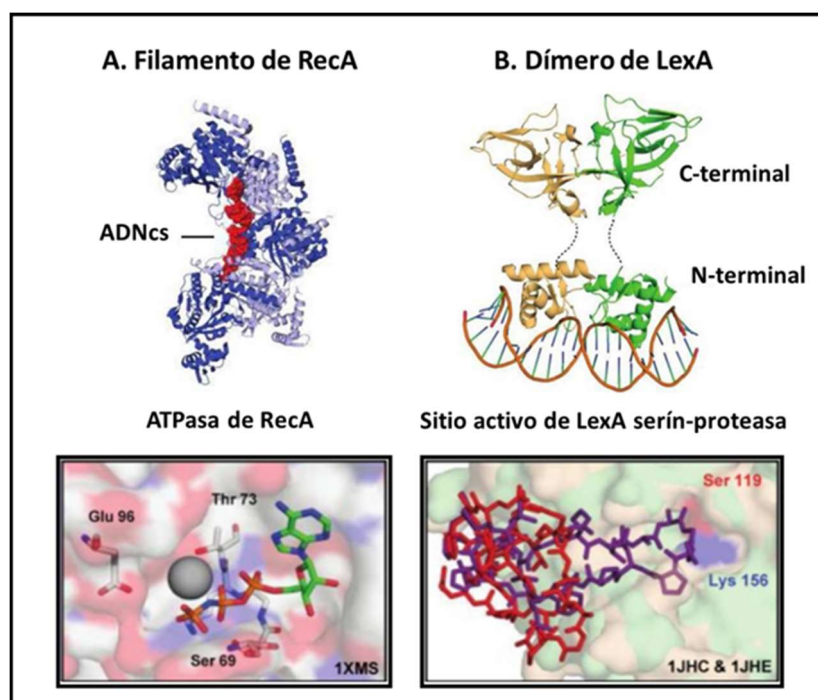


Figura 15. Dianas de la respuesta SOS. (A) Estructura de RecA, mostrado como un filamento, con monómeros alternados en color azul oscuro y claro. El ADNcs es mostrado como esferas de color rojo. El recuadro de debajo muestra el sitio de unión del ATP. (B) Estructura de LexA dimérico, unido al ADN de la caja SOS, con monómeros individuales coloreados en verde y amarillo. El

dominio C-terminal está unido al dominio N-terminal por un conector. En el mecanismo de escisión autocatalítica, LexA experimenta un enorme cambio conformacional en su dominio C-terminal entre los estados inactivo (barras rojas) y activo (barras moradas). El recuadro de debajo muestra el solapamiento de las conformaciones activas e inactivas. Adaptado de Culyba y cols.⁷¹

6.4. Regulación de la respuesta SOS

6.4.1. Regulación transcripcional

En presencia de daño en el ADN, RecA*, inducirá la escisión autocatalítica de LexA que se encuentra unido a la secuencia denominada caja SOS de la región operadora de los genes del regulón. La caja SOS, está formada por la secuencia consenso 5'-TACTGT(AT)₄ACAGTA-3' en *E. coli*.^{184,215} El grado de expresión y el tipo de genes que se expresan van a depender de factores como: la cantidad de ADN dañado;²¹⁶ la composición de la caja SOS, variaciones en su secuencia van a determinar la afinidad de unión de LexA y una desrepresión génica diferencial. A modo de ejemplo, la unión débil de LexA al operador de *recA*, hace que la proteína RecA sea inducida “inmediatamente”, en menos de un minuto²¹⁷ y por el contrario, genes con una proteína LexA fuertemente unida a su operador, tengan una expresión más tardía en la respuesta, como es el caso de *umuC* y *umuD*, que actúan en la mutagénesis de SOS, y se activan al cabo de unos 30 minutos.²¹⁸ Por último, otro factor implicado en la transcripción va a ser el número de cajas SOS presente en los promotores de los genes, así el gen *recN* tiene tres regiones de unión a LexA.²¹⁹ La proteína RecN pertenece a la familia SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) y es reclutada por RecA hacia DSB tras el tratamiento con mitomicina.²²⁰

Recientemente, se ha demostrado que DnaA, proteína iniciadora de la replicación del cromosoma, desempeña además, junto con LexA un papel clave en la represión de la transcripción del gen *uvrB*, implicado en la reparación por escisión de nucleótidos, y otros genes del regulón SOS como *recN* y *dinJ*; actuando como modulador para el

manteniendo de la integridad del genoma durante la respuesta SOS y limitando la expresión de los genes del regulón.²²¹

6.4.2. Regulación post-transcripcional

Los principales factores reguladores a este nivel son los componentes iniciadores de la respuesta: RecA y LexA. Aunque existen otros.

Una vez que las lesiones han sido reparadas, RecA deja de ser activado por ADNcs. Sin embargo, la expresión de los genes *recA* y *lexA* continúa como consecuencia de la activación de la respuesta SOS,²⁰⁰ lo que lleva a la producción de altos niveles de LexA no escindido y de RecA no activado, cuya acumulación conduce a la represión del sistema.¹⁸¹ Al cese de la respuesta contribuye también que *lexA*, es un gen de expresión tardía y puede parar la inducción de la respuesta SOS cuando la señal genotóxica desaparece y la escisión de LexA no es favorecida.¹⁸⁰

También, existen otras proteínas que intervienen en la regulación de la respuesta SOS por interacción con el nucleofilamento de RecA. Se trata de las proteínas RecX y DinI, ambas están bajo el control de la respuesta SOS y regulan la estabilidad del filamento de RecA de forma opuesta. RecX se une a RecA, promoviendo la desestabilización del nucleofilamento de RecA-ADNcs y es capaz de inhibir sus actividades recombinasa y co-proteasa.^{222,223} Por otro lado, está DinI, que se une a RecA estabilizando el nucleofilamento, manteniendo oculto el ADNcs,²²⁴ fuerte inductor de la respuesta SOS. DinI también inhibe la actividad co-proteasa de RecA.²²⁵ Esta actividad inhibida por ambas proteínas es importante, como ya hemos comentado permite la desrepresión por parte de LexA de los genes SOS permitiendo la reparación del ADN. Además, esta actividad co-proteasa también juega un papel esencial en la activación de la polimerasa V de la síntesis por translesión, cuya inhibición daría tiempo a la bacteria para reparar el ADN dañado de manera no mutagénica.²²⁶

Otra proteína con efecto inhibitorio de la respuesta SOS es PsiB (*Protein for SOS inhibition*). El gen *psiB* es portado por algunos plásmidos con un rango de hospedador estrecho, de manera que una forma de impedir que la célula altere su genoma,

impidiendo la replicación del plásmido, es inhibiendo la respuesta SOS.^{227,228} Por otro lado, RdgC (*Recombination-dependent growth*), es una proteína de unión al ADNcs y ADN de cadena doble (ADNcd), previene la función de RecA compitiendo por los sitios de unión al ADN y se ha demostrado que *in vitro* inhibe la escisión de LexA.²²⁹

6.5. Funciones del regulón SOS

En muchas especies bacterianas, como hemos visto anteriormente, el ADN dañado estimula la respuesta SOS; un mecanismo que regula la expresión de los genes implicados en los procesos de reparación del ADN y de tolerancia al daño y favorece el intercambio genético.

Los primeros genes en ser expresados son los relacionados con los mecanismos de reparación del ADN de forma no mutagénica, como son la recombinación homóloga y el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*); no obstante, si el daño persistiera comenzarán a expresarse aquellos genes implicados en mecanismos mutagénicos, como son las polimerasas de baja fidelidad de la síntesis por translesión (TLS, *Translesion Synthesis*). Así mismo, la respuesta SOS está relacionada con la expresión de genes con funciones diversas encaminadas a la adaptación al estrés y supervivencia que vamos a analizar a continuación.

6.5.1. Recombinación homóloga

La recombinación homóloga tiene un papel clave tanto en la generación de diversidad genética^{230,231} como en la reparación de ADN dañado, ayudando a mantener la integridad cromosómica. Se han descrito al menos 25 proteínas diferentes en *E. coli* involucradas en este proceso²³² y muchas de estas proteínas presentan homólogos funcionales en todas las formas de vida,²³³ confirmando la importancia del proceso. El paso clave en la recombinación es el intercambio de hebras entre dos secuencias de ADN homólogas llevado a cabo por la familia de ATPasas de RecA, proteína altamente conservada de bacterias a humanos.²³⁴

El proceso de recombinación comienza cuando se elevan las cantidades de ADN dañado. RecA polimeriza sobre ADNcs formando el nucleofilamento proteico RecA-ADNcs que constituye la forma activa de RecA (Figura 16A, paso 1). A continuación, este nucleofilamento invade ADNcd formando un heterodúplex y se produce la migración a lo largo de éste hasta encontrar una secuencia con una homología lo suficientemente grande para que se pueda dar el intercambio entre ambas hebras (Figura 16A, paso 2-3). Finalmente y con ayuda de proteínas accesorias, como las enzimas RuvABC, se resuelve el intermediario de Holliday formado y por acción de ligasas se unen los fragmentos de la nueva molécula de ADN (Figura 16A, paso 4). Sin embargo, para que se dé el proceso de recombinación es necesario el procesamiento del ADN dañado para formar ADNcs sobre el que actuará RecA, en función de si se trata de DSB o *gaps* (ADNcs) será necesario la actuación de complejos enzimáticos adicionales RecBCD o RecFOR, respectivamente.¹⁸⁰

Ruta RecBCD

Este complejo enzimático es esencial para el 99% de los eventos de recombinación que se originan para reparar DSBs en una cepa de *E. coli* con fenotipo salvaje²³² (Figura 16B). RecBCD para ejercer su acción se une con alta afinidad a un extremo como en el ADNcd, gracias a su actividad helicasa bipolar, localizada en los componentes RecB y RecD con direcciones de acción opuestas $3' \rightarrow 5'$ y $5' \rightarrow 3'$, respectivamente,^{235,236} el complejo enzimático va a ir separando ambas hebras a la vez que se desplaza por la molécula hasta encontrar una secuencia específica, 5'-GCTGGTGG-3' denominada χ (*chi*, *crossover hotspot instigator*),^{237,238} reconocida por el componente RecC.^{239,240} En el proceso de separación de hebras, el dominio nucleasa de RecB se va a encargar de degradar preferentemente el extremo 3' de ADNcs hasta alcanzar la secuencia χ , momento en el que la nucleasa cambia su actividad para actuar exclusivamente en el extremo 5', protegiendo de esta manera el extremo 3' para la unión de RecA pero manteniendo su actividad helicasa.^{241,242} Tras la interacción con χ , se produce otro acontecimiento importante, RecBCD excluye las proteínas de unión a

INTRODUCCIÓN

cadena sencilla (SSB, *ssDNA-binding protein*) lo que posibilita la “carga” de RecA sobre ADNcs^{243,244} y que se inicie el proceso de recombinación.

Ruta RecFOR

Esta ruta no está tan bien caracterizada como la anterior. Sin embargo, resulta esencial para reparar roturas de cadena sencilla o *gaps* (Figura 16C). Los primeros componentes en actuar son RecQ, que inicia la separación de las hebras en dirección 3'→5' gracias a su actividad helicasa y RecJ, que degrada la hebra separada mediante su actividad exonucleasa 5'→3', dejando un extremo protuberante 3' de ADNcs.²⁴⁵ A continuación, las proteínas SSB se unirán a ese ADNcs impidiendo la formación del filamento de RecA.^{246,247} Este problema es superado por la acción de las proteínas mediadoras de la recombinación que en *E. coli* son RecF, RecO y RecR²⁴⁶ y forman dos subcomplejos funcionales: RecOR y RecFOR. RecOR une SSB, desestabilizando la unión SSB-ADNcs y RecFOR reconoce el extremo 5' de unión entre ADNcs-ADNcd y recluta RecA para inducir la nucleación y formación del filamento.²⁴⁸ A continuación se produce el intercambio entre hebras homólogas como se ha comentado anteriormente.

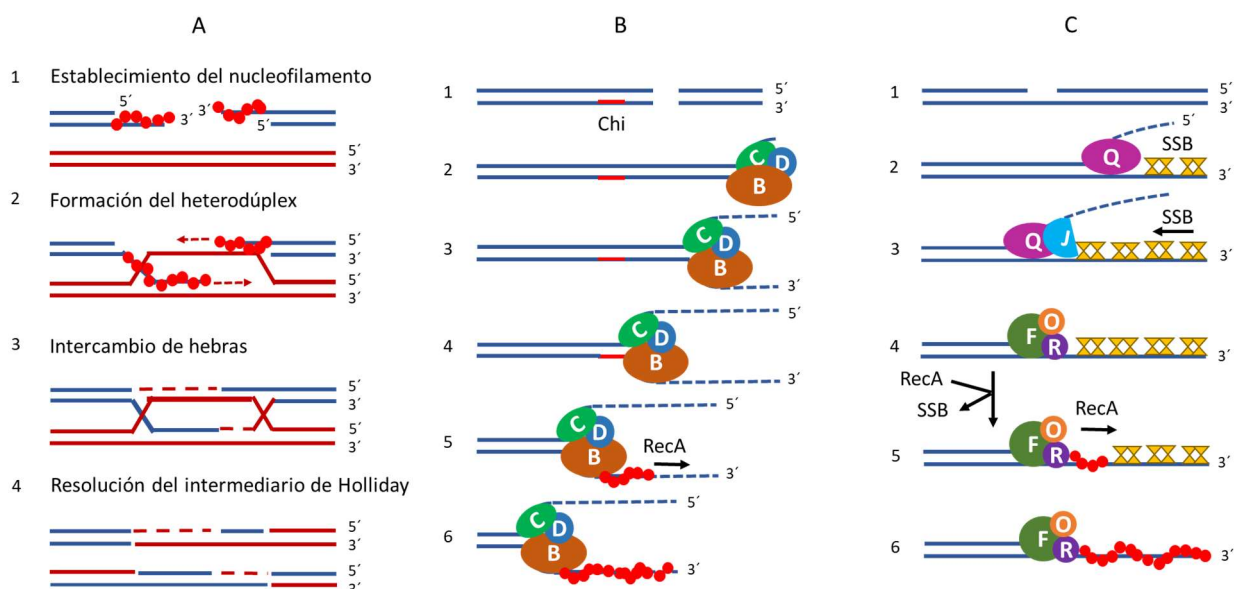


Figura 16. (A) Proceso de recombinación homóloga. (B) Procesamiento de roturas de doble hebra llevado a cabo por el complejo RecBCD. (C) Procesamiento de roturas de cadena sencilla dirigido por el complejo RecFOR.

6.5.2. Reparación por escisión de nucleótidos

Se trata de un proceso altamente conservado en procariotas y eucariotas que sucede en varios pasos: detección y verificación del daño, incisión, escisión y ligación del ADN formado (Figura 17). El grupo de enzimas que lleva a cabo la mayoría de los pasos es UvrABCD.

El primer componente en actuar en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) es UvrA. Se trata de una enzima que ejerce su acción en forma dimerica y pertenece a la superfamilia de ATPasas ABC (*ATP-binding cassette*). Necesita varios iones Zn^{2+} , cuya función es la de mantener la estructura de la enzima y garantizar la especificidad del reconocimiento del ADN dañado. A pesar de que no está claro la zona de unión de UvrA al ADN, estudios realizados en *Thermotoga maritima* demuestran que se une por la hendidura formada tras la dimerización de UvrA, concretamente a una región de 4 nucleótidos consecutivos en los extremos del fragmento de ADNcd.²⁴⁹ La acción de UvrA es esencial para el reconocimiento del daño, pero al no interactuar directamente con él, es necesario la aparición de UvrB que se encarga de la verificación del mismo. UvrB es un componente esencial en el mecanismo NER, porque no solo va a interactuar con UvrA, sino que también lo va a hacer con UvrC, UvrD y ADN pol I.²⁵⁰ Se trata de una enzima con actividad helicasa y ATPasa,²⁵¹ con varios dominios, y varios estudios han atribuido su implicación como verificadora del daño a residuos ubicados en una estructura, una horquilla- β , localizada en uno de los dominios²⁵²⁻²⁵⁵ la cual va a ser insertada en la doble hélice. A continuación, UvrA y el ADN dañado van a estimular la actividad ATPasa de UvrB, que se encarga de acoplar el movimiento de su dominio helicasa hacia la unión eficiente del ADN dañado y va a permitir la unión de UvrC.²⁵⁶ La unión de UvrB en la zona de la lesión facilita la disociación del componente UvrA. Por su parte, UvrC es una nucleasa dual que va a realizar un corte a ambos lados de la lesión. Con su dominio amino-terminal corta la hebra dañada en 3' y con su dominio carboxi-terminal lo hace en 5'.^{257,258} Finalmente, se une UvrD, su actividad helicasa en dirección 3' \rightarrow 5' dependiente de ATP,²⁵⁹ va a permitir la separación del fragmento que contiene la lesión. El reemplazamiento y sellado de la hebra eliminada es llevado a cabo por la acción secuencial de la ADN polimerasa I y una enzima ligasa, respectivamente.²⁶⁰

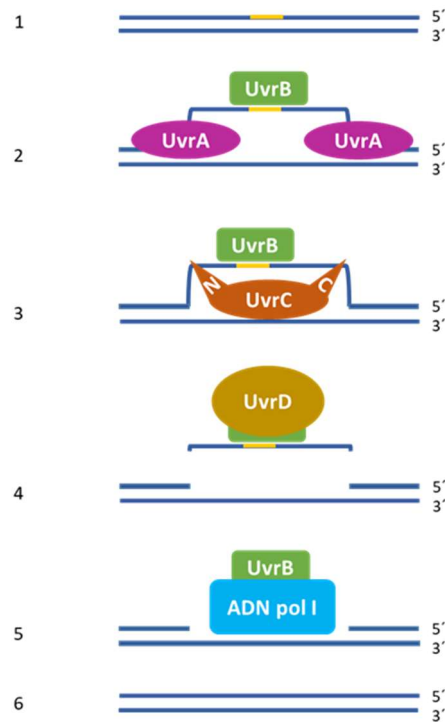


Figura 17. Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos

6.5.3. Síntesis por translesión

Este mecanismo de reparación se inicia cuando los anteriores, libre de errores, fracasan en la reparación del ADN dañado. Las polimerasas que participan en la síntesis por translesión (TLS) son de inducción tardía y suponen el último recurso de la célula por preservar la integridad de su genoma y sobrevivir.^{261,262}

Las polimerasas (Pol) implicadas en esta vía son PolIII, codificada por el gen *polB*, Pol IV (*dinB*) y Pol V (*umuC* y *umuD*), se trata de enzimas altamente especializadas en esquivar la lesión, debido a la presencia de una estructura menos restrictiva en el sitio de unión a la hebra de ADN que la que posee la polimerasa primaria (Pol III).²⁶³ Por contra, esto hace que tengan una menor capacidad para diferenciar entre nucleótidos correctos e incorrectos pudiendo llevar a la incorporación de nucleótidos inadecuados, tras la adición de bases al azar. Además, este hecho unido a la ausencia de una actividad

correctora de errores 3' → 5' en todas ellas, a excepción de la Pol II, en la que se registra cierta actividad exonucleasa, las convierten en polimerasas altamente mutagénicas.²⁶³

Similar a lo que sucede con LexA, la síntesis de la PolV activa, también requiere la actividad co-proteasa de RecA. La proteína UmuD, tras ser inducida de forma tardía, es inactiva para llevar a cabo sus funciones mutagénicas. Esta proteína es activada tras la escisión autocatalítica mediada por RecA de una región de 24 aminoácidos en su región amino-terminal.²⁶⁴ Sin embargo, la escisión de UmuD es mucho menos eficiente que la escisión de LexA²⁶⁵ y como consecuencia, UmuD' no se acumula en la célula hasta pasados 45 minutos de la exposición a la radiación UV.²¹⁸ Presumiblemente, la escisión de la cola en la región amino-terminal en UmuD, inducirá un cambio conformacional en la estructura de la proteína que posibilitará a UmuD' dimérica formar un complejo con UmuC.^{266,267} No obstante, RecA* necesita activar directamente la polimerasa UmuD'₂C transfiriendo una molécula de RecA y ATP para formar la PolV mutasoma (UmuD'₂C-RecA-ATP), la forma activa de PolV.²⁰⁸ El monómero de RecA-ATP debe ser transferido desde el extremo 3' de RecA* hacia UmuD'₂C para formar una PolV mut con actividad polimerasa, aunque una vez formada, no es necesaria la presencia del nucleofilamento de RecA para continuar su actividad²⁶⁸ (Figura 18). Los niveles intracelulares de esta enzima están estrictamente regulados para mantener al mínimo su actividad mutagénica y sea utilizada bajo circunstancias concretas. Se estima que en una célula con ADN dañado, en el momento de máxima actividad haya unas 60 moléculas de UmuD'₂C (PolV) mutagénicamente activas frente a unas 70.000 moléculas de RecA.²¹⁸

A pesar de las lagunas que existen en relación a la síntesis por TLS, se ha visto que no participan de la misma forma ante una determinada lesión. En *E. coli*, por ejemplo, el daño en el ADN causado por la exposición a la radiación UV es esquivado por la PolV,^{217,269} se considera responsable de la mayoría de los eventos de mutagénesis inducidos por radiación UV.^{266,270} Por su parte, PolIII, desempeña un papel clave en el comienzo de nuevo de la replicación en células sometidas al mismo daño.^{261,271,272}

INTRODUCCIÓN

Otro aspecto importante de las polimerasas TLS, es su capacidad para intervenir en procesos no asociados al replisoma, sobre todo la Pol IV y PolV. Estas actividades podrían incluir TLS post-replicativa, incorporación de dNTPs oxidados, rescate de complejos ARN polimerasa detenidos o la participación en el mecanismo NER o en la recombinación homóloga.²⁷³

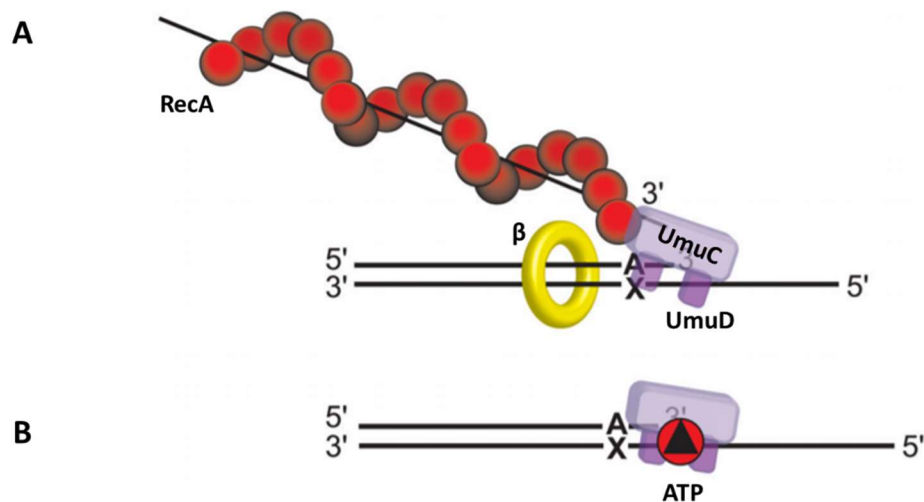


Figura 18. Pasos para la formación de la PolIV mut. A. Transferencia del monómero de RecA-ATP desde RecA* en posición *trans*. B. PolIV mut activada. Adaptado de Patel y cols.²¹⁷

6.5.4. Otras funciones

Además de las funciones de reparación del ADN mencionadas, la respuesta SOS está implicada en otros procesos relacionados con la plasticidad del genoma y su adaptación al estrés.

En *E. coli*, la activación de la respuesta SOS tiene un papel relevante en la filamentación celular, debido a la expresión del gen *sulA* que inhibe la septación celular al interactuar con FtsZ.¹¹² Esto permite a la bacteria “ganar tiempo” para reparar el ADN dañado antes de que se produzca la división celular.

Otra de las funciones atribuidas a la respuesta SOS es su implicación en el proceso de persistencia. La formación de células persistentes puede ocurrir tras el desequilibrio en la síntesis de los componentes de los sistemas toxina-antitoxina,

cuando se induce una sobreproducción de toxina. En *E. coli*, el sistema *tisB/istR*, es activado por la respuesta SOS. TisB produce un descenso en la tasa de crecimiento celular, por depleción del ATP en la célula, causando tolerancia a fluoroquinolonas y a múltiples antibióticos cuando se sobreexpresa.²⁷⁴ Recientemente, se ha demostrado la implicación de la respuesta SOS en el descenso de la persistencia en *E. coli*, mediado por el regulador negativo AMPcíclico.²⁷⁵

La respuesta SOS también puede regular directamente factores de virulencia, y tenemos varios ejemplos de ello. Se ha visto que LexA regula la expresión de los genes CTX del profago de *Vibrio cholerae*, llevando a la producción de la toxina del cólera.^{276,277} Además, bajo concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, es capaz de estimular la producción de la toxina Shiga en cepas patogénicas de *E. coli*,²⁷⁸ o de inducir la diseminación horizontal de factores de virulencia presentes en las islas de patogenicidad de cepas de *S. aureus*.^{279,280} Por último, se ha asociado la inducción de la respuesta SOS con la producción de *biofilm*^{281–283} y desarrollo de motilidad^{282,284} en numerosas especies bacterianas, así como su implicación en la regulación de las integrasas de integrones, permitiendo el desplazamiento de *cassettes* de resistencia en el genoma bacteriano. Con esto se pone de manifiesto que la respuesta SOS desempeña un papel clave en la variabilidad genética y resistencia antimicrobiana.^{285,286}

7. Estrategias para inhibir la respuesta SOS

La respuesta SOS se ha convertido en una potencial diana terapéutica al menos por dos motivos. Por un lado, se trata de un mecanismo altamente conservado en la mayoría de grupos filogenéticos bacterianos, vislumbrándose como un fármaco de amplio espectro. Por otro, su implicación en una gran diversidad de funciones que van más allá del desarrollo de resistencia asociada a la mutagénesis inducida por antimicrobianos, promoviendo también procesos de recombinación y de transferencia génica horizontal, así como la expresión de genes de virulencia que confieren características ventajosas y permiten la supervivencia bacteriana. Con el objetivo de demostrar la potencialidad de la respuesta SOS en combinación con antimicrobianos y

los efectos de su inhibición en términos de sensibilidad y restricción de la resistencia se han llevado a cabo numerosos ensayos actuando sobre los componentes reguladores clave, RecA y LexA.

7.1. Evidencia genética

Un estudio reciente analiza en detalle la respuesta SOS como posible diana terapéutica, actuando sobre ambos reguladores clave y en presencia de distintos antimicrobianos.²⁸⁷ Con este objetivo, construyen mutantes de *E. coli* con mutaciones en los genes *recA* y *lexA*, cubriendo el espectro completo de posibles niveles de actividad de la respuesta SOS. Los mutantes son clasificados en: mutantes que inactivan constitutivamente la respuesta SOS (*S119A* en LexA y Δ *recA* en RecA), mutantes que activan constitutivamente la respuesta SOS (Δ LexA o Δ *lexA* en LexA y *recA730* en RecA) y aquellos mutantes que modulan la respuesta SOS por hiperactivación o hipoactivación (*E86P* o *G80A*, respectivamente y sobre LexA). A continuación, analizaron diferentes clases de agentes antimicrobianos comparando las CMI y las tasas de mutación inducida para cada combinación cepa-antimicrobiano.

En términos de sensibilidad, los cambios significativos en la CMI se limitaron a aquellos antibióticos que dañaban el ADN incluyendo fluoroquinolonas, y en cepas que tenían la respuesta SOS reprimida constitutivamente se registró un mayor descenso de CMI, en concordancia con otros estudios.^{76,213} En relación a la mutagénesis atribuida a la respuesta SOS, las tasas de mutación inducida por antibióticos fueron suprimidas cuando la actividad SOS se redujo, y esta tendencia fue observada en una amplia variedad de antibióticos, también demostrado en estudios previos.²⁸⁸⁻²⁹² Otro hallazgo interesante del estudio, fue la fuerte correlación entre tasa de mutación y dosis de fluoroquinolona utilizada, que probablemente se corresponda a la activación del regulón SOS en distinto grado, previamente demostrado.²⁹³ Finalmente, la alteración de LexA o RecA mostraron ser estrategias igualmente viables para modular la respuesta SOS.

Teniendo en cuenta estos resultados, parece que la estrategia más adecuada sería la de inhibir la respuesta SOS en combinación con un antibiótico que provoque daño en el ADN para de esta forma disminuir la CMI y la resistencia antibiótica adquirida.

7.2. Evidencia farmacológica

Tras demostrar mediante una aproximación genética el potencial de la respuesta SOS como diana terapéutica en combinación con antimicrobianos. El paso siguiente sería la búsqueda de moléculas que fueran capaces de reproducir esos efectos.

En este sentido encontramos diversas estrategias y evidencia experimental que apuntan a la actuación sobre el componente LexA, utilizando bacteriófagos que suprimen la respuesta SOS por hiperproducción de un represor LexA no proteolizable reforzando la actividad de quinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos en *E. coli*.²⁹⁴ Otro estudio reciente también ha apostado por la búsqueda de inhibidores de la autoproteólisis de LexA,²⁹⁵ apoyado en la idea de que no existen homólogos de LexA en eucariotas, al contrario de lo que sucede con RecA²⁹⁶ y por tanto sería mejor diana.

Sin embargo, son más numerosos los estudios que apuestan por la actuación a nivel del activador RecA, por su papel adicional en el proceso de recombinación homóloga que favorece el intercambio genético. Se han identificado moléculas represoras de la expresión de este componente, como las aminocoumarinas, inhibidoras de la ADN girasa que previenen la inducción de la respuesta SOS y disminuyen la frecuencia de mutación y la recombinación incluso en presencia de fluoroquinolonas, en *S. aureus*.²⁹⁷ En esta línea, también se ha propuesto la utilización de pequeñas moléculas artificiales de ARN que son complementarias al ARNm de *recA* con el mismo fin.²⁹⁸ Otros inhibidores de RecA recientemente descritos son los compuestos basados en la ftalocianina tetrasulfonato (PcTs). Se trata de moléculas aniónicas, que aprovechan la característica catiónica del sitio de RecA de unión al ADN para competir con el ADN por su unión a RecA. Estos compuestos pueden funcionar como adyuvante con un amplio rango de antibióticos bactericidas como ciprofloxacino, potenciando su actividad y prolongando su esperanza de vida al reducir la adquisición de mutaciones de resistencia

INTRODUCCIÓN

de novo o la transferencia de genes de resistencia antibiótica entre especies bacterianas. Se ha demostrado su efecto tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas.²⁹⁹

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Justificación del estudio e hipótesis de trabajo

El incremento de infecciones causadas por enterobacterias multirresistentes, y su expansión a nivel mundial, ha evidenciado la necesidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas que permitan prolongar la vida de los antimicrobianos actuales. Se ha demostrado que concentraciones tanto subinhibitorias como suprainhibitorias de antimicrobianos bactericidas como las fluoroquinolonas inducen la respuesta SOS, la cual está implicada en procesos de transferencia génica horizontal y fenómenos de mutagénesis que promueven la adaptación de la bacteria al daño y conduce finalmente al desarrollo de resistencia a los antimicrobianos.

En esta Tesis Doctoral se propone evaluar la supresión de la respuesta SOS en combinación con fluoroquinolonas con una doble finalidad: (i) resensibilización de bacterias resistentes y (ii) bloqueo del desarrollo de resistencias de relevancia clínica.

Las hipótesis de este estudio son las siguientes:

1. La supresión de la respuesta SOS (mediada por delección de *recA* o presencia de LexA1) origina un incremento de sensibilidad a fluoroquinolonas en cepas con fenotipo sensible, sensibilidad intermedia y resistente.
2. La supresión de la respuesta SOS (mediada por delección de *recA* o presencia de LexA1) bloquea el desarrollo de resistencias a fluoroquinolonas en cepas con fenotipo sensible, sensibilidad intermedia y resistente.
3. La supresión de la respuesta SOS es capaz de modificar parámetros biológicos relevantes como el *fitness* bacteriano y la producción de *biofilm* en cepas con fenotipo sensible, sensibilidad intermedia y resistente a fluoroquinolonas.

4. La alteración de la respuesta SOS mejora la eficacia bactericida de las fluoroquinolonas en un modelo *in vivo*.

2. Objetivos del estudio

1. Analizar si la supresión de la respuesta SOS origina un incremento de sensibilidad a fluoroquinolonas en cepas con distintos fenotipos de sensibilidad/resistencia.
2. Evaluar si la supresión de la respuesta SOS restringe la aparición de mutantes resistentes en cepas con distintos fenotipos de sensibilidad/resistencia.
3. Determinar la implicación de la respuesta SOS en parámetros biológicos relevantes como el *fitness* bacteriano y la producción de *biofilm* en cepas con distintos fenotipos.
4. Evaluar el papel que desempeña la respuesta SOS en la eficacia bactericida de las fluoroquinolonas en un modelo *in vivo*.

IV. PUBLICACIONES

A continuación, se presentan los dos trabajos fruto de esta Tesis. Se trata de dos enfoques diferentes de la utilidad de la supresión de la respuesta SOS bacteriana como potencial estrategia terapéutica.

En el primer artículo, se aborda el impacto que la supresión de la respuesta SOS tiene sobre la sensibilidad a quinolonas en cepas resistentes a estos antimicrobianos. Las aproximaciones experimentales de laboratorio son confirmadas por un modelo *in vivo* (artículo 1).

En el segundo artículo, se analiza la repercusión que la supresión de la respuesta SOS tiene sobre la mutagénesis y la utilidad que la diana terapéutica propuesta puede tener en la restricción del desarrollo de mutantes resistentes a fluoroquinolonas. Además, se analizan otros parámetros relacionados con la implicación del regulón SOS en fenómenos de virulencia, como el *fitness* y la producción de *biofilm* (artículo 2).

Antes de comenzar con la exposición de los resultados de estos trabajos cabe hacer algunas consideraciones en relación a las cepas utilizadas y las concentraciones de antimicrobianos seleccionadas para los ensayos experimentales.

Se utilizó una colección de cepas isogénicas de *E. coli* ATCC 25922 con diferentes mecanismos de resistencia a quinolonas tanto cromosómicos como plasmídicos. A partir de esta colección, se generaron cepas con la respuesta SOS alterada: por inactivación, mediante delección de *recA* o por hipoactivación, tras modificación de LexA a LexA1 (G80D). De esta forma obtuvimos una colección de cepas isogénicas de *E. coli* con distintos espectros de actividad de SOS y de sensibilidad a quinolonas (Tabla 1, artículo 1 y Tabla S1 en material suplementario, artículo 2).

Con el objetivo de abarcar el máximo espectro posible de situaciones terapéuticas, se decidió utilizar tres grupos de concentraciones: i) concentraciones subinhibitorias y próximas al valor de CMI, ii) concentraciones muy superiores a esta, para el análisis del impacto de la supresión de la respuesta SOS a concentraciones extremas y iii) concentraciones fijas de antimicrobiano, de 1 mg/L de ciprofloxacino, por ser el valor de CMI límite que separa sensibilidad de resistencia según el comité EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) hasta 2016,³⁰⁰ periodo en el que se diseñaron y comenzaron a desarrollarse los ensayos, y concentraciones de 2,5 mg/L de ciprofloxacino, concentración máxima de antimicrobiano alcanzada en suero.³⁰¹

Artículo 1: Reversion de la resistencia a quinolonas mediante supresión de la respuesta SOS

Resumen de resultados

En este primer artículo, se evalúa el impacto que la modificación de la respuesta SOS tiene en la resensibilización de cepas resistentes en combinación con fluoroquinolonas. Se utilizó la colección de cepas isogénicas de *E. coli* citada. Con estas construcciones se llevaron a cabo diversos ensayos experimentales: i) estáticos, mediante la determinación de la CMI, y ii) dinámicos, se trata de la evaluación a corto y largo plazo de esta estrategia para conocer su implicación en la reparación del daño causado por antimicrobianos bactericidas, por medio de la realización de ensayos de citometría de flujo y de curvas de letalidad, respectivamente.

La supresión de la respuesta SOS sensibiliza cepas resistentes a fluoroquinolonas

Se determinó la CMI de quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacino y ácido nalidíxico) en todas las cepas de la colección. Los descensos en la CMI de ciprofloxacino variaron entre 1 (sin cambio) y >8 veces en cepas $\Delta recA$ y LexA1 (Tabla 1). Sin embargo, la sensibilización fue más eficiente en las cepas $\Delta recA$, en las que se registraron mayores descensos de CMI, de entre 4 y >8 veces (Tabla 1; Figura S2). El proceso de sensibilización fue igualmente eficiente en cepas con distintos fenotipos: sensible, con sensibilidad disminuida y resistente; siendo independiente del mecanismo molecular implicado en la resistencia a quinolonas y de su origen, plasmídico o cromosómico. Además, los cambios observados en la CMI de ciprofloxacino para las cepas EC08 (CMI de 2 mg/L descendió a 0,5 mg/L) y EC09 (CMI de 8 mg/L disminuyó a 1 mg/L) supusieron un cambio de categoría clínica por ambos comités, CLSI (*Clinical of Laboratory Standards Institute*) y EUCAST. También se observaron cambios de categoría clínica para los antimicrobianos levofloxacino y moxifloxacino.

Descensos en los valores de CMI fueron registrados para todas las quinolonas evaluadas. Estos datos apoyan la capacidad de la supresión de la respuesta SOS de resensibilizar mutantes resistentes hospedando incluso varios mecanismos de resistencia a quinolonas (Figura 5).

La supresión de la respuesta SOS incrementa la actividad bactericida frente a cepas resistentes

La viabilidad bacteriana fue evaluada mediante curvas de tiempo-muerte. A concentraciones fijas de ciprofloxacino (1 y 2,5 mg/L) y tras 24h de incubación se observó una marcada reducción de bacterias viables en cepas con la respuesta SOS inactivada (Figura 2). A 1 mg/L, se observó un efecto bactericida (descenso de $>3 \log_{10}$ UFC/ml) para EC08recA tras 4h, sin recuperación de bacterias viables a las 6h. A 2,5 mg/L, se registró un efecto bactericida para ambas cepas, EC08 (tras 4h) y EC08recA (a las 2h), aunque un recrecimiento fue cuantificado en EC08 tras 24h ($6,8 \log_{10}$ UFC/ml). Por el contrario, a esta concentración de ciprofloxacino sólo se registró efecto bactericida para EC09recA (tras 2h). También se evaluaron concentraciones relativas a la CMI de la cepa con fenotipo salvaje (1xCMI y 4xCMI). A 1xCMI de ciprofloxacino, las principales diferencias en los recuentos de bacterias viables se observaron a las 24h ($\Delta 6,1$, $\Delta 4,2$, $\Delta 9,5$ y $\Delta 6,9 \log_{10}$ UFC/ml para las parejas isogénicas ATCC, EC04, EC08 y EC09, respectivamente) (Figura S3).

La supresión de la respuesta SOS reduce la supervivencia bacteriana en cepas resistentes tras periodos de incubación cortos

La tinción LIVE/DEAD fue utilizada para llevar a cabo tres aproximaciones experimentales. Primero, por medio del lector multiplaca Infinite 200PRO, a 1xCMI de ciprofloxacino de la cepa parental y tras 4h de exposición al antimicrobiano, se observaron descensos de células vivas del 88, 94, 98 y 98% para las cepas de *E. coli* ATCCrecA, EC04recA, EC08recA, and EC09recA, respectivamente, en relación a las cepas parentales (Figura S4A). Segundo, estos resultados fueron confirmados mediante




ensayos de microscopía de fluorescencia (Figura S4A). Tercero, se utilizaron ensayos de citometría de flujo para examinar la viabilidad bacteriana tras 60 min de exposición a múltiples concentraciones de ciprofloxacino; se observó un descenso significativo en la viabilidad celular a 4xCMi y a 2,5 mg/L (Figura 3 y S4B). Este hecho puso de manifiesto la importancia de la activación de la respuesta SOS para la supervivencia bacteriana.

La supresión de la respuesta SOS mejora la actividad bactericida frente a cepas resistentes *in vivo*

Las cepas EC08 y EC08recA fueron seleccionadas para su evaluación en un modelo murino de sepsis intraperitoneal. Se utilizaron dos dosificaciones de ciprofloxacino, 50 y 100 mg/Kg. Para el grupo EC08 tratado con 50 mg/kg cada 12 h, se registró un 33% de mortalidad en las primeras 24h, por el contrario, no se observó mortalidad en el resto de los grupos tratados durante los experimentos. El tratamiento con ambas dosificaciones redujo significativamente la carga bacteriana ($\Delta\log_{10}$ de UFC/g de 1,75 y 1,76 en el bazo; $P < 0,001$, respectivamente) de los ratones infectados con EC08recA, con respecto a los grupos infectados con EC08 (Figura 4).



Quinolone Resistance Reversion by Targeting the SOS Response

E. Recacha,^{a,b} J. Machuca,^{a,c,d} P. Díaz de Alba,^a M. Ramos-Güelfo,^a
 F. Docobo-Pérez,^{b,c,d}  J. Rodríguez-Beltrán,^{c,d}  J. Blázquez,^{e,f} A. Pascual,^{a,b,c,d}
 J. M. Rodríguez-Martínez^{b,c,d}

Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain^a; Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain^b; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^c; Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain^d; Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain^e; Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain^f

ABSTRACT Suppression of the SOS response has been postulated as a therapeutic strategy for potentiating antimicrobial agents. We aimed to evaluate the impact of its suppression on reversing resistance using a model of isogenic strains of *Escherichia coli* representing multiple levels of quinolone resistance. *E. coli* mutants exhibiting a spectrum of SOS activity were constructed from isogenic strains carrying quinolone resistance mechanisms with susceptible and resistant phenotypes. Changes in susceptibility were evaluated by static (MICs) and dynamic (killing curves or flow cytometry) methodologies. A peritoneal sepsis murine model was used to evaluate *in vivo* impact. Suppression of the SOS response was capable of resensitizing mutant strains with genes encoding three or four different resistance mechanisms (up to 15-fold reductions in MICs). Killing curve assays showed a clear disadvantage for survival ($\Delta\log_{10}$ CFU per milliliter [CFU/ml] of 8 log units after 24 h), and the *in vivo* efficacy of ciprofloxacin was significantly enhanced ($\Delta\log_{10}$ CFU/g of 1.76 log units) in resistant strains with a suppressed SOS response. This effect was evident even after short periods (60 min) of exposure. Suppression of the SOS response reverses antimicrobial resistance across a range of *E. coli* phenotypes from reduced susceptibility to highly resistant, playing a significant role in increasing the *in vivo* efficacy.

IMPORTANCE The rapid rise of antibiotic resistance in bacterial pathogens is now considered a major global health crisis. New strategies are needed to block the development of resistance and to extend the life of antibiotics. The SOS response is a promising target for developing therapeutics to reduce the acquisition of antibiotic resistance and enhance the bactericidal activity of antimicrobial agents such as quinolones. Significant questions remain regarding its impact as a strategy for the reversion or resensitization of antibiotic-resistant bacteria. To address this question, we have generated *E. coli* mutants that exhibited a spectrum of SOS activity, ranging from a natural SOS response to a hypoinducible or constitutively suppressed response. We tested the effects of these mutations on quinolone resistance reversion under therapeutic concentrations in a set of isogenic strains carrying different combinations of chromosome- and plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms with susceptible, low-level quinolone resistant, resistant, and highly resistant phenotypes. Our comprehensive analysis opens up a new strategy for reversing drug resistance by targeting the SOS response.

KEYWORDS RecA, SOS response, quinolones, resensitization of antibiotic-resistant bacteria, resistance reversion

Received 6 June 2017 Accepted 8 September 2017 Published 10 October 2017

Citation Recacha E, Machuca J, Díaz de Alba P, Ramos-Güelfo M, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Beltrán J, Blázquez J, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM. 2017. Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *mBio* 8:e00971-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00971-17>.

Editor Robert A. Bonomo, Louis Stokes Veterans Affairs Medical Center

Copyright © 2017 Recacha et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to J. M. Rodríguez-Martínez, jmrodriguez@us.es.

E.R. and J.M. are co-first authors, and A.P. and J.M.R.-M. are co-senior authors.

Efforts to overcome the problem of resistance have focused mainly on modifying existing antibiotics by circumventing the molecular mechanisms conferring resistance (1). While such efforts are efficacious against resistant strains, new resistance mechanisms often arise in the process of adaptation to new antimicrobial agents (2, 3).

Members of the *Enterobacteriaceae* family, like *Escherichia coli*, are among the most common causes of community and nosocomial infections. Fluoroquinolones are used for empirical and directed therapy in infections caused by *E. coli* (4). Quinolone resistance has increased notably in *Enterobacteriaceae* from both human and veterinary isolates (5, 6). Mechanisms of fluoroquinolone resistance occur principally through chromosomal mutations in genes encoding the quinolone targets (DNA gyrase and topoisomerase IV), and to a lesser extent through decreased permeability (6). Plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms have also been described (7). These determinants on their own (whether chromosomally or plasmid mediated) confer low-level quinolone resistance (LLQR), so that multiple mechanisms must be combined to achieve clinical resistance.

New strategies are needed to block the development of resistance and to extend the life of antibiotics such as quinolones. Multiple studies suggest that adaptive resistance mutations and the acquisition of resistance genes by bacteria are induced or facilitated by antibiotic therapy due to the activation of RecA (leading to the SOS response, the DNA repair and mutagenesis pathway) (8–10). Antibiotics can trigger bacterial stress at both lethal and sublethal concentrations (8). In this respect, fluoroquinolones are potent inducers of the SOS response, causing DNA damage or arresting replication forks by blocking DNA gyrase (10, 11). The SOS pathway is initiated through the activation of RecA, which in turn induces autocatalytic cleavage of the LexA repressor and induces the SOS response genes (8, 10). RecA is involved in DNA repair, recombination, induction of the SOS response, horizontal gene transfer, and biofilm formation (10, 12–14). Systematically altering bacterial SOS activity, both constitutive SOS activation and inactivation, has been revealed as a therapeutic strategy for potentiating bactericidal antibiotics like quinolones against highly susceptible wild-type *E. coli* (15, 16). Several compounds have also been shown to inhibit the ATPase activity of RecA *in vitro* (17–19). Phthalocyanine tetrasulfonate were recently characterized as an *in vivo* RecA inhibitor (20). In short, the SOS response is a promising target for developing therapeutics to enhance the bactericidal activity of antimicrobial agents such as quinolones.

Despite genetic data implicating the SOS response as critical to the survival and adaptation of highly susceptible wild-type bacteria, significant questions remain regarding its impact as a strategy for the reversion or resensitization of antibiotic-resistant bacteria under therapeutic concentrations (21–23). To address this question, we generated *E. coli* mutants that exhibited a spectrum of SOS activity, ranging from a natural SOS response to a hypoinducible (LexA1; very low cleavage rate) (24) or constitutively suppressed response ($\Delta recA$) (Fig. 1). We tested the effects of these mutations on a set of isogenic strains carrying different combinations of chromosome- and plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms with susceptible, LLQR, resistant, and highly resistant phenotypes. Our comprehensive analysis opens up a new strategy for reversing drug resistance by targeting the SOS response.

(This study was presented in part at ASM Microbe, Boston, MA, in 2016 [oral presentation, session 374].)

RESULTS

Suppression of the SOS response sensitizes fluoroquinolone resistance. Six isogenic *E. coli* strains harboring frequent chromosomal mutations, associated with fluoroquinolone resistance, in the *gyrA* and/or *parC* genes and/or a deletion in the *marR* gene and combined with plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) mechanism (*qnrS*) (ranging from wild-type high level of susceptibility to a high level of resistance) were used for *recA* deletion or *lexA* replacement by *lexA1* and evaluated for susceptibility to quinolones (Table 1; also see Table S1A in the supplemental material).

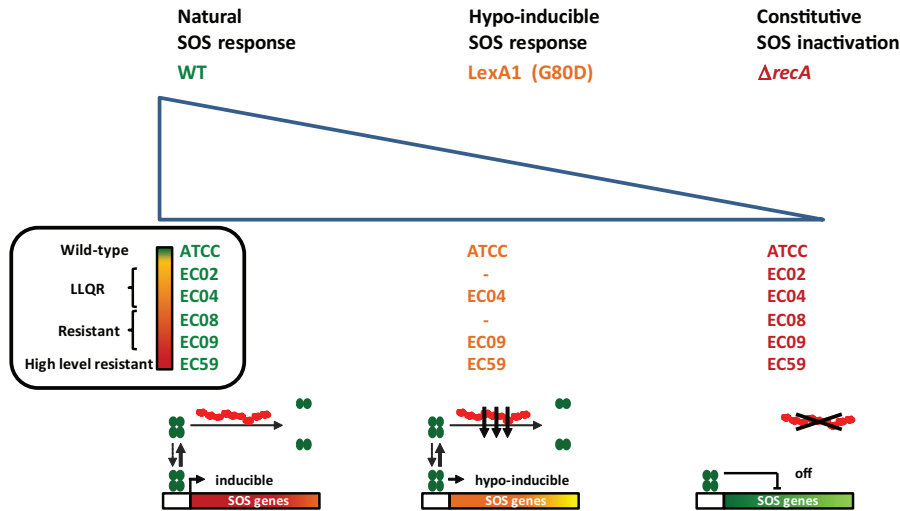


FIG 1 Engineered *recA* and *lexA* variants in *E. coli* displaying a range of SOS activities. The LexA protein is represented by green ovals, and *lexA1* (G80D) cleavage mutations are labeled in orange. RecA is shown as red filaments, and *recA* deleted mutants are labeled in red. Strains with a natural SOS response are labeled in green. Four *lexA1* mutants and six mutants (WT) phenotypes of quinolone resistance, allowing the bacterial response to quinolones to be examined across a spectrum of SOS activity. Activated RecA filaments led to cleavage of LexA and inducible expression of SOS genes in the WT strain. Deletion of *recA* ($\Delta recA$) inactivated the SOS response. Mutations in the LexA protein (G80D) reduce the rate of self-cleavage relative to the WT strain and so affect the level of SOS induction.

We first confirmed that the $\Delta recA$ and *lexA1* mutations produce the expected perturbations in the SOS response (significant differences were observed confirming suppression and hypoinduction of the SOS response, respectively) (Fig. S1). The reductions in the MICs of ciprofloxacin ranged from 1-fold to >8-fold against both the $\Delta recA$ and *lexA1* strains (Table 1). Sensitization was greater in $\Delta recA$ strains (with constitutive SOS inactivation), ranging from 4-fold to >8-fold (Table 1; Fig. S2). Of note, the EC04*lexA1* strain did not reduce the MIC values of most the quinolones, which lends support to the hypoinducible SOS response as a less effective strategy of sensitization to quinolones. The process of sensitization was equally efficient across susceptible, LLQR, and resistant phenotypes and independent of the type of molecular mechanism involved in quinolone resistance or whether it was chromosomally or plasmid mediated. Interestingly, *recA* inactivation in the EC02 strain (carrying a GyrA protein with S83L substitution) modified the ciprofloxacin MIC value below the epidemiological cutoff (0.032 mg/liter) (<http://www.eucast.org>) (25). Here we show that, in terms of MICs, SOS inactivation suppresses the effects of first-step mutations toward resistance associated with topoisomerase type II modifications.

Similar results were observed for all quinolones tested. The MICs were reduced up to 8-, 8-, 15-, 4-, 4-, and 2-fold for ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, and nalidixic acid, respectively (Table S1A).

In addition, the changes in the ciprofloxacin MICs observed for EC08 (MIC of 2 mg/liter down to 0.5 mg/liter) and EC09 (MIC of 8 mg/liter down to 1 mg/liter) *recA* deficient strains involved changes to the susceptible category. Here, strain EC08, which is intermediate or resistant according to the CLSI and EUCAST breakpoints, respectively, was sensitized to susceptible according to both committees. Similarly, the resistant strain, EC09, was sensitized to susceptible and intermediate-susceptible according to the CLSI and EUCAST breakpoints, respectively (Table 1). The clinical category was also changed to susceptible against levofloxacin and moxifloxacin (Table S1A).

These data all lend support to suppression of the SOS response as capable of resensitizing mutant strains with genes encoding three, or even four, different mech-

TABLE 1 Genotypes and ciprofloxacin susceptibility (by Etest) of isogenic strains

| Strain | Genotype ^a | | | | | | MIC ^b | CC (CLSI/EUCAST) ^c | Fold change ^d | Source or reference |
|-------------------|-----------------------|--------------|-------------|---------------|-------------|-----------------|------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| | <i>gyrA1</i> | <i>gyrA2</i> | <i>parC</i> | <i>marR</i> | <i>qnr</i> | SOS system | | | | |
| ATCC ^e | | | | | | WT ^f | 0.008 | S/S | | Lab collection |
| ATCCrecA | | | | | | Δ recA | <0.002 | S/S | >4 | This study |
| ATCClexA1 | | | | | | lexA1 | 0.004 | S/S | 2 | This study |
| EC02 | S83L | | | | | WT | 0.25 | S/S | | 31 |
| EC02recA | S83L | | | | | Δ recA | 0.03 | S/S | 8 | This study |
| EC04 | S83L | | S80R | | | WT | 0.5 | S/S | | 31 |
| EC04recA | S83L | | S80R | | | Δ recA | 0.125 | S/S | 4 | This study |
| EC04lexA1 | S83L | | S80R | | | lexA1 | 0.5 | S/S | 1 | This study |
| EC08 | S83L | D87N | S80R | | | WT | 2 | I/R | | 31 |
| EC08recA | S83L | D87N | S80R | | | Δ recA | 0.5 | S/S | 4 | This study |
| EC09 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | | WT | 8 | R/R | | 31 |
| EC09recA | S83L | D87N | S80R | Δ marR | | Δ recA | 1 | S/I | 8 | This study |
| EC09lexA1 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | | lexA1 | 2 | I/R | 4 | This study |
| EC59 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | <i>qnrS</i> | WT | >32 | R/R | | 31 |
| EC59recA | S83L | D87N | S80R | Δ marR | <i>qnrS</i> | Δ recA | 4 | R/R | >8 | This study |
| EC59lexA1 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | <i>qnrS</i> | lexA1 | 32 | R/R | >1 | This study |

^aStrains are isogenic to *E. coli* ATCC 25922 and carry only the chromosomal modifications, *qnrS* gene, and/or SOS dysfunction (*recA* deletion or nonproteolizable LexA variant [LexA1]). Resistance-associated mutations located in the *GyrA* and *ParC* proteins have been defined as resistance mechanisms that alter the target site.

^bMIC (in milligrams per liter) of ciprofloxacin by Etest.

^cCC, clinical category according to the CLSI and EUCAST breakpoints (25, 38). The clinical category according to the CLSI breakpoint is shown before the slash, and the clinical category according to the EUCAST breakpoint is shown after the slash. The clinical categories are shown as follows: S, susceptible; I, intermediate susceptibility; R, resistant. Subgroups with clinical category changes are indicated in boldface type.

^dFold reduction of MIC compared to the MIC of wild-type strain for the SOS system in each isogenic subgroup.

^e*E. coli* ATCC 25922.

^fWT, wild-type.

anisms of acquired quinolone resistance. The degree of sensitization could be considered moderate (up to 15-fold).

SOS suppression enhances bactericidal activity against resistant strains. To show the impact of SOS response suppression in terms of bacterial viability, time-kill curves were obtained for each isogenic group according to the SOS system induction status. At fixed concentrations, a marked reduction of viable bacteria was observed with the inactivated SOS response over 24 h of incubation (Fig. 2). At 1 mg/liter, a bactericidal effect (drop of >3 log₁₀ CFU/ml) was observed against strain EC08recA after 4 h (and no viable bacteria were recovered after 6 h). At 2.5 mg/liter, a bactericidal effect was observed against both EC08 (after 4 h) and EC08recA (after 2 h), although regrowth was observed after 24 h in strain EC08 (6.8 log₁₀ CFU/ml) but not strain EC08recA (Fig. 2). At 1 mg/liter, a bacteriostatic effect only (drop of <3 log₁₀ CFU/ml) was observed in strain EC09recA (although a marked difference was observed in the first 8 h compared to EC09, up to Δ 4.2 log₁₀ CFU/ml at 6 h). At 2.5 mg/liter, however, a bactericidal effect was observed in EC09recA (after 2 h) and a bacteriostatic effect in EC09 in the first 8 h, with regrowth after 24 h (Fig. 2). Under these conditions, SOS induction suppression leads to a high bactericidal effect under relevant therapeutic concentrations in *E. coli* harboring multiple mechanisms of quinolone resistance.

At 1× MIC of ciprofloxacin (of the tested strains harboring a nonmodified SOS system), major differences in the numbers of viable bacteria were observed after 24 h (Δ 6.1, Δ 4.2, Δ 9.5, and Δ 6.9 log₁₀ CFU/ml in the ATCC, EC04, EC08, and EC09 isogenic pairs, respectively). Minor differences were observed at 4× MIC of ciprofloxacin (Fig. S3). Additional kinetic assays (growth curves and ATP production) confirmed these results (Fig. S8).

Suppression of SOS response reduces survival in resistant strains after a short time. The LIVE/DEAD staining method was tested using three different approaches to show the impact of SOS inactivation on bacterial survival during a short period of

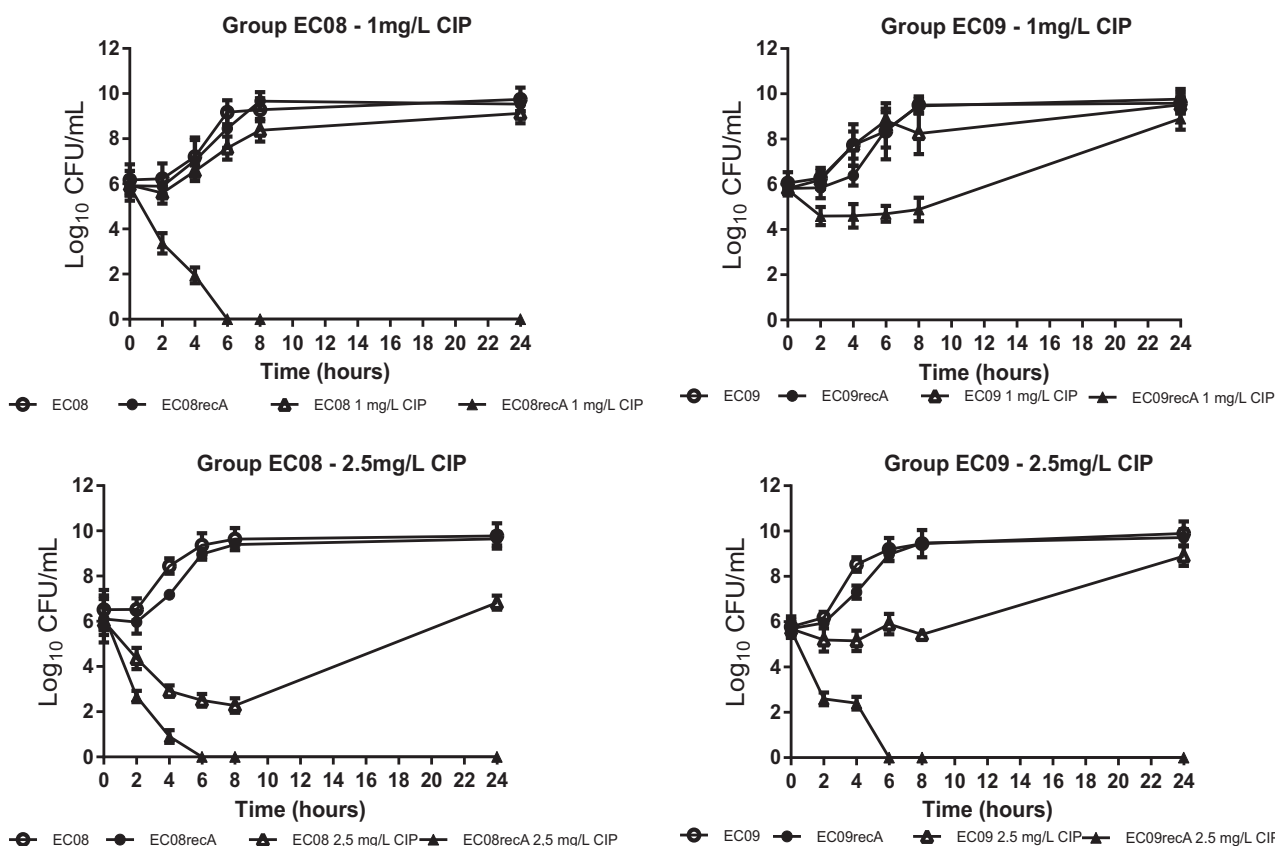


FIG 2 SOS inactivation enhances bactericidal activity against resistant strains. Viable bacterial counts of the EC08/EC08recA and EC09/EC09recA isogenic pairs in time-kill assays at ciprofloxacin (CIP) concentrations of 1 mg/liter (breakpoint for resistance according to EUCAST) and 2.5 mg/liter (human serum C_{max}), respectively. Data are represented as the means from at least three independent measurements. Standard deviations are indicated by the error bars (standard deviations not shown are smaller than the symbols).

exposure to quinolones. First, using the Infinite 200PRO multireader, it was clear that the live/dead ratio depended significantly on the SOS response functionality. Figure S4A shows the quantitative results obtained at $1 \times$ MIC of ciprofloxacin (according to the MICs of strains with a functional SOS response) after 4 h of exposure. Under these conditions, the ratio of live to dead cells for *E. coli* ATCCrecA, EC04recA, EC08recA, and EC09recA deficient SOS variants decreased by 88%, 94%, 98%, and 98%, respectively, compared to their parental variants with the wild-type SOS response ($P < 0.001$). This reduction was also proportional to the level of quinolone resistance ($P < 0.001$). Second, these results were supported by fluorescence microscopy assay. Figure S4A shows representative images of strains EC08 and EC08recA exposed to 2.5 mg/liter (maximum concentration of drug in serum [C_{max}]) of ciprofloxacin for 4 h, supporting the differential response. Third, in order to determine whether the SOS response was a key factor for survival after a very short period of exposure to bactericidal drugs like quinolones in strains with mechanisms of acquired resistance (strains EC02, EC04, EC08, and EC09), flow cytometry was used to examine bacterial viability after 60 min of exposure at multiple concentrations of ciprofloxacin (see Materials and Methods). A significant reduction in cell viability was observed following treatment with ciprofloxacin at $4 \times$ MIC and 2.5 mg/liter (Fig. 3 and S4B) (also at $1 \times$ MIC and 1 mg/liter [data not shown]), which correlates directly with the inability to activate the SOS response. These results imply that the SOS response is a key short-term responder to DNA damage in both LLQR and resistant *E. coli* at clinically relevant quinolone concentrations.

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the *in vivo* model. The fit of the mathematical model to the mouse serum data (i.e., correlation between the observed

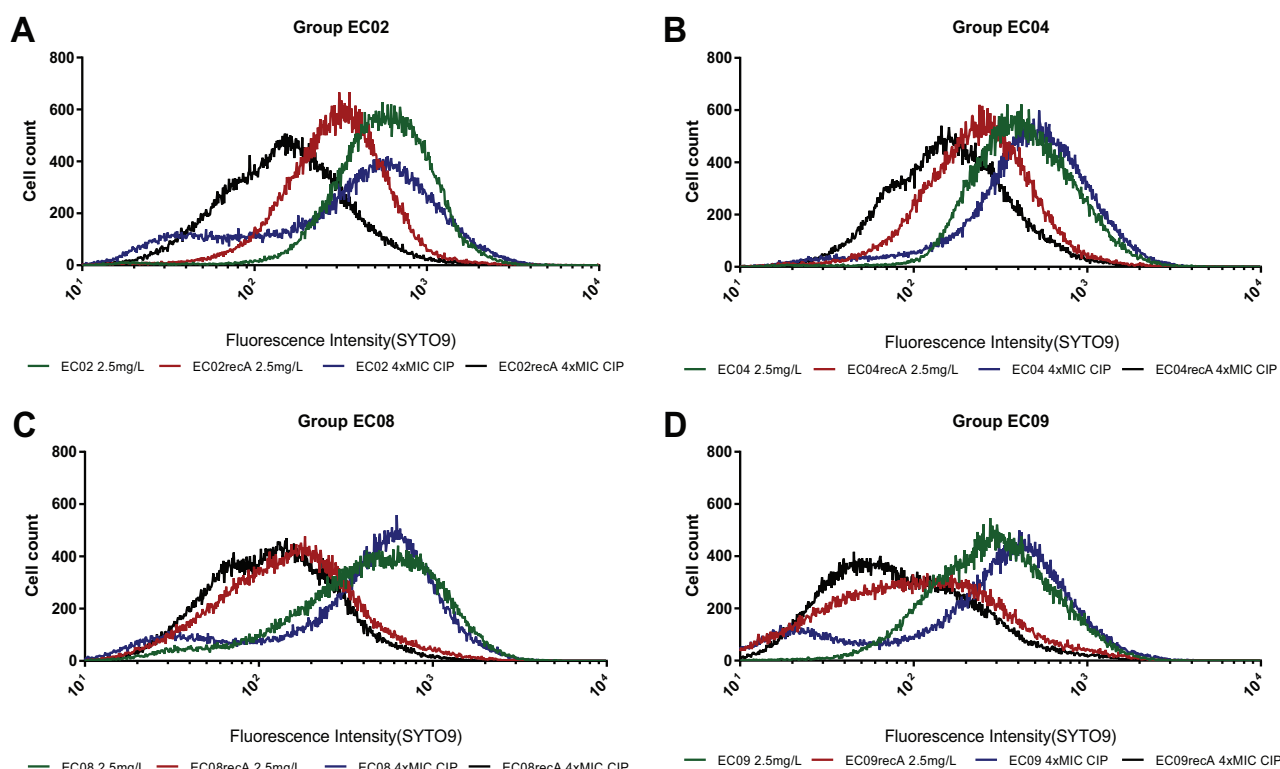


FIG 3 Flow cytometry of four groups of isogenic LLQR cells (harboring a natural [wild-type] or inactive SOS system [$\Delta recA$]) treated for 60 min at 2.5 mg/liter or at 4 \times MIC (relative to the MIC of the wild-type SOS) of ciprofloxacin. Survival was measured as staining with green fluorescent SYTO9. Strains EC02 (A), EC04 (B), EC08 (C), and EC09 (D) were studied.

versus predicted data of the mathematical model) was acceptable ($R^2 = 0.968$). The estimated parameter values were as follows: clearance (CL), 0.38×10^{-1} liters/h; volume of distribution of the drug in the peripheral compartment (V_p) of 0.95×10^{-2} liters; transfer rate constant from central to peripheral compartment (k_{cp}) of 4.03; transfer rate constant from peripheral to central compartment (k_{pc}) = 0.44×10^{-7} (Fig. S5). AUC/MIC values of 12.2/24.4 for strain EC08 and 48.8/97.6 for strain EC08recA were predicted in our model for 50 and 100 mg/kg of body weight, respectively.

SOS suppression enhances bactericidal activity against resistant strains *in vivo*.

Selected isogenic mutants, ciprofloxacin-nonsusceptible strain EC08 and susceptible strain EC08 $\Delta recA$, were included in a murine model of intraperitoneal sepsis. No differences of bacterial load were observed in the spleens of control groups infected with strains EC08 and EC08 $\Delta recA$ (7.73 ± 0.62 versus 7.45 ± 0.61 log₁₀ CFU/g). All the controls died in the first 48 h according to the minimum lethal dose (MLD), with no differences between the strains ($P > 0.05$). Note that 33% mortality was observed within the first 24 h in the EC08 group treated with 50 mg/kg every 12 h (q12h), while no mortality was observed in the remaining treated groups during the experiments. With respect to bacterial burden, in mice infected with strain EC08 $\Delta recA$ (with the inactivated SOS response), treatment with ciprofloxacin at 50 mg/kg q12h and at 100 mg/kg q12h significantly reduced bacterial concentrations (Δ log₁₀ CFU/g units of 1.75 and 1.76 in the spleen; $P < 0.001$, respectively) with respect to groups infected with strain EC08 (with the active SOS response) (Fig. 4).

DISCUSSION

The SOS response plays an important role in adaptation and acquired bacterial resistance to antibiotics. The key regulators (LexA and RecA) have been proposed as an attractive strategy for increasing bacterial sensitivity to antibiotics and combating the

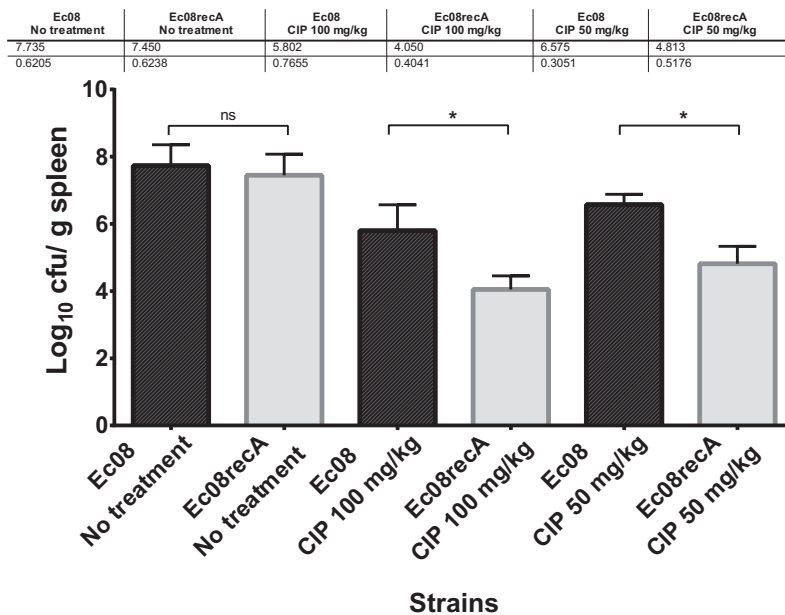


FIG 4 SOS inactivation reduces the *in vivo* survival of mice infected with bacteria receiving quinolone treatment. Efficacies of ciprofloxacin (CIP) in a murine model of sepsis caused by strains EC08 (intact SOS system) and EC08recA (inactivated SOS system). Group 1 was given ciprofloxacin 50 mg/kg q12h intraperitoneally. Group 2 was given ciprofloxacin 100 mg/kg q12h intraperitoneally. The control group was not treated with ciprofloxacin. Standard deviations are indicated by the error bars. Values that were significantly different ($P < 0.001$) are indicated by a bar and asterisk. Values that were not significantly different (ns) are indicated.

emergence of resistance. This strategy has been tested essentially against highly susceptible wild-type bacteria without molecular mechanisms of acquired resistance (16, 26–28). Low-level resistance phenotypes, such as LLQR (which can be exposed to sublethal levels of antibiotics during antimicrobial treatment), pose a significant threat to the development of clinical resistance (29–31). Previous data validating the SOS response as a target of interest motivated our efforts to explore the consequences of a broader spectrum of SOS activity, ranging from natural through hypoinducible to constitutively repressed SOS response (Fig. 1) in a set of isogenic strains carrying combinations of chromosome- and plasmid-mediated quinolone resistance, and phenotypes ranging from susceptible to LLQR, resistant, and highly resistant. Our detailed analysis opens up a new strategy for reversing drug resistance by targeting the SOS response.

The bactericidal activity of quinolones in bacteria has been related to a combination of DNA fragmentation, reactive oxygen species (ROS) production, and programmed cell death systems, such as *mazEF* (32–35). The SOS response has also been postulated as a formidable strategy against aggressions such as antimicrobial exposure (10). The link between quinolones, activation of the SOS response, and induction of antibiotic resistance (26, 28) demonstrates the potential for reducing resistance by targeting the RecA and LexA proteins that are essential for an SOS response. Our study provides evidence that suppression of the SOS pathway can synergize with specific antimicrobial agents, such as quinolones, to reduce MICs in a process of resistance reversion. In the case of constitutive SOS inactivation, the MIC data of $\Delta recA$ mutants were in agreement with earlier studies of highly susceptible wild-type phenotypes (36, 37), and resensitization was observed in LLQR, resistant, and highly resistant phenotypes (Table 1 and Fig. 2 and 4; also see Fig. S6 in the supplemental material). However, the increased sensitivity was less when the level of SOS induction was attenuated by a slow-cleaving LexA variant, the LexA1 (G80D) strain, which showed minor changes in MIC in both susceptible

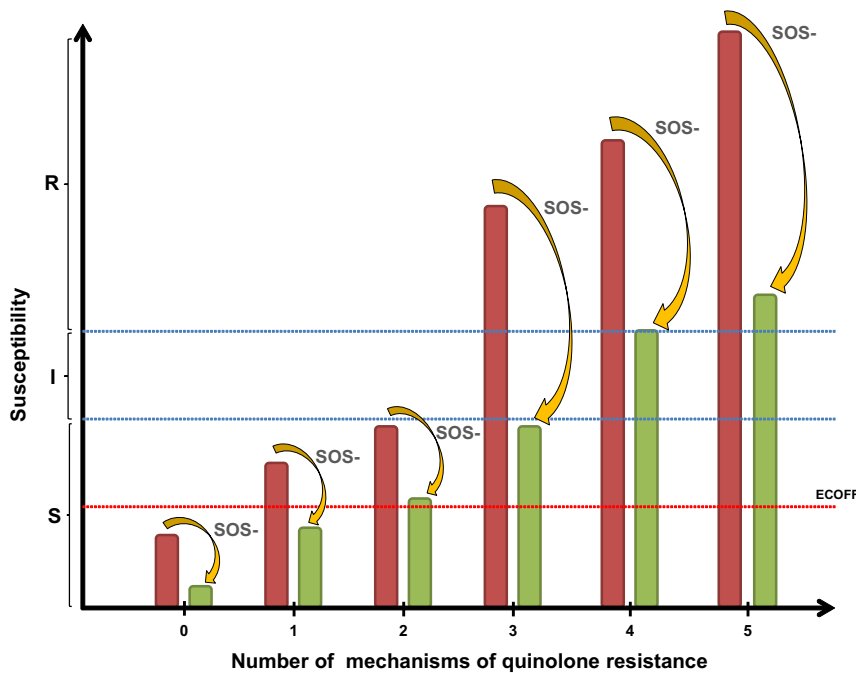


FIG 5 A general qualitative model illustrating the efficacy of SOS response suppression for reversion of fluoroquinolone resistance. Reversion of resistance was even observed in bacteria carrying genes encoding four different resistance mechanisms. Red bars correspond to *E. coli* with an intact SOS system; green bars correspond to *E. coli* with a suppressed SOS response. The epidemiological cutoff (ECOFF) (0.032 mg/liter [<http://www.eucast.org>]) is indicated by the red dotted line. S, I, and R mean susceptibility, intermediate susceptibility, and clinical resistance, respectively. SOS- means SOS response suppression.

and resistant phenotypes. This discrepancy could be due, in part, because *recA* deletion can have an impact beyond leading to loss of LexA cleavage and SOS response suppression, with additional implications in important processes like homologous recombination. An overactive SOS response can also increase quinolone susceptibility, although to a lesser extent than constitutive inhibition (15). Moreover, several compounds that inhibit RecA *in vitro* or *in vivo* have been discovered (17–20). In short, potent inhibition of the SOS response in concert with DNA-damaging agents like quinolones offers the best option for potential synergy, and we focused our study on *recA* mutants in order to show their impact on the reversion of quinolone resistance.

According to the CLSI guidelines (38), complete inactivation of the SOS response led to a change in clinical category for ciprofloxacin from intermediate or resistant to susceptible in EC08 (S83L, D87N, and S80R substitutions) and EC09 (S83L, D87N, and S80R substitutions and $\Delta marR$) strains, respectively. Using EUCAST guidelines (25), inactivation changed the clinical category from resistant to susceptible in strain EC08 and to intermediate-susceptible in strain EC09, respectively. These results support the relevance of a strategy of SOS inactivation for bringing about reversion of antimicrobial resistance at a level that could be clinically significant. Interestingly, the inactivation of *recA* in the EC02 strain (encoding an S83L substitution) modified the ciprofloxacin MIC below the epidemiological cutoff (0.032 mg/liter; <http://www.eucast.org>) (39, 40). Here we show that inactivation of the SOS system suppresses the effect, in terms of MIC, of the first step toward resistance associated with topoisomerase type II modifications. A qualitative model illustrating the efficacy of SOS suppression in the resensitization of quinolone resistance is shown in Fig. 5, showing that this phenomenon is observed in bacteria with genes encoding multiple (up to four) different resistance mechanisms.

In terms of kinetic assays, multiple approaches were developed to evaluate the

reversion of quinolone resistance mediated by an inactivated SOS response at both long and short periods of exposure to drugs. In all cases, we observed a clear selective disadvantage for survival in strains with a suppressed SOS response when exposed to ciprofloxacin at relevant concentrations (breakpoint concentrations, serum C_{max} , and MIC values) (Fig. 2 and 3 and S6). For time-kill curves, an inactivated SOS response in *E. coli* harboring multiple mechanisms of resistance had a high bactericidal effect in the presence of clinically relevant ciprofloxacin concentrations after 2 to 4 h of exposure (depending on the strain and conditions), which was maintained for 24 h (Fig. 2 and S3). Flow cytometry assays also showed significant reductions in cell viability following a short period of exposure to the drug (60 min), which was directly related to the inability to activate the SOS response (Fig. 3). Our data show that changes in the MICs of specific quinolone-resistant strains (EC08 and EC09) as a result of an inactivated SOS response correlated with ROS formation at clinically relevant concentrations of ciprofloxacin (Fig. S7). In terms of bacterial viability, these data support the potential utility of this strategy for resensitizing or reversing quinolone resistance after both short and long periods of exposure to quinolones at relevant concentrations. Interestingly, whether SOS response suppression could restrict the evolution to clinical resistance in LLQR phenotypes should be tested (16).

Although SOS response inactivation led to moderate reductions in the MICs of ciprofloxacin (up to 8-fold) and other fluoroquinolones (up to 15-fold), these differences could play a significant role in therapeutic failure, bearing in mind the concentration-dependent character of these antimicrobials, whose predictors of efficacy *in vivo* are C_{max}/MIC and AUC/MIC. AUC/MIC values of >30 are associated with low mortality and are required for clinical efficacy (41–44). Our murine sepsis model, using isogenic strains that were resistant (EC08) and susceptible (EC08recA; lacking SOS response) to ciprofloxacin according to EUCAST, showed the impact of the pathway on the *in vivo* efficacy of this fluoroquinolone (with a reduction in bacterial count of around 99%). Our murine model shows that inactivation of the SOS pathway in an initially quinolone-resistant *E. coli* strain (EC08) significantly increases the *in vivo* efficacy of ciprofloxacin. According to our data, engineered bacteriophage targeting SOS response (by overexpression of an inactivated LexA variant) was shown to be a promising resistance reversion strategy (45).

In overall terms, this study shows that suppression of the SOS response enhances the bactericidal activity of antimicrobials like quinolones across a range of *E. coli* phenotypes from highly susceptible to highly resistant and plays a significant role in increasing the *in vivo* efficacy of these bactericidal drugs against bacteria with multiple mechanisms of acquired resistance. The development of RecA inhibitors could function as an adjuvant therapy, potentiating antimicrobial activity and contributing to the resensitization or reversion of drug resistance.

MATERIALS AND METHODS

Strains, growth conditions, and antimicrobial agents. Wild-type *E. coli* ATCC 25922 was used as the starting strain for all constructions (Table 1). *E. coli* ATCC 25922 (wild-type) and isogenic EC02, EC04, EC08, EC09, and EC59 strains represent progressive degrees of fluoroquinolone resistance, ranging from susceptible to resistant (see Text S1 in the supplemental material for details).

Liquid or solid Luria-Bertani medium (LB), Mueller-Hinton broth (MHB), and M9 minimal medium were used. Strains were grown at 37°C. The following quinolones were used for the different assays: nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, and ofloxacin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

Isogenic strain construction. *lexA1* mutants (coding for a LexA G80D substitution) (46) were obtained by gene replacement, as previously described (Table 1 and see Table S1B in the supplemental material) (31, 47). Disruption of the *recA* gene was carried out with a modified version of the method described by Datsenko and Wanner (48). The *qnrS* gene was cloned into the pBK-CMV vector as described previously (31) (see Text S1 for details).

MICs. MICs were determined in triplicate for each bacterial strain, using two different techniques, broth microdilution and the Etest technique, and following CLSI reference methods (38). Clinical categories were established according to CLSI and EUCAST breakpoints (25, 38).

Time-kill curve assays. To show the effect of suppression of the SOS response on bacterial viability, time-kill assays were performed with each isogenic group based on the SOS system induction status. Mueller-Hinton broth was used with $1\times$ MIC and $4\times$ MIC concentrations of ciprofloxacin. Ciprofloxacin

concentrations were relative to MICs for strains harboring the unmodified SOS system (i.e., with intact *recA* and *lexA* genes). Selected isogenic groups of strains, the EC08 and EC09 groups (bordering on clinical resistance) were also exposed to fixed concentrations of antimicrobial (1 mg/liter, the breakpoint for resistance according to EUCAST, or 2.5 mg/liter, human serum C_{max} for ciprofloxacin) in MHB (25, 49). Growth in drug-free broth was evaluated in parallel as a control. Cultures were incubated at 37°C with shaking at 250 rpm. An initial inoculum of 10^6 CFU/ml was used in all experiments, and bacterial concentrations were determined at 0, 2, 4, 6, 8, and 24 h by colony counting.

Quantification of live/dead bacteria by flow cytometry. The Molecular Probes LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Invitrogen) was used to show the impact of SOS inactivation after a short period of antimicrobial exposure by flow cytometry (Cytomics FC500-MPL; Beckman Coulter) according to the kit instructions.

Cells were exposed at $1 \times$ MIC and $4 \times$ MIC ciprofloxacin concentration of the tested strains harboring a nonmodified SOS system (i.e., intact *recA* and *lexA* genes) or to a fixed concentration (1 mg/liter, the breakpoint for resistance according to EUCAST, or 2.5 mg/liter, the serum C_{max} for ciprofloxacin) (25, 49).

Cells were cultured in the same way and exposed to ciprofloxacin for 60 min. To prepare the cells for measurement, 1 ml of cell culture was washed once in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 1 ml of saline solution, stained according to the kit instructions, and then incubated for 15 min before counting. The following photomultiplier tube (PMT) voltages were used: 420 V for FL1 and 560 V for FL3. At least 10,000 cells per sample were collected. Flow cytometry acquisition was performed at a low flow rate (~ 30 events/s) (35).

Mice. Male immunocompetent C57BL/6 mice were obtained from the University of Seville. The project was approved by the Ethics and Clinical Research Committee of the Virgen Macarena and Virgen del Rocio University Hospitals (reference number 1086-N-15) (see Text S1 for details).

Pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharmacokinetic serum data from our previous work were fitted to a two-compartment model (intraperitoneal space and blood) using ADAPT 5 (50, 51). A range of dosages were simulated in order to obtain a favorable pharmacokinetic parameter of area under the concentration-time curve from 0 to 24 h (AUC_{0-24})/MIC ~ 50 or ~ 100 , adjusted to the SOS-deficient strain in the isogenic pair EC08/EC08recA (strain EC08recA has a ciprofloxacin MIC of 0.5 mg/liter).

Experimental model. Mice weighing 16 to 18 g were used. Using a murine model of peritoneal sepsis, the minimum lethal dose (MLD) for EC08 and EC08recA strains was determined (see Text S1 for details). The murine model was used to evaluate the efficacy of ciprofloxacin between strains EC08 and EC08recA. Mice were infected intraperitoneally using the MLD. Two hours postinfection, antimicrobial therapy started. Animals were randomly assigned to different therapeutic groups as follows: group 1, ciprofloxacin administered intraperitoneally at 50 mg/kg of body weight every 12 h (q12h); group 2, ciprofloxacin administered intraperitoneally at 100 mg/kg q12h; control group, no ciprofloxacin treatment. At 24 h, the bacterial loads in the spleens of 15 mice per strain and ciprofloxacin dosage were determined (see Text S1 for details).

Statistical analysis. For statistical evaluation, the Student's *t* test was used when two groups were compared. The analysis of variance (ANOVA) test and Tukey's posthoc tests were used for group comparisons. Differences were considered significant when *P* values were ≤ 0.05 .

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/mBio.00971-17>.

TEXT S1, DOCX file, 0.04 MB.

FIG S1, PDF file, 0.5 MB.

FIG S2, PDF file, 2 MB.

FIG S3, PDF file, 0.4 MB.

FIG S4, PDF file, 0.6 MB.

FIG S5, PDF file, 0.1 MB.

FIG S6, PDF file, 0.4 MB.

FIG S7, PDF file, 0.3 MB.

FIG S8, PDF file, 1.1 MB.

TABLE S1, DOCX file, 0.02 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (projects PI14/00940 and PI13/00063) and by the Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 and the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), cofinanced by the European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF.

REFERENCES

- Fischbach MA, Walsh CT. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325:1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1176667>.
- Méhi O, Bogos B, Csörgő B, Pál F, Nyerges A, Papp B, Pál C. 2014. Perturbation of iron homeostasis promotes the evolution of antibiotic resistance. *Mol Biol Evol* 31:2793–2804. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu223>.
- Palmer AC, Kishony R. 2013. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 14:243–248. <https://doi.org/10.1038/nrg3351>.
- Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto SM. 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* 40:437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. 2013. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13:1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).
- Hooper DC, Jacoby GA. 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1354:12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>.
- Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2016. Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. *Drug Resist Updat* 29:13–29. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.09.001>.
- Blázquez J, Couce A, Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez-Rojas A. 2012. Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Curr Opin Microbiol* 15:561–569. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.07.007>.
- Culyba MJ, Mo CY, Kohli RM. 2015. Targets for combating the evolution of acquired antibiotic resistance. *Biochemistry* 54:3573–3582. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00109>.
- Baharoglu Z, Mazel D. 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 38:1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>.
- Newmark KG, O'Reilly EK, Pohlhaus JR, Kreuzer KN. 2005. Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene* 356:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.04.029>.
- Strugeon E, Tilloy V, Ploy M-C, Da Re S. 2016. The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *mBio* 7:e00868-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00868-16>.
- Costa SB, Campos ACC, Pereira AC, de Mattos-Guaraldi AL, Júnior RH, Rosa AC, Asad LM. 2014. Adherence to abiotic surface induces SOS response in *Escherichia coli* K-12 strains under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology* 160:1964–1973. <https://doi.org/10.1099/mic.0.075317-0>.
- Gómez-Gómez JM, Manfredi C, Alonso JC, Blázquez J. 2007. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biol* 5:14. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-14>.
- Mo CY, Manning SA, Roggiani M, Culyba MJ, Samuels AN, Sniogowski PD, Goulian M, Kohli RM. 2016. Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics. *mSphere* 1:e00163-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00163-16>.
- Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crécy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE. 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol* 3:e176. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030176>.
- Nautiyal A, Patil KN, Muniyappa K. 2014. Suramin is a potent and selective inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response: RecA as a potential target for antibacterial drug discovery. *J Antimicrob Chemother* 69:1834–1843. <https://doi.org/10.1093/jac/dku080>.
- Sexton JZ, Wigle TJ, He Q, Hughes MA, Smith GR, Singleton SF, Williams AL, Yeh L-A. 2010. Novel inhibitors of *E. coli* RecA ATPase activity. *Curr Chem Genomics* 4:34–42. <https://doi.org/10.2174/1875397301004010034>.
- Bellio P, Brisdelli F, Perilli M, Sabatini A, Bottoni C, Segatore B, Setacci D, Amicosante G, Celenza G. 2014. Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in *Escherichia coli*. *Phytomedicine* 21:430–434. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.10.011>.
- Alam MK, Alhazmi A, DeCoteau JF, Luo Y, Geyer CR. 2016. RecA inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. *Cell Chem Biol* 23:381–391. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.02.010>.
- Baym M, Stone LK, Kishony R. 2016. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science* 351:aad3292. <https://doi.org/10.1126/science.aad3292>.
- Brynildsen MP, Winkler JA, Spina CS, MacDonald IC, Collins JJ. 2013. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nat Biotechnol* 31:160–165. <https://doi.org/10.1038/nbt.2458>.
- Kim S, Lieberman TD, Kishony R. 2014. Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14494–14499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409800111>.
- Roland KL, Little JW. 1990. Reaction of LexA repressor with diisopropyl fluorophosphate. A test of the serine protease model. *J Biol Chem* 265:12828–12835.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2016. Clinical breakpoints and epidemiological cut-off values. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- Cirz RT, Jones MB, Gingles NA, Minogue TD, Jarrahi B, Peterson SN, Romesberg FE. 2007. Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol* 189:531–539. <https://doi.org/10.1128/JB.01464-06>.
- Baharoglu Z, Mazel D. 2011. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multi-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2438–2441. <https://doi.org/10.1128/AAC.01549-10>.
- Cirz RT, Romesberg FE. 2006. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 50:220–225. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.220-225.2006>.
- Baquero F. 2001. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updat* 4:93–105. <https://doi.org/10.1054/drup.2001.0196>.
- Andersson DI, Hughes D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12:465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>.
- Machuca J, Briales A, Labrador G, Díaz-de-Alba P, López-Rojas R, Docobo-Pérez F, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pachón ME, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM. 2014. Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 69:3203–3215. <https://doi.org/10.1093/jac/dku308>.
- Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. 2009. Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem* 9:981–998. <https://doi.org/10.2174/156802609789630947>.
- Erental A, Kalderon Z, Saada A, Smith Y, Engelberg-Kulka H. 2014. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. *mBio* 5:e01426-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01426-14>.
- Zhao X, Hong Y, Drlica K. 2015. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. *J Antimicrob Chemother* 70:639–642. <https://doi.org/10.1093/jac/dku463>.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8:423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>.
- Thi TD, López E, Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Guelfo JR, Castañeda-García A, Blázquez J. 2011. Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother* 66:531–538. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq496>.
- Da Re S, Garnier F, Guérin E, Campoy S, Denis F, Ploy M-C. 2009. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep* 10:929–933. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.99>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-sixth informational supplement M100-S26. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Tamae C, Liu A, Kim K, Sitz D, Hong J, Becket E, Bui A, Solaimani P, Tran

- KP, Yang H, Miller JH. 2008. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190:5981–5988. <https://doi.org/10.1128/JB.01982-07>.
40. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo MC, Pascual A. 2008. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 61:1240–1243. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn115>.
41. Craig WA. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 26:1–10. <https://doi.org/10.1086/516284>.
42. Schentag JJ, Meagher AK, Forrest A. 2003. Fluoroquinolone AUC break points and the link to bacterial killing rates. Part 2: human trials. *Ann Pharmacother* 37:1478–1488. <https://doi.org/10.1345/aph.1C419>.
43. Schentag JJ. 2000. Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. *Clin Infect Dis* 31(Suppl 2):S40–S44. <https://doi.org/10.1086/314059>.
44. Wright DH, Brown GH, Peterson ML, Rotschafer JC. 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother* 46:669–683. <https://doi.org/10.1093/jac/46.5.669>.
45. Lu TK, Collins JJ. 2009. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4629–4634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>.
46. Elez M, Radman M, Matic I. 2007. The frequency and structure of recombinant products is determined by the cellular level of MutL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8935–8940. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610149104>.
47. Pósfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, Blattner FR. 1999. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res* 27:4409–4415. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4409>.
48. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
49. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. 2015. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 8th ed, p 427. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.
50. Domínguez-Herrera J, Velasco C, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Martínez JM, López-Rojas R, Briales A, Pichardo C, Díaz-de-Alba P, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Pachón J. 2013. Impact of *qnrA1*, *qnrB1* and *qnrS1* on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by *Escherichia coli* with or without the *GyrA* mutation Ser83Leu. *J Antimicrob Chemother* 68:1609–1615. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt063>.
51. D'Argenio DZ, Schumitzky A, Wang X. 2009. ADAPT 5 user's guide: pharmacokinetic/pharmacodynamic systems analysis software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, CA.

Artículo 2: La supresión de la respuesta SOS modifica la evolución espaciotemporal, el efecto post-antibiótico, el *fitness* bacteriano y la producción de *biofilm* en cepas de *Escherichia coli* resistentes a quinolonas

Resumen de resultados

En este segundo artículo, evaluamos la respuesta SOS como estrategia terapéutica para bloquear o revertir el desarrollo hacia la resistencia antibiótica. Se utilizó la misma colección de cepas isogénicas de *E. coli* que en el trabajo anterior, con distinto espectro de actividad SOS y diferentes mecanismos de resistencia a quinolonas (Tabla S1). Además del estudio de la evolución espaciotemporal hacia la resistencia de las cepas en función de su actividad SOS y resistencia a quinolonas, se analizaron distintos parámetros biológicos relevantes.

La supresión de la respuesta SOS reduce la emergencia de mutantes de *E. coli* con fenotipo de bajo nivel de resistencia a quinolonas

Para evaluar el papel de la respuesta SOS en la emergencia de mutantes resistentes, se seleccionaron los grupos isogénicos ATCC, EC02, EC04, EC08 y EC09, que se sembraron a concentraciones de ciprofloxacino por encima de su valor de CMI (Tabla 1). A 1 mg/L de ciprofloxacino, no se detectaron mutantes para los grupos ATCC y EC02. Sin embargo, EC04 con fenotipo salvaje, mostró una tasa de mutación de 2×10^{-5} y un descenso de unas 10 veces fue observado para EC04lexA1, sin recuperación de mutantes para EC04recA. A 2,5 mg/L de ciprofloxacino, el grupo EC04 no produjo mutantes. EC08 con fenotipo salvaje mostró una tasa de mutación de 5×10^{-5} , pero ningún mutante fue detectado en su homólogo deficiente en RecA. En el caso del grupo EC09, las tasas de mutación fueron de 3×10^{-6} y 4×10^{-4} para las cepas con la respuesta SOS alterada ($\Delta recA/LexA1$), respectivamente. A 4xCMI de ciprofloxacino (valor de CMI referido a a la cepa con la respuesta SOS intacta), la inactivación de la respuesta SOS (mediada por LexA1) produjo un descenso de 10^1 - 10^2 veces en la tasa de mutación, para las cepas ATCC, EC04 y EC09,

por contra, ningún mutante fue recuperado en las cepas deficientes en RecA (Tabla 1).

La supresión de la respuesta SOS reduce la concentración preventiva de mutantes (CPM) de cepas de *E. coli* con bajo nivel de resistencia a quinolonas

Los grupos isogénicos ATCC, EC02, EC04 y EC08 con modificaciones en la respuesta SOS (delección de *recA* o LexA1) y valores de CMI de ciprofloxacino de entre 0,004 mg/L y 2 mg/L fueron seleccionados para el estudio de la CPM. En todos los grupos, la modificación de la respuesta SOS ($\Delta recA/LexA1$) ocasionó un descenso de la CPM de ciprofloxacino de 8 y 2 veces, respectivamente, con respecto a las cepas parentales (Tabla 1). Concretamente, en los grupos EC02 (4 mg/L) y EC04 (8 mg/L) tras la delección de *recA* se alcanzaron CPM de 0,5 y 1 mg/L, respectivamente; ambas, por debajo de la concentración máxima alcanzada en suero (2,5 mg/L).

La supresión de la respuesta SOS retrasa la evolución microbiana espaciotemporal

Los ensayos en placa de gradiente permitieron estudiar la evolución hacia la resistencia de las cepas con bajo nivel de resistencia a quinolonas y con distinta funcionalidad de la respuesta SOS (SOS intacto-*recA*). A pesar de que se desarrollaron múltiples linajes en cepas con distinta actividad SOS, el número de linajes y la progresión hacia la resistencia fue mucho más evidente en las cepas con una respuesta SOS intacta. Este retraso en el desarrollo de mutantes tiene especial importancia a concentraciones clínicamente relevantes para cepas con bajo nivel de resistencia a quinolonas (EC02, EC04 y EC08) (Figura S1).

La supresión de la respuesta SOS modifica el *fitness* bacteriano en cepas de *E. coli* de bajo nivel de resistencia a quinolonas

Con el objetivo de cuantificar el *fitness* asociado a las mutaciones que confieren resistencia y la supresión de la respuesta SOS, se llevaron a cabo ensayos de competición entre las cepas delecionadas en *recA* y su correspondiente cepa parental. En ausencia

de ciprofloxacino, se registró un descenso de *fitness* de 19-28%, en relación a la cepa con fenotipo salvaje, alcanzando el descenso máximo la cepa EC59 (Figura 1A). A 0,5x CMI de ciprofloxacino (valor de CMI referido a la cepa con la respuesta SOS intacta) se registró una mayor caída de *fitness* (33-50%) que en el grupo no inducido, alcanzando el descenso máximo la cepa EC09 (Figura 1B). A 0,002 mg/L de ciprofloxacino (concentración ambiental) y para los grupos seleccionadas (ATCC, EC02 y EC04) se obtuvo un descenso de *fitness* de 81, 30 y 28%, respectivamente (Figura 1C). No hubo correlación entre *fitness* y nivel de resistencia a quinolonas.

La supresión de la respuesta SOS incrementa el efecto post-antibiótico (EPA) *in vitro* en cepas de *E. coli* con fenotipo salvaje y con bajo nivel de resistencia a quinolonas

Se seleccionaron los grupos ATCC, EC02, EC04 y EC08 para la determinación del EPA tras 2 h de exposición al antimicrobiano. El EPA a 1 y 2,5 mg/L de ciprofloxacino, fue de más de 6 h en la cepa de *E. coli* ATCCrecA comparado a la duración del efecto para la cepa con fenotipo salvaje que fue de 2 h. Para el resto de grupos isogénicos, con bajo nivel de resistencia a quinolonas, la duración del EPA fue de unas 3 h más en las cepas con la respuesta SOS suprimida (Figura 2).

El efecto de la supresión de la respuesta SOS en la producción de *biofilm* a concentraciones subinhibitorias

La formación de *biofilm* fue evaluada en todas las cepas de la colección tras tratamiento con 1/16xCMI de ciprofloxacino (valor de CMI referido a la cepa con fenotipo salvaje). Se observó un descenso en torno a un 22-80% en las cepas con *recA* delecionado. Los mutantes LexA1 tuvieron un menor efecto en la producción de *biofilm* en comparación con aquellos deficientes en RecA, bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 3).

Suppression of the SOS response modifies spatiotemporal evolution, post-antibiotic effect, bacterial fitness and biofilm formation in quinolone-resistant *Escherichia coli*

E. Recacha^{1†}, J. Machuca^{1†}, S. Díaz-Díaz^{2–4}, A. García-Duque¹, M. Ramos-Guelfo¹, F. Docobo-Pérez^{2–4}, J. Blázquez⁵, A. Pascual^{1–4‡} and J. M. Rodríguez-Martínez^{1‡}

¹Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain; ²Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Seville, Spain; ³Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁴Instituto de Biomedicina de Sevilla IBIS, Hospital Universitario Virgen Macarena/CSIC/Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain; ⁵Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

*Corresponding author. Department of Microbiology, University of Seville, Avda Sanchez Pizjuan s/n, Seville, 41009 Spain. Tel: +34 954 55 28 63; Fax: +34 954 37 74 13; E-mail: jmrodriguez@us.es orcid.org/0000-0002-2228-2294

†These authors made an equal contribution.

‡These authors made an equal contribution.

Received 15 May 2018; returned 18 June 2018; revised 6 September 2018; accepted 10 September 2018

Background: Suppression of the SOS response has been proposed as a therapeutic strategy for potentiating quinolones against susceptible, low-level quinolone-resistant (LLQR) and resistant Enterobacteriaceae.

Objectives: To monitor the functionality of the SOS response in the evolution towards clinical quinolone resistance and study its impact on the evolution of spatiotemporal resistance.

Methods: An isogenic collection of *Escherichia coli* (derived from the strain ATCC 25922) carrying combinations of chromosomally and plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms (including susceptible, LLQR and resistant phenotypes) and exhibiting a spectrum of SOS activity was used. Relevant clinical parameters such as mutation rate, mutant prevention concentration (MPC), bacterial fitness, biofilm formation and post-antibiotic effect (PAE) were evaluated.

Results: Inactivating the SOS response (*recA* deletion) led to a decrease in mutation rate (~10³ fold) in LLQR compared with WT strains at ciprofloxacin concentrations of 1 mg/L (the EUCAST breakpoint for resistance) and 2.5 mg/L (*C*_{max}), as well as a remarkable delay in the spatiotemporal evolution of quinolone resistance. For all strains, there was an 8-fold decrease in MPC in *RecA*-deficient strains, with values for LLQR strains decreasing below the *C*_{max} of ciprofloxacin. Inactivation of the SOS response reduced competitive fitness by 33%–50%, biofilm production by 22%–80% and increased the PAE by ~3–4 h at sub-MIC concentrations of ciprofloxacin.

Conclusions: Our data indicate that suppression of the SOS response affects key bacterial traits and is a promising strategy for reversing and tackling the evolution of antibiotic resistance in *E. coli*, including low-level and resistant phenotypes at therapeutic quinolone concentrations.

Introduction

Most efforts in the fight against antimicrobial resistance have focused on modifying existing antibiotics by circumventing the molecular mechanisms that confer resistance.¹ However, new strategies are needed to block and reverse the development of clinical resistance and extend the life of antibiotics. Antibiotic therapy can facilitate adaptive resistance mutations and the acquisition of resistance genes by promoting the activation of *RecA*

(initiating the SOS response involving the DNA repair and mutagenesis pathways).^{2–4} Fluoroquinolones are potent inducers of the SOS response at both lethal and sub-lethal concentrations, causing DNA damage or arresting replication forks by blocking type II topoisomerases.^{2,4,5} The SOS response is induced after *RecA* activation, which triggers self-cleavage of the LexA repressor.^{2,4} Moreover, *RecA* is a multifunctional protein involved in DNA repair, recombination, induction of the SOS response, horizontal gene transfer, motility and biofilm formation.^{4,6–8}

Enterobacteriaceae such as *Escherichia coli* are among the most common causes of community-acquired and nosocomial infections. Fluoroquinolones are used for empirical and directed therapy in infections caused by *E. coli*.⁹ Quinolone resistance in both human and veterinary isolates of Enterobacteriaceae has increased notably.^{10,11} The mechanisms of fluoroquinolone resistance mainly involve chromosomal mutations in genes encoding quinolone targets (type II topoisomerases), but also involve reduced permeability.¹¹ Plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms are also epidemiologically relevant.¹² These determinants on their own confer low-level quinolone resistance (LLQR), and therefore multiple mechanisms must be combined to achieve clinical resistance.¹²

Suppression of the SOS response was recently revealed as a therapeutic strategy for potentiating bactericidal antibiotics such as quinolones against both susceptible and resistant *E. coli*, leading to their resensitization to drugs such as quinolones.^{13,14} Several compounds have been validated for the inhibition of RecA activity *in vitro* and *in vivo*, leading to increased antimicrobial activity.^{15,16}

Although targeting the SOS response seems a promising strategy for developing therapeutics to enhance the bactericidal activity of antimicrobial agents, significant questions remain unanswered regarding the possible impact of this approach as an evolutionary strategy for reversing and tackling the evolution of antibiotic resistance.^{17,18} To address this question, we used a collection of isogenic *E. coli* mutants (Table S1,¹⁴ available as [Supplementary data](#) at JAC Online) exhibiting a spectrum of SOS activity, from a natural SOS response to hypoinducible (LexA1, with very low cleavage rate)¹⁹ and constitutively suppressed responses (*ΔrecA*), also carrying combinations of chromosomally and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) mechanisms (including susceptible, LLQR and resistant phenotypes). The impact of suppression of the SOS response on the spatiotemporal evolution of resistance and other relevant biological parameters, such as bacterial fitness, biofilm formation and post-antibiotic effects (PAEs), under therapeutic concentrations was investigated.

Materials and methods

Strains, growth conditions and antimicrobial agents

Sixteen isogenic *E. coli* strains were used (based on WT *E. coli* ATCC 25922) harbouring chromosomally mediated and/or plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms combined with *recA* deletion and/or *lexA* replacement by *lexA1*¹⁴ (see Table S1).

Liquid or solid LB medium and Mueller–Hinton broth (MHB) were used. Strains were grown at 37°C. Ciprofloxacin was used for the different assays (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Kanamycin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 30 mg/L was used for plasmid maintenance. The *qnrS* gene was cloned into the pBK-CMV vector as described previously.²⁰ Expression of ciprofloxacin-induced GFP in the kanamycin-resistant pMSrecA-gfp vector was used to detect *recA* promoter activity (SOS induction).²¹

Determination of mutation rate

Overnight cultures of *E. coli* were diluted 1:10000 and incubated for 16 h in the absence of ciprofloxacin. The mutation rate was determined by spreading an overnight culture of viable microorganisms (100 μL) from 5 mL cultures on LB agar plates, with and without ciprofloxacin (with 4×MIC as the selective concentration). Ciprofloxacin concentrations were relative to MICs for strains harbouring the unmodified SOS response (i.e. with intact *recA*

and *lexA* genes). Selected isogenic groups were also exposed to fixed selective concentrations of ciprofloxacin: 1 mg/L for the ATCC, EC02 and EC04 groups (CLSI breakpoint for resistance)²² and 2.5 mg/L for the EC04, EC08 and EC09 groups [peak serum ciprofloxacin concentrations (C_{max})].²³ These concentrations allow selection of different types of mutants. The colony count was determined after 48 h at 37°C in three independent assays. The colony counts from the three replicates were then used in the MSS maximum-likelihood method using the FALCOR web site (<http://www.mito.chondria.org/protocols/FALCOR.html>)²⁴ to estimate the number of mutational events per culture.

Mutant prevention concentration (MPC) determination

MPCs were determined as previously described by Marcusson *et al.*²⁵ The MPC was recorded as the lowest quinolone concentration at which no colonies grew on an agar plate. The MPC for each strain was determined in at least two independent experiments.

Agar gradient plate experiments

A key aspect of bacterial survival is the ability to evolve while migrating across spatially varying environmental challenges.²⁶ Gradient plate assays (120.5 mm) were used to evaluate microbial evolution as a function of the SOS response available. Several maximum concentrations of ciprofloxacin were used: 1 and 2.5 mg/L, and 1× or 4×MIC (relative to the WT SOS response). BM2 swarming medium was used²⁷ (see [Supplementary Methods](#)). The plates were incubated for a maximum of 240 h.²⁸

Whole genome sequencing

Genomic DNA from 29 evolved mutants (obtained from the zone separating growth and non-growth) and their respective parental strains was extracted and sequenced using MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Raw reads were quality filtered and assembled into contigs using the CLC genomics workbench 9.5.2. (CLC bio, QIAGEN) and analysed (see [Supplementary Methods](#)).

Growth competition assays

E. coli ATCC 25922, EC02, EC04, EC08 and EC09 were used as standard reference strains against derived *ΔrecA* (kanamycin-resistant) mutants. EC59 *ΔlacZ* was tested against EC59 *ΔrecA* (*ΔlacZ* mutation is neutral).²⁰ Fitness cost was determined as previously described by Marcusson *et al.*²⁵ (see [Supplementary Methods](#)). A relative fitness (RF) score >1 indicated that the mutant strain had a selective advantage over the control strain, whereas a score <1 represented a fitness cost. Competition assays were also carried out at 0.5×MIC of ciprofloxacin. Ciprofloxacin concentrations were relative to MICs for strains harbouring the modified SOS response (*recA* deleted). The ATCC, EC02 and EC04 groups were also exposed to environmental concentrations of ciprofloxacin (0.002 mg/L).²⁹ Each competition assay was tested in at least six independent experiments.

Determination of the PAE of ciprofloxacin

ATCC, EC02, EC04 and EC08 groups were selected to show the impact of suppression of the SOS response on the PAE *in vitro* by exposing the bacteria (10⁷ cfu/mL) to fixed concentrations of 1 and 2.5 mg/L of ciprofloxacin for 2 h. The antibiotic was removed from the culture by three centrifugations, and the bacteria were resuspended in fresh MHB. The antibiotic-free bacterial suspension was then incubated at 37°C and shaken. After removal of the drug, viable counts were performed hourly for the next 6 h and at 24 h. A growth control, prepared and treated in a similar way to the test solution but without being exposed to antibiotics, was included in each experiment. The PAE was calculated as previously described.³⁰

Table 1. Susceptibility (MICs and clinical category), mutation rates, mutant prevention concentration (MPC), time to emergence of mutants and mutant selection window (MSW) values of ciprofloxacin

| Strain | CIP MIC (mg/L) | CC (CLSI/EUCAST) ^a | Mutation rates (mutations/generation) | | | MPC (mg/L) | Time to emergence of mutants (h) | MSW (MPC/MIC) |
|--------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|------------|----------------------------------|---------------|
| | | | CIP 1 mg/L | CIP 2.5 mg/L | CIP 4×MIC | | | |
| ATCC 25922 | 0.004 | S/S | $<3 \times 10^{-8}$ | ND | 2×10^{-7} | 1 | 48 | 256 |
| ATCC Δ recA | 0.001 | S/S | $<2 \times 10^{-7}$ | ND | $<3 \times 10^{-9}$ | 0.125 | 48 | 128 |
| ATCC lexA1 | 0.002 | S/S | $<2 \times 10^{-7}$ | ND | 2×10^{-9} | 0.5 | 24 | 256 |
| EC02 | 0.06 | S/S | $<2 \times 10^{-8}$ | ND | 3×10^{-6} | 4 | 24 | 64 |
| EC02 Δ recA | 0.008 | S/S | $<5 \times 10^{-7}$ | ND | $<3 \times 10^{-9}$ | 0.5 | 48 | 64 |
| EC04 | 0.5 | S/S | 2×10^{-5} | $<2 \times 10^{-8}$ | 3×10^{-6} | 8 | 24 | 16 |
| EC04 Δ recA | 0.125 | S/S | $<5 \times 10^{-8}$ | $<10^{-8}$ | $<2 \times 10^{-9}$ | 1 | 24 | 8 |
| EC04 lexA1 | 0.5 | S/S | 3×10^{-6} | $<2 \times 10^{-8}$ | 8×10^{-8} | 4 | 24 | 8 |
| EC08 | 2 | I/R | ND | 5×10^{-5} | 4×10^{-8} | 64 | 48 | 32 |
| EC08 Δ recA | 0.5 | S/S | ND | $<2 \times 10^{-8}$ | $<2 \times 10^{-9}$ | 8 | 24 | 16 |
| EC09 | 4 | R/R | ND | ND | 6×10^{-7} | ND | ND | ND |
| EC09 Δ recA | 1 | S/I | ND | 3×10^{-6} | $<2 \times 10^{-9}$ | ND | ND | ND |
| EC09 lexA1 | 2 | I/R | ND | 4×10^{-4} | 2×10^{-8} | ND | ND | ND |

Mutation rate data correspond to the analysis of at least three independent cultures. Ciprofloxacin concentrations indicated for mutation rate assays were used as selective concentrations. Subgroups with clinical category changes are indicated in bold. CIP, ciprofloxacin; ND, not determined.

^aCC (CLSI/EUCAST) refers to clinical categories according to CLSI or EUCAST breakpoints.^{22,44}

Biofilm production

Biofilm production was assessed by a previously described spectrophotometric method³¹ (see [Supplementary Methods](#)). Sub-MIC concentrations of ciprofloxacin (1/16×MIC for each of the respective SOS WT strains) were evaluated.

Statistical analysis

For statistical evaluation, Student's *t*-test was used when two groups were compared. Differences were considered significant when *P* values were ≤ 0.05 .

Results

Suppression of the SOS response reduces emergence of mutants in LLQR *E. coli*

Five isogenic *E. coli* strains were used that harbour the most frequent chromosomal mutations associated with fluoroquinolone resistance in the *gyrA* and/or *parC* genes and/or a deletion in the *marR* gene combined with the PMQR mechanism (*qnrS*) (ranging from WT high susceptibility to a high level of resistance). In order to evaluate the impact of the SOS response on the emergence of mutants in LLQR *E. coli*, the SOS response was suppressed in all strains by means of *recA* deletion or replacement of *lexA* by *lexA1* (Table S1). MICs were in the range 0.004–4 mg/L. (Table 1)

To evaluate the role of the SOS response in the emergence of resistant mutants, selected strains were exposed to different selective concentrations of ciprofloxacin above the MIC (see Table 1). At a fixed concentration of 1 mg/L ciprofloxacin, no mutants were obtained for the ATCC and EC02 groups. The EC04 WT strain displayed a mutation rate of 2×10^{-5} , and strains with modified SOS response (*LexA1*/ Δ *recA*) showed a decrease in mutation rate of ~10-fold and no mutants, respectively. At 2.5 mg/L ciprofloxacin,

the EC04 group produced no mutants. The WT strain EC08 showed a mutation rate of 5×10^{-5} , which compared with undetectable levels of mutants in its isogenic *RecA*-deficient counterpart. Mutation rates for strains belonging to the EC09 group with modified SOS response (Δ *recA*/*LexA1*) were 3×10^{-6} and 4×10^{-4} , respectively. At 4×MIC, inactivation of the SOS response (mediated by *LexA1*) produced a 10- to 100-fold decrease in mutation rate for ATCC, EC04 and EC09, although interestingly no mutants grew from *RecA*-deficient strains under these conditions in any group (Table 1). EC59 data are not included due to its high level of resistance.

These results indicate that suppression of the SOS response hampers acquired ciprofloxacin resistance in LLQR *E. coli* and has a major effect on Δ *recA* mutants (SOS inactivation) compared with *LexA1* mutants (SOS hypoactivation).

Suppression of SOS response reduces MPCs of quinolone for LLQR *E. coli*

The ATCC, EC02, EC04 and EC08 groups carrying modifications in the SOS response (*recA* deletion or *LexA1*) were used to study MPC parameters. Ciprofloxacin MICs ranged between 0.004 and 2 mg/L, from WT highly susceptible to intermediately susceptible (according to CLSI guidelines²²). The ciprofloxacin MPC values for all isogenic strains with *recA* deletion or *LexA1* were 8- and 2-fold lower, respectively, than for the WT strain (Table 1). An 8-fold decrease for EC02 and EC04 (*recA* deletion strains) relative to WT reduced MPC values of ciprofloxacin to 0.5 and 1 mg/L, respectively. These concentrations are below the maximum serum concentrations (2.5 mg/L).

Although the mutant selection window (MSW) was wider for WT *E. coli* ATCC 25922 (256) than for the strains with modifications in the *gyrA* and *parC* genes (16–64), absolute MPC values in these

strains were clearly higher than those of the WT strains. Suppression of the SOS response mediated by *recA* deletion affected the MSW, which was narrower for ATCC (256 versus 128), EC04 (16 versus 8) and EC08 (32 versus 16) and equal for EC02 (64), compared with the parental strain. Modification of the SOS response with LexA1 also produced changes in the MSW. It was narrower for EC04 (16 versus 8) and equal for ATCC (256). Although the plates were incubated for up to 96 h, 24–48 h was sufficient to show colony growth (Table 1).

Suppression of SOS response delays spatiotemporal microbial evolution

Using the agar gradient plate experiments, we demonstrated a notable delay in the spatiotemporal evolution of quinolone resistance in accordance with the SOS response (*recA* deletion) in isogenic LLQR (EC02, EC04, EC08) *E. coli* strains harbouring several molecular resistance mechanisms (Figure S1). Although multiple lineages evolved towards resistance in both WT strains and those with a deficient SOS response, the number of lineages and the progression towards higher levels of resistance was much more evident in the presence of a functional SOS response. This is especially relevant in LLQR phenotypes at clinically relevant concentrations of quinolones (Figure S1C and D). Regardless of SOS response functionality, adjacent mutant lineages exclude each other and compete for limited space, resulting in some lineages completely blocking the growth of others (Figure S1).

The twenty-nine evolved mutants obtained in these assays were subjected to whole-genome sequencing. No differences (associated with type of quinolone resistance mutation) were found depending on the functionality of the SOS response. No new modifications of the topoisomerase genes were identified. Some of these mutants showed modifications in the redox-sensitive transcription activator, SoxR (G121D), DNA repair proteins such as RecQ (V536L+A539S) or UvrD (R421P), the cell division protein, FtsA (E203G), and the regulator of outer membrane proteins, EnvZ (P248Q).

Suppression of SOS response modifies bacterial fitness in LLQR *E. coli*

The six mutants harbouring *recA* deletions were tested against their respective WT in growth competition assays to measure the fitness costs associated with the resistance mutations carried and suppression of the SOS response. For every pair of strains tested, *recA* deletion produced alterations in fitness, which varied in magnitude depending on the presence/absence of the antibiotic, and there was no correlation between fitness and the level of quinolone resistance (Figure 1a). In the absence of ciprofloxacin, there was a decreased fitness of 19%–28% relative to the WT, with the greatest decrease in the EC59 strain. In the presence of DNA-damaging antibiotics, two concentrations of ciprofloxacin were studied. At 0.5×MIC of ciprofloxacin (the MIC value refers to the RecA-deficient strain), there was a bigger drop in fitness (by 33%–50%) than in the non-induced group, with the greatest loss of fitness being for EC09 (Figure 1b). The ATCC, EC02 and EC04 groups were selected for treatment with a fixed concentration of ciprofloxacin of 0.002 mg/L (equivalent to the concentration of

ciprofloxacin found in environmental wastewater²⁹) and showed decreased fitness of 81%, 30% and 28%, respectively (Figure 1c).

Suppression of SOS response increases *in vitro* PAE in both WT and LLQR *E. coli*

In vitro PAE was determined to evaluate the impact of suppression of the SOS response after exposure to fixed ciprofloxacin concentrations (1 mg/L, i.e. the CLSI breakpoint for resistance,²² and 2.5 mg/L, i.e. the C_{max} of ciprofloxacin²³), as well as the time needed for recovery after antimicrobial stress. After 2 h exposure, the *in vitro* PAE of ciprofloxacin at 1 and 2.5 mg/L was >6 h against *recA*-deficient *E. coli* ATCC 25922 compared with 2 h against WT *E. coli* ATCC 25922 (Figure 2). Likewise, for the LLQR phenotypes EC02, EC04 and EC08, at these clinically significant concentrations of ciprofloxacin, the PAE was observed to be ~3 h longer in the isogenic strains with the deficient SOS response (Figure 2).

Effect of suppression of SOS response on biofilm formation under subinhibitory concentrations

Figure 3 shows the relative biofilm production in M9 minimal medium at sub-MIC concentrations of ciprofloxacin (1/16×MIC relative to the MIC of SOS WT). A reduction of ~22%–80% was observed when *recA* was deleted. Absorbance values were ~0.546–0.438 for the WT strains, whereas those for their isogenic *recA*-deficient counterparts were ~0.410–0.105 (threshold value indicative of biofilm production: 0.08). LexA1 mutants had a minor effect on biofilm formation compared with *recA* deletion under the same conditions.

Discussion

The SOS response plays an important role in adaptation and acquired bacterial resistance to antibiotics, and has been proposed as an attractive target for increasing bacterial susceptibility to antibiotics and combating the emergence of resistance.^{17–19,32} Low-level resistance phenotypes, such as LLQR (which can be exposed to sub-lethal levels of antibiotics during antimicrobial treatment), pose a significant threat of the development of clinical resistance.^{18,19,32} Apart from the effect that the suppression of the SOS response has in enhancing the bactericidal activity of antimicrobial agents such as quinolones, significant questions remain unanswered about the possible impact of SOS response suppression as an evolutionary strategy for reversing and tackling the evolution of antibiotic resistance.^{17,18} In this study, we determined the efficacy of SOS response suppression as a strategy for disrupting the spatiotemporal evolution of resistance and other important clinical parameters such as bacterial fitness, biofilm formation and PAE under therapeutic concentrations using an isogenic collection with an altered SOS response (Table S1¹⁴) in combination with chromosomal and PMQR mechanisms (including susceptible, LLQR and resistant phenotypes).

Our study showed that targeting the SOS pathways in LLQR phenotypes at clinically significant concentrations slowed down mutagenesis and blocked the acquisition of resistance (Table 1 and Figure S1). For RecA-deficient strains, a huge drop in the mutation rate was observed in those harbouring mechanisms of quinolone resistance (ranging from susceptible, intermediate

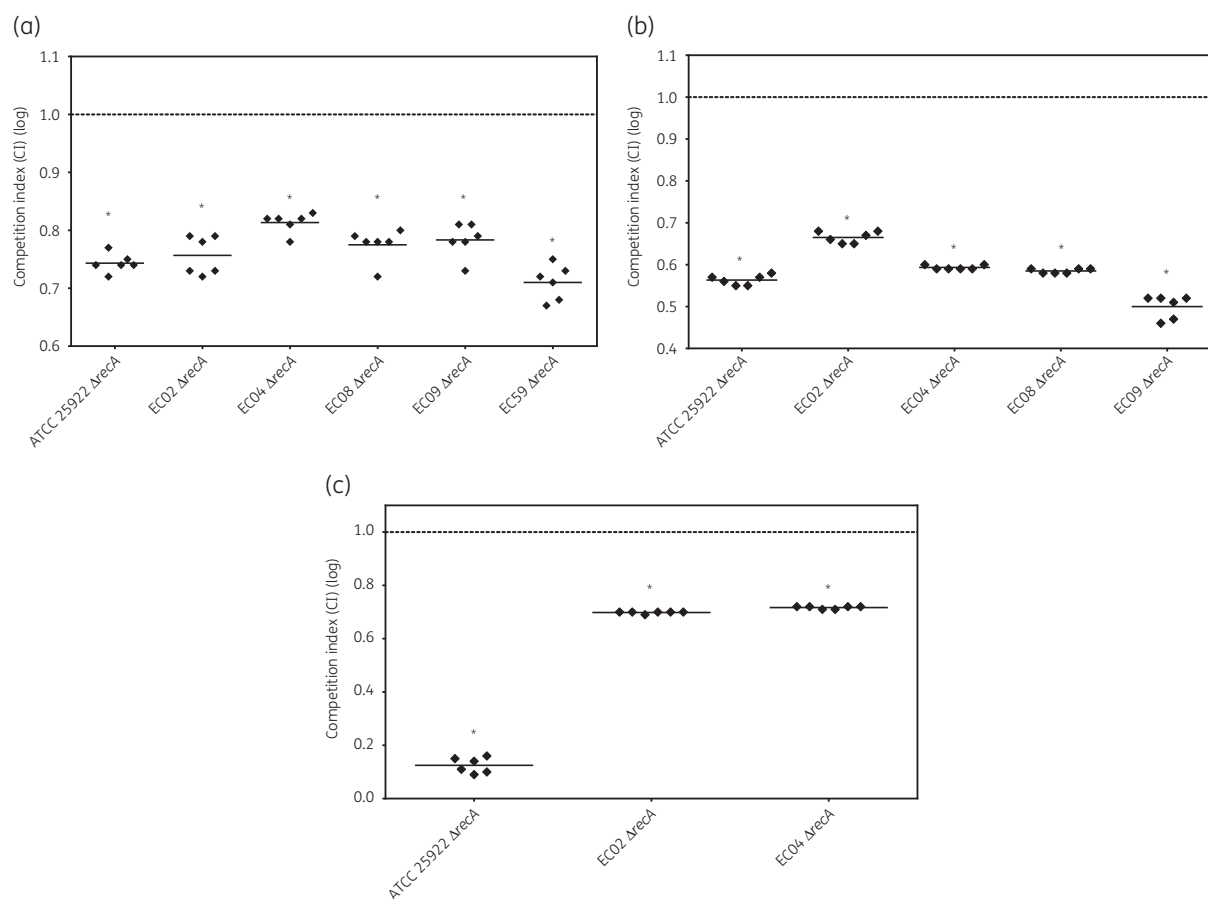


Figure 1. Bacterial fitness in *in vitro* competition assays for ATCC, EC02, EC04, EC08, EC09 and EC59 *recA* mutants compared with WT strains studied in the absence of ciprofloxacin (a), at 0.5×MIC for the *recA* mutant (b), and with 0.002 mg/L of ciprofloxacin (c).²⁹ Competition index values from each independent experiment are plotted. The broken horizontal line indicates a competition index value of 1, and means are indicated by short continuous horizontal lines. Significant *P* values compared with the respective WT for SOS response are noted: **P* < 0.001.

susceptible to low-level resistant) at 4×MIC of ciprofloxacin, from which it was concluded that suppression of the SOS response mediated by *recA* deletion interferes with the ability of bacteria to evolve to higher resistance levels independently of the quinolone resistance phenotype. This behaviour was similar at clinically relevant concentrations of ciprofloxacin for LLQR phenotypes, supporting the ability of this strategy to tackle the emergence of resistance. For the EC08 group, at ciprofloxacin C_{max} (2.5 mg/L), suppression of the SOS response reduced the mutation rate >10³-fold, preventing the emergence of mutations. These results correlated well with a recently published *in vivo* murine model, in which the EC08 group was used to show that suppression of the SOS response increased the *in vivo* efficacy of ciprofloxacin.¹⁴ On the other hand, a hypoactive SOS response based on LexA1 resulted in a minor reduction of the mutation rate relative to *recA*-deleted strains. Furthermore, we showed that suppression of the SOS response based on *recA* deletion reduced quinolone MPC values in LLQR *E. coli* (groups EC02 and EC04, Table 1) below the maximum serum concentration of ciprofloxacin (2.5 mg/L²³). Hence,

suppression of the SOS response reverses the effects of low-level quinolone resistance mechanisms, such as S83L and S80R on GyrA and ParC, on the MPC value and the emergence of mutants.^{20,33}

RecA and LexA have been proposed as therapeutic targets that interfere with SOS induction.^{15,16,34–37} Our results suggest that the effects of SOS response suppression ($\Delta recA$ and LexA1) largely mimic each other in terms of synergy and acquired resistance, even in low-level resistance phenotypes, although a greater degree of susceptibility and control of emergence of resistance can be observed with the $\Delta recA$ strain.^{13,14} Our data suggest that targeting either RecA or LexA could be of interest, although it is worth noting that each probably presents its own challenges. RecA, unlike LexA, has important human homologues (i.e. the Rad51 family), which makes specificity a particularly important requirement for targeting RecA; indeed, some high-throughput screening efforts have yielded compounds that selectively target RecA or Rad51.^{13,33} Furthermore, *recA* deletion has an impact other than leading to suppression of the SOS response, since it has additional implications for important processes such as homologous

Recacha et al.

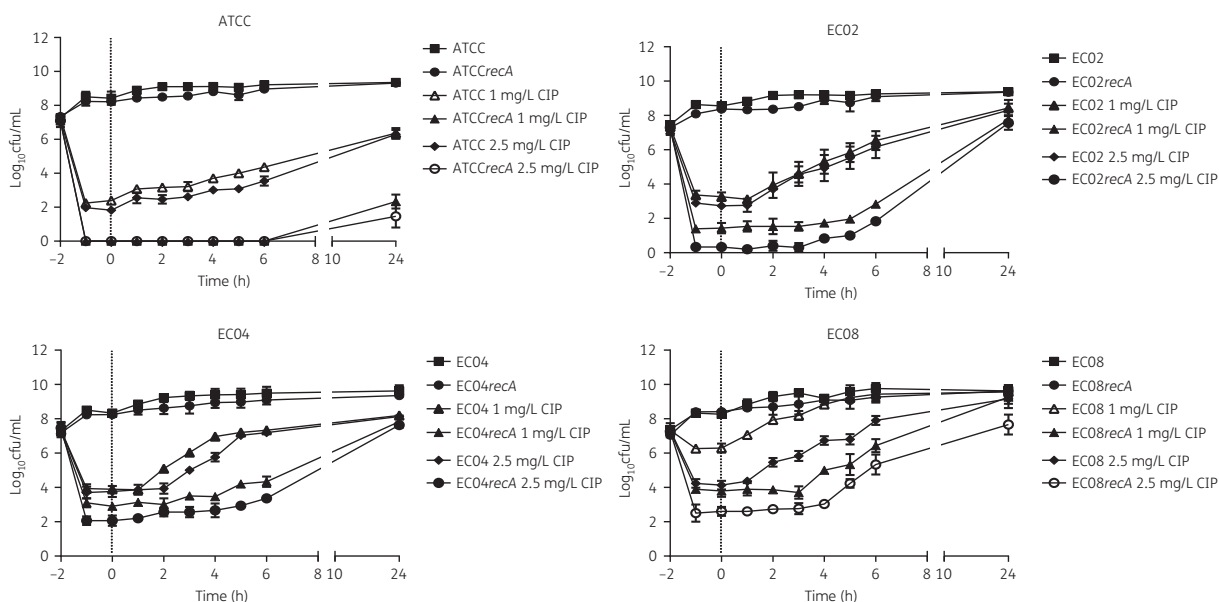


Figure 2. PAE of ciprofloxacin against ATCC, EC02, EC04 and EC08 *recA* mutants and their respective WT strains after 2 h of exposure to 1 or 2.5 mg/L of drug. A vertical line indicates the beginning of the time after exposure to the antibiotic.

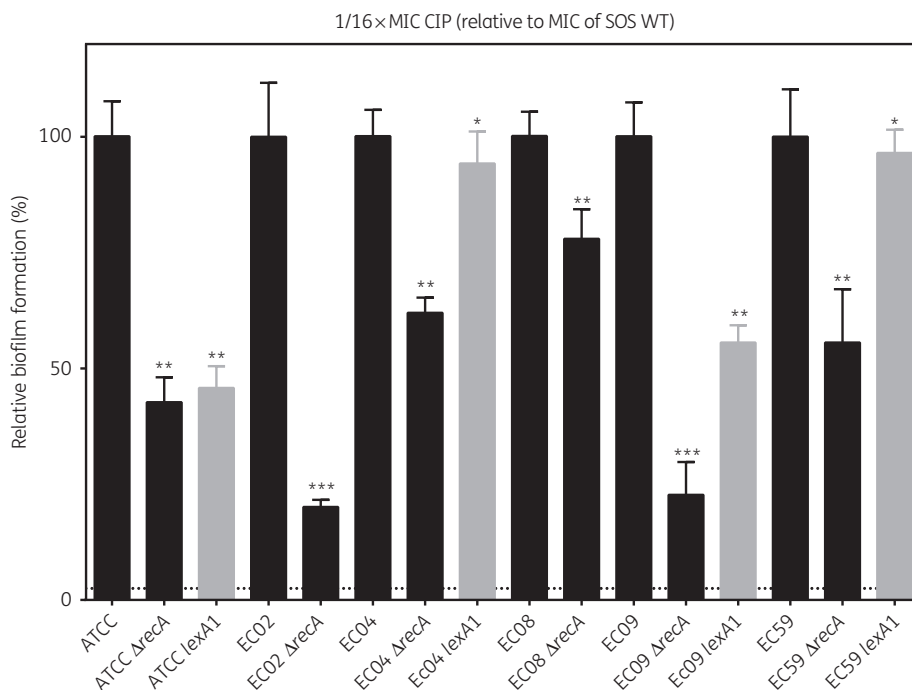


Figure 3. Biofilm production by ATCC, EC02, EC04, EC08, EC09 and EC59 and their respective mutants with defective SOS response ($\Delta recA$ or LexA1) at $1/16 \times MIC$ of ciprofloxacin (relative to the MIC of SOS WT). In each group, data are expressed as percentages relative to the SOS WT. Significant *P* values compared with the respective WT for SOS response are noted: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/dky407/5133291 by guest on 17 October 2018

recombination.³⁸ It is unknown if the SOS response suppression could interfere positively or negatively with the impact of other relevant processes involved in genetic variability such as the DNA mismatch repair system.³⁹

A key aspect of bacterial survival is the ability to evolve while migrating across spatially varying environmental challenges. The gradient plate assays enabled us to study microbial adaptation and to visualize directly the evolutionary dynamics of each group of strains (WT versus Δ recA strains). Suppression of the SOS response showed a reduction in the number of lineages observed relative to each WT strain after the same period of time, which supports our previous results in terms of mutation rate and MPC data (Table 1 and Figure S1) and provides new evidence of the effectiveness of this strategy in tackling the evolution of resistance.^{3,17,26} WGS was performed for selected mutants. Unexpectedly, only a few modifications were found: in the redox-sensitive transcription activator SoxR, in DNA repair proteins (RecQ or UvrD), in the cell division protein FtsA, and in the regulator of outer membrane proteins EnvZ.

Using competition assays, we noted a remarkable fitness cost associated with *recA* deletion in the absence of external DNA-damaging agents such as antimicrobials in LLQR phenotypes. This effect was even higher when competition assays were performed in the presence of sub-MIC concentrations of ciprofloxacin (simulating sub-therapeutic or environmental concentrations of fluoroquinolones)²⁹ (Figure 1). In this connection, it is well known that the SOS response also induces increases in three DNA polymerases (pol II, pol IV, pol V), conferring a competitive fitness advantage during the stationary phase of the bacterial lifecycle.⁴⁰ Hence, the absence of RecA could explain the fitness cost observed in both WT and LLQR *E. coli* phenotypes.

Other important parameters reported in this study, such as *in vitro* PAE (prolonged by ~3 h in RecA-deficient strains, including LLQR and resistant strains) and biofilm formation (reduced in RecA-deficient strains at sub-MIC concentrations) showed additional beneficial properties of this possible therapeutic strategy (Figures 2 and 3). Suppression of the SOS response would help prolong the PAE after withdrawing the antimicrobial, which is potentially advantageous in therapy. Bacterial adherence is a key step in bacterial physiology and pathogenesis. The SOS response has been shown to be involved in the adherence of *E. coli* to surfaces.^{41–43} Studies have shown that biofilm formation depends on the ability of the bacteria to induce the SOS response.⁷

In conclusion, this study shows that suppression of the SOS response is an interesting strategy for reversing and tackling the evolution of antibiotic resistance in a set of *E. coli* phenotypes ranging from highly susceptible to highly quinolone resistant, and plays a significant role in other important clinical parameters such as bacterial fitness, biofilm formation and PAEs under therapeutic concentrations. The development of RecA inhibitors could function as an adjuvant therapy, leading to reversion of drug resistance.

Acknowledgements

This study was presented in part at ECCMID 2017, Vienna, Austria (Poster Presentation P0226) and ECCMID 2018, Madrid, Spain (Poster Presentation P1170).

Funding

This work was supported by the Plan Nacional de I+D+i 2013–2016 and the Instituto de Salud Carlos III (projects PI14/00940 and PI17/01501), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI; RD16/0016/0001 and REIPI RD16/0016/0009), co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe', operative program Intelligent Growth 2014–2020. F. D.-P. is supported by a VPPi-US fellowship from the University of Sevilla.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Additional Methods, Table S1 and Figure S1 appear as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 2009; **325**: 1089–93.
- Blázquez J, Couce A, Rodríguez-Beltrán J *et al.* Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Curr Opin Microbiol* 2012; **15**: 561–9.
- Culyba MJ, Mo CY, Kohli RM. Targets for combating the evolution of acquired antibiotic resistance. *Biochemistry* 2015; **54**: 3573–82.
- Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 2014; **38**: 1126–45.
- Newmark KG, O'Reilly EK, Pohlhaus JR *et al.* Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene* 2005; **356**: 69–76.
- Strugeon E, Tilloy V, Ploy M *et al.* The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *MBio* 2016; **7**: e00868–16.
- Costa SB, Campos ACC, Pereira ACM *et al.* Adherence to abiotic surface induces SOS response in *Escherichia coli* K-12 strains under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology* 2014; **160**: 1964–73.
- Gómez-Gómez J-M, Manfredi C, Alonso J-C *et al.* A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biol* 2007; **5**: 14.
- Vila J, Sáez-López E, Johnson JR *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* 2016; **40**: 437–63.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C *et al.* Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 1057–98.
- Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015; **1354**: 12–31.
- Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. *Drug Resist Updat* 2016; **29**: 13–29.
- Mo CY, Manning SA, Roggiani M *et al.* Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics. *mSphere* 2016; **1**: e00163–16.
- Recacha E, Machuca J, Díaz de Alba P *et al.* Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *MBio* 2017; **8**: e00971–17.
- Nautiyal A, Patil KN, Muniyappa K. Suramin is a potent and selective inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response:

Recacha *et al.*

- recA as a potential target for antibacterial drug discovery. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1834–43.
- 16** Alam MK, Alhazmi A, DeCoteau JF *et al.* RecA inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. *Cell Chem Biol* 2016; **23**: 381–91.
- 17** Baym M, Stone LK, Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science* 2016; **351**: aad3292.
- 18** Kim S, Lieberman TD, Kishony R. Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 14494–9.
- 19** Roland KL, Little JW. Reaction of LexA repressor with diisopropyl fluorophosphate. A test of the serine protease model. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12828–35.
- 20** Machuca J, Briales A, Labrador G *et al.* Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3203–15.
- 21** Drayman N, Karin O, Mayo A *et al.* Dynamic proteomics of herpes simplex virus infection. *MBio* 2017; **8**: e01612–17.
- 22** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Sixth Informational Supplement M100-S26*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2016.
- 23** Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edn. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015; 427.
- 24** Hall BM, Ma C-X, Liang P *et al.* Fluctuation analysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1564–5.
- 25** Marcusson LL, Olofsson SK, Lindgren PK *et al.* Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 938–43.
- 26** Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED *et al.* Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 2016; **353**: 1147–51.
- 27** Overhage J, Bains M, Brazas MD *et al.* Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008; **190**: 2671–9.
- 28** Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Sander JD *et al.* Oligomerized pool engineering (OPEN): an “open-source” protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc* 2009; **4**: 1471–501.
- 29** Li Y, Zhu G, Ng WJ *et al.* A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *Sci Total Environ* 2014; **468–469**: 908–32.
- 30** Craig WA, Gudmunsson S. Postantibiotic effect. In: V Lorian, ed. *Antibiotics in Medicine*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1991; 403–31.
- 31** García I, Ballesta S, Gilaberte Y *et al.* Antimicrobial photodynamic activity of hypericin against methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future Microbiol* 2015; **10**: 347–56.
- 32** Brynildsen MP, Winkler JA, Spina CS *et al.* Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nat Biotechnol* 2013; **31**: 160–5.
- 33** Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C *et al.* *In vitro* effect of *qnrA1*, *qnrB1* and *qnrS1* genes on fluoroquinolone activity against isogenic *Escherichia coli* isolates with mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1266–9.
- 34** Sexton JZ, Wigle TJ, He Q *et al.* Novel inhibitors of *E. coli* RecA ATPase activity. *Curr Chem Genomics* 2010; **4**: 34–42.
- 35** Bellio P, Brisdelli F, Perilli M *et al.* Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in *Escherichia coli*. *Phytomedicine* 2014; **21**: 430–4.
- 36** Yakimov A, Pobegalov G, Bakhlanova I *et al.* Blocking the RecA activity and SOS-response in bacteria with a short α -helical peptide. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: 9788–96.
- 37** Mo CY, Culyba MJ, Selwood T *et al.* Inhibitors of LexA autoproteolysis and the bacterial SOS response discovered by an academic–industry partnership. *ACS Infect Dis* 2018; **4**: 349–59.
- 38** Lopez E, Blazquez J. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3411–5.
- 39** Putnam CD. Evolution of the methyl directed mismatch repair system in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 2016; **38**: 32–41.
- 40** Yeiser B, Pepper ED, Goodman MF *et al.* SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 8737–41.
- 41** Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ *et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005; **436**: 1171–5.
- 42** Linares JF, Gustafsson I, Baquero F *et al.* Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 19484–9.
- 43** Gotoh H, Kasaraneni N, Devineni N *et al.* SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling* 2010; **26**: 603–11.
- 44** EUCAST. *Clinical Breakpoints and Epidemiological Cut-Off Values*. 2016. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

Downloaded from <https://academic.oup.com/jac/advance-article-abstract/doi/10.1093/jac/dky407/5133291> by guest on 17 October 2018

V. DISCUSIÓN

El ascenso de patógenos multirresistentes y la dificultad en el descubrimiento de nuevas familias de antimicrobianos han motivado la búsqueda de estrategias terapéuticas que, revirtiendo la resistencia, permitan mantener efectivos los antimicrobianos utilizados en práctica clínica.¹¹ El sistema SOS, es un mecanismo de respuesta al estrés, ampliamente conservado en procariotas y se ha propuesto como una diana terapéutica eficaz frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La respuesta SOS favorece el intercambio y recombinación genética contribuyendo a la variabilidad genómica y adquisición de determinantes de resistencia entre bacterias, así como la mutagénesis, permitiendo la adaptación y resistencia adquirida a los antimicrobianos. Se trata de una poderosa herramienta que los microorganismos inducen ante la presencia de ADNcs generado por daño en su genoma o debido a los procesos de transferencia génica horizontal, y que utilizan para inducir todos los cambios genéticos posibles e intentar sobrevivir. Esto hace que la alteración de la respuesta SOS, a través de sus dos reguladores principales, RecA y LexA, en combinación con antimicrobianos como las quinolonas, haya sido propuesta como una estrategia viable para incrementar la sensibilidad a los antibióticos y frenar el ascenso de la resistencia a los mismos.¹⁸⁰

Las quinolonas son antimicrobianos ampliamente usados como terapia empírica y dirigida en infecciones causadas por *E. coli*,⁷² un microorganismo con una gran capacidad de acumular genes de resistencia y que forma parte de la microbiota, pero también puede comportarse como un patógeno.³⁰² La actividad bactericida de las quinolonas y su estrecha relación con la respuesta SOS, convierten a estos antimicrobianos en agentes idóneos para la estrategia propuesta. Las quinolonas promueven la formación de altos niveles de ADNcs que estimulan la respuesta SOS de dos maneras distintas. Por un lado, impidiendo la síntesis de ADN por bloqueo de las topoisomerasas tipo II y resellado de la rotura. Por otro, causando daño oxidativo, al inducir cambios fisiológicos en la bacteria, como la hiperactivación de la cadena transportadora de electrones que incrementa los niveles de radicales hidroxilo altamente tóxicos, via reacción de Fenton, capaces de interactuar con el ADN (provocando roturas), proteínas y lípidos.¹²⁰ Antimicrobianos y ROS, se consideran agentes genotóxicos para la bacteria, y por tanto, constituyen una señal inductora de la

DISCUSIÓN

respuesta SOS, implicada en los procesos de adaptación al estrés y supervivencia comentados anteriormente. Además, el desarrollo de resistencia a estos antimicrobianos también se encuentra muy asociado a la respuesta SOS. Se ha demostrado que las fluoroquinolonas y especialmente ciprofloxacino, estimula la mutagénesis en *E. coli* a través de la inducción de ADN polimerasas propensas a error mediadas por el regulón SOS.²⁹⁰ Por otro lado, los determinantes de resistencia plasmídica, *qnrB* y *qnrD*, están bajo el control de la respuesta SOS, debido a que ambos tienen una secuencia promotora *upstream* que es muy similar a la secuencia de unión de LexA,^{159,160} mostrándose así una estrecha interacción entre resistencia a quinolonas y respuesta SOS.

La asociación entre quinolonas, activación de la respuesta SOS e inducción de la resistencia antibiótica,^{289,290} demuestra el potencial de los reguladores RecA y LexA, componentes esenciales del regulón. Esta estrategia ha sido evaluada frente a cepas sensibles sin mecanismos de resistencia adquirida.^{74,288–290} Sin embargo, los fenotipos con bajo nivel de resistencia, como los LLQR (que pueden estar expuestos a concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos durante la terapia antibiótica), suponen una importante amenaza para el desarrollo de resistencia clínica^{67,303,304} y deben ser analizados. Estudios previos en los que la respuesta SOS mostró ser una diana de interés motivaron nuestros esfuerzos hacia la construcción de un conjunto de cepas isogénicas con distintos mecanismos de resistencia a quinolonas de origen tanto cromosómico como plasmídico, con el sistema SOS modificado por inactivación constitutiva (deleción de *recA*) o por hipoactivación (mediado por LexA1, G80D), creando de esta forma una colección de cepas isogénicas de *E. coli* con una gradación de actividad SOS y resistencia a quinolonas (Figura 1 y Tabla 1, artículo 1).

Nuestros trabajos proporcionan evidencia suficiente para afirmar que la supresión de la respuesta SOS potencia el efecto de antimicrobianos bactericidas, como las quinolonas, incrementando la sensibilidad y ayudando a combatir la emergencia de resistencia. En el caso de las cepas $\Delta recA$ con inactivación constitutiva de la respuesta SOS, el impacto sobre la sensibilidad y la emergencia de mutantes fue concordante con los datos obtenidos en estudios previos realizados en cepas con fenotipo salvaje

altamente sensible,^{76,287} y la resensibilización y bloqueo de la resistencia fue observada en cepas con fenotipos LLQR, resistente y altamente resistente (Tabla 1 y Figura 2, 4 y S6; artículo 1). Sin embargo, la atenuación de la respuesta SOS, mostró un menor descenso de la sensibilidad y bloqueo de la resistencia en las cepas con una variante de LexA de escisión lenta, la LexA1 (G80D), cuya presencia mostró cambios menores en cepas con ambos fenotipos, sensible y resistente. Esta discrepancia puede ser debida, en parte, al impacto que la delección de *recA* tiene más allá de la pérdida de LexA escindible y la supresión de la respuesta SOS, con implicación en procesos relevantes como la recombinación homóloga. Por el contrario, la sobreactivación de la respuesta SOS no sería una estrategia viable por su menor efecto sobre la sensibilidad y mayor tasa de mutación observada en estudios previos, a pesar de desencadenar una respuesta SOS descontrolada, energéticamente costosa pero que promueve la inestabilidad genética.²⁸⁷ En resumen, la inactivación de la respuesta SOS en combinación de antimicrobianos que dañan el ADN, como las quinolonas, suponen la mejor opción para la potencial sinergia, y nuestros estudios se centran principalmente en la evaluación de los mutantes *recA* con el objetivo de mostrar su impacto en la reversión y bloqueo de la emergencia de resistencia.

En general, la supresión completa de la respuesta SOS incrementó la sensibilidad a quinolonas en cepas con fenotipos sensible, sensibilidad intermedia y resistente con mecanismos adquiridos de resistencia a estos antimicrobianos de origen tanto plasmídico como cromosómico. Sin embargo, algunas peculiaridades fueron observadas en el impacto de la respuesta SOS sobre cada uno de los fenotipos que comentaremos a continuación. Considerando los puntos de corte del CLSI,³⁰⁵ la supresión de la respuesta SOS por inactivación completa condujo a cambios de categoría clínica para ciprofloxacino de intermedio o resistente a sensible en las cepas EC08 (con sustituciones S83L, D87N y S80R) y EC09 (con sustituciones S83L, D87N y S80R y $\Delta marR$), respectivamente. Utilizando los puntos de corte de EUCAST,³⁰⁰ la inactivación también indujo un cambio de categoría clínica, de resistente a sensible en la cepa EC08 y a sensibilidad intermedia en la cepa EC09, respectivamente. Estos resultados apoyan la relevancia de una estrategia basada en la inactivación de SOS para la reversión de la resistencia a antimicrobianos a niveles que puedan ser clínicamente significativos,

DISCUSIÓN

favoreciendo la recuperación de fármacos. Otro dato interesante en relación a la inactivación de *recA* en la cepa EC02 (con una sustitución en S83L), fue la modificación del valor de CMI de ciprofloxacino por debajo del punto de corte epidemiológico (0,064 mg/L; <http://www.eucast.org>).^{306,307} Este resultado muestra que la inactivación de la respuesta SOS suprime el efecto, en términos de CMI, del primer paso hacia la resistencia asociado con modificaciones de las topoisomerasas tipo II. La eficacia de la supresión de la respuesta SOS en la resensibilización de cepas resistentes a quinolonas que codifican múltiples (hasta cuatro) y diferentes mecanismos de resistencia se ilustra mediante un modelo cualitativo mostrado en la Figura 5, artículo 1.

Con respecto a los ensayos cinéticos, se llevaron a cabo diversas aproximaciones para evaluar la reversión de la resistencia a quinolonas mediada por una respuesta SOS inactivada bajo periodos cortos y largos de incubación con antimicrobianos. En todos los casos, se observó una clara desventaja selectiva para la supervivencia en aquellas cepas con una respuesta SOS suprimida, cuando se expuso a concentraciones de ciprofloxacino relevantes (concentraciones máximas, $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada en suero, y concentraciones referidas a valores de CMI) (Figura 2 y 3 y S6, artículo 1). En relación a las curvas de letalidad, la inactivación de la respuesta SOS en cepas de *E. coli* que albergan múltiples mecanismos de resistencia, como es el caso de EC08 y EC09, mostró un alto efecto bactericida en presencia de concentraciones de ciprofloxacino clínicamente relevantes tras 2-4 h de exposición (en función de cepa y condiciones), el cual fue mantenido hasta las 24 h (Figura 2 y S3, artículo 1). Mediante las curvas de crecimiento, se confirmaron los datos anteriores y se evidenció el impacto de la supresión de la respuesta SOS a concentraciones subinhibitorias de antimicrobiano en las cepas LLQR, en las cuales se observó un descenso en el crecimiento tras 24 h de incubación (Figura S8A, artículo 1). La viabilidad bacteriana también fue medida en función de la actividad metabólica en términos de producción de ATP, con resultados desfavorables para las cepas con la respuesta SOS suprimida, correlacionando con los datos anteriores. Bajo concentraciones clínicamente relevantes de ciprofloxacino, se observaron descensos significativos en la producción de ATP en ambas variantes con la respuesta SOS suprimida ($\Delta recA$ y $lexA1$) y para fenotipos LLQR y resistente (Figura S8B y C, artículo 1)

Por último, los ensayos de citometría de flujo también mostraron descensos significativos en la viabilidad celular tras un periodo breve de exposición al antimicrobiano (60 min), lo cual fue directamente asociado a la incapacidad de activar la respuesta SOS y demostró que su inducción sucede de forma temprana ante daño en el ADN permitiendo la supervivencia celular (Figura 3 y S4B, artículo 1).

Los datos obtenidos muestran que cambios en los valores de CMI de cepas específicas resistentes a quinolonas (EC08 y EC09) como consecuencia de una respuesta SOS inactivada, correlacionaron con la formación de ROS a concentraciones clínicamente relevantes de ciprofloxacino (Figura S7, artículo 1). La mayor producción de ROS y eficacia de resensibilización en ambas cepas tras la inactivación de SOS, se asocia al relevante papel que desempeña el daño oxidativo causado por las ROS en la letalidad de las quinolonas y su implicación en la activación del regulón de forma directa, tras provocar roturas en el ADN.¹²⁰ Así mismo, se ha demostrado la participación de algunos genes SOS, como *dinF*, en la detoxificación celular, disminuyendo los niveles intracelulares de ROS,³⁰⁸ hecho concordante con nuestros resultados sobre el impacto de la supresión de la respuesta SOS.

En términos de viabilidad bacteriana, estos datos apoyan la utilidad potencial de esta estrategia para la resensibilización o reversión de la resistencia a quinolonas tras periodos cortos y largos de exposición a concentraciones relevantes de quinolonas.

Aunque la inactivación de la respuesta SOS condujo a reducciones moderadas en los valores de CMI de ciprofloxacino (por encima de 8 veces) y otras fluoroquinolonas (por encima de 15 veces), estas diferencias podrían jugar un papel significativo en el fallo terapéutico, teniendo en consideración el carácter concentración-dependiente de estos antimicrobianos, cuyos predictores de eficacia *in vivo* son $C_{m\acute{a}x}/CMI$ y AUC/CMI .¹⁷⁸ Valores de $AUC/CMI >30$ están asociados con baja mortalidad y son requeridos para la eficacia clínica del fármaco.^{309–312} Para evaluar el impacto del regulón en la eficacia *in vivo* de las fluoroquinolonas, se llevó a cabo un modelo murino de sepsis, utilizando cepas resistente (EC08) y sensible (EC08 $\Delta recA$, con ausencia de respuesta SOS) a ciprofloxacino según la guía EUCAST. Los resultados del modelo murino mostraron que la inactivación de la respuesta SOS en una cepa de *E. coli* (EC08) inicialmente resistente

a quinolonas incrementaba significativamente la eficacia *in vivo* de ciprofloxacino (con reducción del recuento bacteriano en torno al 99%) (Figura 4, artículo 1).

Otros parámetros relacionados con la supervivencia celular y la virulencia de la bacteria fueron evaluados en las cepas de la colección isogénica de *E. coli*. A través de ensayos de competición, se notificó un considerable coste del *fitness* asociado a la delección de *recA* en ausencia de agentes externos que dañan el ADN, como los antimicrobianos, en los fenotipos LLQR. Este efecto se intensificó cuando los ensayos de competición se realizaron en presencia de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino (simulando concentraciones subterapéuticas o ambientales de fluoroquinolonas)³¹³ (Figura 1, artículo 2). Estos datos correlacionan con el hecho de que la respuesta SOS induce un incremento en la expresión de las ADN polimerasas (II, IV y V), confiriendo un *fitness* competitivo ventajoso durante la fase estacionaria del ciclo celular, permitiendo la supervivencia de la bacteria a largo plazo.³¹⁴ Por lo tanto, la ausencia de RecA podría explicar el coste del *fitness* observado en ambos fenotipos de *E. coli*, salvaje y LLQR. En este trabajo también se evaluaron el EPA *in vitro* y la producción de *biofilm*. En las cepas delecionadas en *recA*, incluyendo los fenotipos LLQR y resistente, la duración del EPA se alargó en torno a 3 h respecto a las cepas con el sistema SOS intacto (Figura 2, artículo 2). En consecuencia, la supresión de la respuesta SOS también ayudaría a prolongar el efecto post-antibiótico tras la retirada del antimicrobiano, lo cual es potencialmente ventajoso en terapia. Por otro lado, la adherencia bacteriana es un paso clave en la fisiología bacteriana y en la patogénesis. Se ha evidenciado que la respuesta SOS se encuentra estrechamente relacionada con la adherencia a superficies en *E. coli*^{283,315,316} y que la producción de *biofilm* depende de la capacidad de la bacteria de inducir la respuesta SOS.²⁸¹ Nuestros resultados fueron concordantes con datos previos, la producción de *biofilm* disminuyó en cepas deficientes en RecA a concentraciones subinhibitorias, incluyendo fenotipos LLQR y resistente (Figura 3, artículo 2).

En este estudio también se abordó la implicación de la respuesta SOS en los eventos de mutagénesis que suceden en su mayoría durante la síntesis por translesión, cuando el ADN no ha podido ser reparado por los mecanismos convencionales. Se trata

de un proceso en el que participan las Pol IV y V, responsables en gran medida de la resistencia adquirida a los antimicrobianos.²⁶⁸ La inactivación de la respuesta SOS mostró un enlentecimiento de la mutagénesis y bloqueo de la adquisición de resistencia en cepas con fenotipos LLQR a concentraciones clínicamente significativas (Tabla 1 y Figura S1, artículo 2). De hecho, para las cepas deficientes en RecA que hospedaban mecanismos de resistencia a quinolonas (variando de sensible, sensibilidad intermedia a bajo nivel de resistencia) se observó una caída significativa de la tasa de mutación a 4x CMI de ciprofloxacino. En consecuencia, podemos afirmar que la supresión de la respuesta SOS mediada por la delección de *recA* altera la capacidad de la bacteria para evolucionar hacia altos niveles de resistencia independientemente del fenotipo de resistencia a quinolonas. Este comportamiento fue similar a concentraciones de ciprofloxacino clínicamente relevantes para los fenotipos LLQR, apoyando la capacidad de esta estrategia para atajar la emergencia de resistencia. En el caso del par isogénico EC08, a $C_{m\acute{a}x}$ de ciprofloxacino (2,5 mg/L), la supresión de la respuesta SOS redujo la tasa de mutación más de 10^3 veces, contribuyendo a la prevención de la emergencia de mutaciones. Estos resultados correlacionaron bien con los datos de eficacia *in vivo* de ciprofloxacino arrojados por el modelo murino comentados anteriormente. Sin embargo, una hipoactivación de la respuesta SOS, basada en LexA1 dio lugar a una menor reducción de la tasa de mutación referida a las cepas delecionadas en *recA*. Además, nuestros resultados mostraron que la supresión de la respuesta SOS basada en la delección de *recA* redujo los valores de CPM de las quinolonas en *E. coli* LLQR (grupos EC02 y EC04; Tabla 1, artículo 2) hasta niveles por debajo de la concentración máxima de ciprofloxacino alcanzada en suero (2,5 mg/L).³⁰¹ Por lo tanto, la supresión de la respuesta SOS revierte los efectos de los mecanismos de bajo nivel de resistencia a quinolonas como las sustituciones S83L y S80R en GyrA y ParC, respectivamente, afectando también al valor de CPM y a la emergencia de mutantes.^{304,317}

Un aspecto clave de la supervivencia bacteriana es la capacidad para evolucionar durante el proceso de migración espacial en función de las condiciones ambientales cambiantes.³¹⁸ Mediante ensayos de gradiente en placa se pudo estudiar la adaptación microbiana y visualizar directamente la dinámica de desarrollo de cada grupo de cepas (cepas con fenotipo salvaje frente a cepas $\Delta recA$). La supresión de la respuesta SOS

DISCUSIÓN

mostró una reducción en el número de linajes observados en relación a cada cepa con fenotipo salvaje tras el mismo periodo de incubación, lo cual apoya nuestros resultados previos en términos de tasa de mutación y datos de CPM (Tabla 1 y Figura S1, artículo 2) y supone otra evidencia de la efectividad de esta estrategia para bloquear la evolución hacia la resistencia.^{71,318,319} Con el objetivo de analizar genéticamente los mutantes resistentes, se hizo una selección de los mismos y se sometieron a evaluación por secuenciación genómica masiva. Inesperadamente, las modificaciones observadas no afectaban a las dianas clásicas responsables de la resistencia a quinolonas, solo se encontraron modificaciones en: SoxR, el activador de la transcripción de SoxS, relacionado con los procesos redox; proteínas de reparación del ADN (RecQ o UvrD); la proteína de división celular FtsA y el regulador de las proteínas de membrana externa EnvZ.

La utilización de la respuesta SOS como diana terapéutica para incrementar la sensibilidad y disminuir la resistencia adquirida a los antimicrobianos adquiere su máximo potencial con la inactivación constitutiva del regulón, en la que ambos componentes, LexA o RecA, han demostrado ser dianas igualmente viables. En contraposición con la sobreactivación de la respuesta SOS, cuyos resultados la convirtieron en una estrategia menos eficaz en estos términos.²⁸⁷ En nuestro trabajo, la inactivación constitutiva de la respuesta SOS fue conseguida mediante delección en *recA*, y la presencia de LexA1, supuso una hipoactivación del regulón, por tanto, las diferencias observadas en la efectividad de ambas estrategias responden a la diferente capacidad de la bacteria de activar la respuesta SOS. Aunque exista evidencia sobre la potencialidad de ambas dianas, LexA y RecA, cada una de ellas presenta sus propios desafíos. Por su parte, la delección de *recA* ejerce un impacto que va más allá de la supresión de la respuesta SOS, ya que presenta implicaciones adicionales en procesos bacterianos importantes como la recombinación homóloga.⁷³ Sin embargo, desde un punto de vista terapéutico, RecA, a diferencia de LexA, presenta homología con la familia de proteínas equivalente en eucariotas (familia Rad51); de hecho, cribados de alto rendimiento han mostrado que los compuestos obtenidos interactuaban con facilidad frente a ambos, RecA y Rad51.²⁹⁶ En consecuencia, se hace necesaria la búsqueda de inhibidores de RecA incidiendo particularmente en su especificidad, requisito

indispensable para su utilización. Por su parte, LexA se considera un componente exclusivo de procariotas pudiendo ser una diana óptima para actuar sobre la respuesta SOS, sin embargo, existe poca evidencia experimental sobre estrategias que utilicen este regulador y hasta hace poco no se han desarrollado compuestos potenciales que inhiban su autoproteólisis.²⁹⁵ La utilización de bacteriófagos que hiperproduzcan LexA3, una variante de LexA no proteolizable, se ha propuesto como posible estrategia para la supresión de la respuesta SOS a nivel de este componente.²⁹⁴

La inactivación de la respuesta SOS a nivel de RecA, supone la estrategia más factible por dos motivos fundamentales. Por un lado, se trata del primer sensor del daño capaz de inducir la respuesta SOS, promoviendo la reparación del ADN y la mutagénesis, la síntesis de factores de virulencia, y los mecanismos de transferencia génica horizontal responsables de la variabilidad genómica y resistencia a antimicrobianos. Por otro, la existencia de una amplia bibliografía describiendo potenciales compuestos inhibidores de RecA. Además, el tratamiento con antimicrobianos bactericidas, como las quinolonas, supone un poderoso inductor de la actividad de RecA (Figura S1, artículo 1); las cepas de *E. coli* que carecen de RecA son mucho más sensibles a los antibióticos bactericidas, confirmando la importancia del papel protector de RecA frente a los antimicrobianos (Tabla 1, artículo 1). RecA se considera esencial para el incremento de la tolerancia tras tratamiento con antimicrobianos, potenciando la reparación del ADN dañado que se origina directamente por daño en el ADN mediado por antibióticos o indirectamente debido al estrés metabólico y oxidativo. Estos hallazgos subrayan el papel de RecA como diana terapéutica, potenciando la actividad de antibióticos y combatiendo la emergencia de la resistencia a antimicrobianos.²⁹⁹ Se han descrito compuestos inhibidores del dominio ATPasa de RecA como la suramina,³²⁰ compuestos metálicos,³²¹ derivados de moléculas aromáticas aniónicas, como las ftalocianinas tetrasulfonadas,²⁹⁹ metabolitos secundarios de líquenes,³²² péptidos α -helicoidales,³²³ la curcumina.³²⁴ Estos compuestos compiten con el ADN por su unión al dominio ATPasa de RecA. La formación de nucleofilamentos de RecA requiere la presencia de ADNcs en torno al cual los monómeros polimerizan. Además, esta filamentación es necesaria para que se produzca la unión del ATP en la interfase entre monómeros. En consecuencia, la no unión de ADNcs, imposibilita la formación de nucleofilamentos y el bloqueo de la

unión de ATP, con importantes consecuencias en las actividades recombinantes de RecA y activación de la respuesta SOS.³²²

Existen algunas limitaciones en nuestro estudio relativas a la colección de cepas utilizadas. Se han evaluado construcciones artificiales que confieren distintos niveles de resistencia a quinolonas, sin embargo, en la naturaleza existen aislados que portan una combinación de determinantes de resistencia con gran éxito evolutivo, como es el caso de los clones exitosos de enterobacterias tales como *E. coli* ST131 y *K. pneumoniae* ST258.²⁹ En estas cepas, desconocemos si, la inactivación de la respuesta SOS afectaría en diferente grado a la sensibilidad y desarrollo de resistencia del microorganismo a los antimicrobianos. Por otro lado, al tratarse de una respuesta bacteriana ampliamente conservada sería interesante evaluar el impacto que esta estrategia tendría sobre el microbioma. La microbiota intestinal constituye uno de los “puntos calientes” para los procesos de transferencia génica horizontal por varios motivos: i) la elevada carga bacteriana crea un ambiente óptimo para la interacción microbiana, ii) el tracto gastrointestinal es un ambiente hostil y las bacterias están sometidas a distintos tipos de estrés derivado tanto de los microorganismos como del hospedador, iii) el tracto gastrointestinal supone un inmenso reservorio de determinantes de resistencia que pueden ser transferidos entre bacterias por diseminación horizontal, inducido por la respuesta SOS bacteriana.³²⁵ Además, se ha demostrado que la microbiota intestinal determina algunos aspectos de la salud en los humanos.³²⁶ Por tanto, sería pertinente la evaluación del efecto de esta estrategia sobre el microbioma intestinal.

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo podemos afirmar que la supresión completa de la respuesta SOS constituye una estrategia de gran valor en la lucha contra la multirresistencia antimicrobiana, garantizando la recuperación de antimicrobianos bactericidas como las quinolonas. Por tanto, la búsqueda de inhibidores efectivos que puedan ser utilizados como adyuvantes debe ser una prioridad.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en los trabajos expuestos en este proyecto de Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La supresión de la respuesta SOS mediada por delección de *recA* induce un incremento de la sensibilidad a fluoroquinolonas en cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas. Este incremento de sensibilidad puede suponer cambio de categoría clínica.
2. La supresión de la respuesta SOS mediada por delección de *recA* en cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas incrementa la actividad bactericida de fluoroquinolonas *in vitro*.
3. La supresión de la respuesta SOS mediada por delección de *recA* en cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas incrementa la eficacia de las fluoroquinolonas en un modelo murino de sepsis peritoneal.
4. La supresión de la respuesta SOS en cepas de *E. coli* disminuye la aparición de mutantes resistentes a fluoroquinolonas y los valores de las concentraciones preventivas de mutantes (CPM).
5. La supresión de la respuesta SOS en cepas de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas disminuye la producción de *biofilm* y el *fitness* bacteriano.
6. La supresión de la respuesta SOS puede ser una estrategia de interés para la reversión de la resistencia a antimicrobianos bactericidas

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Centers for Disease Control and Prevention. *Antibiotic resistance threats in the United States*. 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.
2. Dcosta VM, King CE, Kalan L, *et al*. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 2011; **477**: 457–61.
3. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, *et al*. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 2012; **7**: 1–11.
4. Clemente JC, Pehrsson EC, Blaser MJ, *et al*. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv* 2015; **1**.
5. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 2016; **529**: 336–43.
6. Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev* 2011; **35**: 901–11.
7. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**: 287–92.
8. Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, *et al*. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* 2008; **3**: e1619.
9. Frère J-M, Sauvage E, Kerff F. From ‘an enzyme able to destroy penicillin’ to carbapenemases: 70 years of beta-lactamase misbehaviour. *Curr Drug Targets* 2016; **17**: 974–82.
10. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 268–81.
11. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, *et al*. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 1057–98.
12. World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
13. World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*. 2015 <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
14. World Health Organization. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)*. 2015. <http://www.who.int/glass/en/>.
15. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, *et al*. Discovery, research, and development of new

BIBLIOGRAFÍA

antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 318–27.

16. European Centre for Disease Prevention and Control. *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. <https://ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>.

17. World Health Organization. *Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR)*. 2015. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/about-amr/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resist>.

18. Centers for Disease Control and Prevention. *Antibiotic/ Antimicrobial Resistance. Biggest Threats* . https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.

19. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). <http://www.resistenciaantibioticos.es/es/quienes-somos>.

20. Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, *et al*. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult intensive care units. *Ann Intern Med* 2001; **135**: 175–83.

21. Daneman N, Bronskill SE, Gruneir A, *et al*. Variability in antibiotic use across nursing homes and the risk of antibiotic-related adverse outcomes for individual residents. *JAMA Intern Med* 2015; **175**: 1331–9.

22. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, *et al*. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 2010; **340**: c2096–c2096.

23. Steinke D, Davey P. Association between antibiotic resistance and community prescribing: A critical review of bias and confounding in published studies. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: S193–205.

24. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, *et al*. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet* 2005; **365**: 579–87.

25. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T A peer-reviewed J Formul Manag* 2015; **40**: 277–83.

26. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, *et al*. Global increase and geographic

- convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci* 2018; **115**: 201717295.
27. Read AF, Woods RJ. Antibiotic resistance management. *Evol Med public Heal* 2014; **2014**: 147.
28. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**: 298–304.
29. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 565–91.
30. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol* 2018; **61**: 185–8.
31. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 821–30.
32. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe*. 2017. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>.
33. Stone SP, Fuller C, Savage J, *et al*. Evaluation of the national Cleanyourhands campaign to reduce *Staphylococcus aureus* bacteraemia and *Clostridium difficile* infection in hospitals in England and Wales by improved hand hygiene: Four year, prospective, ecological, interrupted time series stud. *BMJ* 2012; **344**: 1–11.
34. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, *et al*. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* in israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 848–55.
35. Brinsley K, Srinivasan A, Sinkowitz-Cochran R, *et al*. Implementation of the campaign to prevent antimicrobial resistance in healthcare settings: 12 Steps to prevent antimicrobial resistance among hospitalized adults - Experiences from 3 institutions. *Am J Infect Control* 2005; **33**: 53–4.
36. World Health Organization. *The evolving threat of antimicrobial resistance : options for action*. 2012. <http://www.who.int/iris/handle/10665/44812>.
37. Bürgmann H, Frigon D, Gaze W, *et al*. Water & Sanitation: An Essential Battlefield in

BIBLIOGRAFÍA

- the War on Antimicrobial Resistance. *FEMS Microbiol Ecol* 2018.
38. World Health Organization. *WHO guidelines on hand hygiene in health care*. 2009.
39. Liu L, Liu B, Li Y, *et al*. Successful control of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using antibiotic stewardship and infection control programs at a Chinese university hospital: A 6-year prospective study. *Infect Drug Resist* 2018; **11**: 637–46.
40. Cataldo MA, Granata G, Petrosillo N. *Clostridium difficile* infection: new approaches to prevention, non-antimicrobial treatment, and stewardship. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017; **0**: 1–14.
41. Paterson DL. The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: S90–5.
42. Emberger J, Tassone D, Stevens MP, *et al*. The current state of antimicrobial stewardship: Challenges, successes, and future directions. *Curr Infect Dis Rep* 2018; **20**: 31.
43. Programas de Optimización de uso de Antimicrobianos (PROA) en hospitales Españoles. *Documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH*. <https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/geiras/dcientificos/documentos/geih-dyc-2011-PROA.pdf>
44. Lawes T, Edwards B, López-Lozano JM, *et al*. Trends in *Staphylococcus aureus* bacteraemia and impacts of infection control practices including universal MRSA admission screening in a hospital in Scotland, 2006-2010: Retrospective cohort study and time-series intervention analysis. *BMJ Open* 2012; **2**.
45. Vernaz N, Hill K, Leggeat S, *et al*. Temporal effects of antibiotic use and *Clostridium difficile* infections. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 1272–5.
46. Lee CR, Cho IH, Jeong BC, *et al*. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int J Environ Res Public Health* 2013; **10**: 4274–305.
47. Centers for Disease Control and Prevention. *Core elements of hospital antibiotic stewardship programs*. 2014. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/healthcare/implementation/core-elements.html>.
48. Stokstad ELR, Jukes TH. Further observations on the animal protein factor. *Proc Soc Biol Exp Med* 1949; **73**: 523–28.
49. Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis*

2016; **16**: 1102–3.

50. European Medicines Agency. *Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health*. 2016 . EMA/CVMP/CHMP/231573.1-56.

51. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 718–33.

52. Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 109–17.

53. Horton RA, Randall LP, Snary EL, *et al.* Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: Implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol* 2011; **77**: 3715–9.

54. Freitag C, Michael GB, Kadlec K, *et al.* Detection of plasmid-borne extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 2017; **200**: 151–6.

55. Su Y, Yu CY, Tsai Y, *et al.* Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2016; **49**: 892–901.

56. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020*. <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>.

57. Lloyd DH, Page SW. Antimicrobial Stewardship in Veterinary Medicine. *Microbiol Spectr* 2018; **6**: 1–22.

58. Deak D, Outterson K, Powers JH, *et al.* Progress in the fight against multidrug-resistant bacteria? A review of U.S. food and drug administration-approved antibiotics, 2010-2015. *Ann Intern Med* 2016; **165**: 363–72.

59. Antibacterial agents in clinical development. An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. 2017. http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/antibacterial_agents_clinical_development/en/.

60. World Health Organization. *Prioritization of pathogens to guide discovery, research*

BIBLIOGRAFÍA

and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. 2017.

61. Antibiotics currently in global clinical development. http://www.pewtrusts.org/-/media/assets/2018/03/antibiotics_clinical_dev_table_february2018.pdf?la=en&hash=D1E1FEAC1B30A1A7721FE6A5428C73EF122B2B8F.

62. Policy IP. The 10 × '20 Initiative: Pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 1081–3.

63. Innovative Medicines Initiative. https://www.imi.europa.eu/sites/default/files/uploads/documents/projects/IMI_AMR_2017_LR.pdf.

64. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; **74**: 417–33.

65. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**.

66. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**:423-35

67. Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 2014; **12**: 465–78.

68. Lorian V. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bull N Y Acad Med* 1975; **51**: 1046–55.

69. Dickey SW, Cheung GYC, Otto M. Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Rev Drug Discov* 2017; **16**: 457–71.

70. Cirz RT, Romesberg FE. Controlling mutation: Intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; **42**: 341–54.

71. Culyba MJ, Mo CY, Kohli RM. Targets for combating the evolution of acquired antibiotic resistance. *Biochemistry* 2015; **54**: 3573–82.

72. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, *et al.* *Escherichia coli* : an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* 2016; **40**: 437–63.

73. Lopez E, Blazquez J. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3411–5.

74. Baharoglu Z, Mazel D. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2438–41.
75. Baharoglu Z, Krin E, Mazel D. RpoS plays a central role in the SOS induction by sublethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 2013; **9**.
76. Thi T Do, López E, Rodríguez-Rojas A, *et al.* Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 531–8.
77. Nagel M, Reuter T, Jansen A, *et al.* Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2011; **301**: 229–36.
78. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, *et al.* Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014; **22**: 438–45.
79. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, *et al.* 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* 1962; **5**: 1063–5.
80. Bisacchi GS. Origins of the quinolone class of antibacterials: An expanded ‘Discovery Story’. *J Med Chem* 2015; **58**: 4874–82.
81. Alós J-I. Quinolones. *Enfermedades Infecc y Microbiol clínica* 2009; **27**: 290–7.
82. Van Bambeke F, Michot J-M, Van Eldere J, *et al.* Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 256–80.
83. Peterson LR. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* 2001; **33 Suppl 3**: S180–6.
84. Ezelarab HAA, Abbas SH, Hassan HA, *et al.* Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. *Arch Pharm (Weinheim)* 2018: 1800141.
85. Owens RC, Ambrose PG. Clinical use of the fluoroquinolones. *Med Clin North Am* 2000; **84**: 1447–69.
86. Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 2000; **46 Suppl T**: 17–24.
87. Andriole VT. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: S113–9.

BIBLIOGRAFÍA

88. Bush NG, Evans-Roberts K, Maxwell A. DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* 2015; **6**.
89. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 430–40.
90. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014; **53**: 1565–74.
91. Papillon J, Ménétret J-F, Batisse C, *et al.* Structural insight into negative DNA supercoiling by DNA gyrase, a bacterial type 2A DNA topoisomerase. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: 7815–27.
92. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; **6**.
93. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, *et al.* Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 2007; **89**: 427–46.
94. Champoux JJ. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**: 369–413.
95. Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, *et al.* Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 1996; **379**: 225–32.
96. Costenaro L, Grossmann JG, Ebel C, *et al.* Modular structure of the full-length DNA gyrase B subunit revealed by small-angle X-ray scattering. *Structure* 2007; **15**: 329–39.
97. Kramlinger VM, Hiasa H. The ‘GyrA-box’ is required for the ability of DNA gyrase to wrap DNA and catalyze the supercoiling reaction. *J Biol Chem* 2006; **281**: 3738–42.
98. Laponogov I, Sohi MK, Veselkov DA, *et al.* Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 667–9.
99. Laponogov I, Pan X-S, Veselkov DA, *et al.* Structural basis of gate-DNA breakage and resealing by type II topoisomerases. *PLoS One* 2010; **5**: e11338.
100. Bax BD, Chan PF, Eggleston DS, *et al.* Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* 2010; **466**: 935–40.
101. Wohlkonig A, Chan PF, Fosberry AP, *et al.* Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol* 2010; **17**: 1152–3.
102. Sissi C, Perdonà E, Domenici E, *et al.* Ciprofloxacin affects conformational equilibria of DNA gyrase A in the presence of magnesium ions. *J Mol Biol* 2001; **311**: 195–203.

103. Aldred KJ, McPherson SA, Wang P, *et al.* Drug interactions with *Bacillus anthracis* topoisomerase IV: Biochemical basis for quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2012; **51**: 370–81.
104. Aldred KJ, McPherson SA, Turnbough CL, *et al.* Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: 4628–39.
105. Aldred KJ, Schwanz HA, Li G, *et al.* Overcoming target-mediated quinolone resistance in topoisomerase IV by introducing metal-ion-independent drug–enzyme interactions. *ACS Chem Biol* 2013; **8**: 2660–8.
106. Cheng G, Hao H, Dai M, *et al.* Antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur J Med Chem* 2013; **66**: 555–62.
107. Mustaev A, Malik M, Zhao X, *et al.* Fluoroquinolone-Gyrase-DNA Complexes. *J Biol Chem* 2014; **289**: 12300–12.
108. Blower TR, Williamson BH, Kerns RJ, *et al.* Crystal structure and stability of gyrase–fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 2016; **113**: 1706–13.
109. Pohlhaus JR, Kreuzer KN. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks *in vivo*. *Mol Microbiol* 2005; **56**: 1416–29.
110. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, *et al.* Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem* 2009; **9**: 981–98.
111. Newmark KG, O’Reilly EK, Pohlhaus JR, *et al.* Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene* 2005; **356**: 69–76.
112. Trusca D, Scott S, Thompson C, *et al.* Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J Bacteriol* 1998; **180**: 3946–53.
113. Malik M, Hussain S, Drlica K. Effect of anaerobic growth on quinolone lethality with *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 28–34.
114. Webber MA, Ricci V, Whitehead R, *et al.* Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance. *MBio* 2013; **4**: 1–10.
115. Ikeda H, Shiraishi K, Ogata Y. Illegitimate recombination mediated by double-strand

BIBLIOGRAFÍA

- break and end-joining in *Escherichia coli*. *Adv Biophys* 2004; **38**: 3–20.
116. Memar MY, Ghotaslou R, Samiei M, *et al*. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: current insights. *Infect Drug Resist* 2018; **Volume 11**: 567–76.
117. Van Acker H, Coenye T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends Microbiol* 2017; **25**: 456–66.
118. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, *et al*. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 2007; **130**: 797–810.
119. Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, *et al*. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 2007; **3**.
120. Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, *et al*. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci* 2014; **111**: E2100–9.
121. Mironov A, Seregina T, Nagornykh M, *et al*. Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 2017; **114**: 6022–7.
122. Dalhoff A. Quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Development during therapy and clinical significance. *Infection* 1994; **22 Suppl 2**: S111-21.
123. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3992–7.
124. Vickers AA, O’Neill AJ, Chopra I. Emergence and maintenance of resistance to fluoroquinolones and coumarins in *Staphylococcus aureus*: predictions from in vitro studies. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 269–73.
125. European Centre for Disease Prevention and Control. *Data from the ECDC Surveillance Atlas Antimicrobial resistance*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>.
126. Correia S, Poeta P, Hébraud M, *et al*. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol* 2017; **66**: 551–9.
127. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann*

- N Y Acad Sci* 2015; **1354**: 12–31.
128. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**: 358–73.
129. Ng EY, Trucksis M, Hooper DC. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 1881–8.
130. Kumagai Y, Kato JI, Hoshino K, *et al.* Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 710–4.
131. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, *et al.* Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1647–50.
132. Oteo J, Campos J. Uso de quinolonas y resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; **22**: 201–3.
133. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, *et al.* Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2009; **2**: 40–61.
134. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 337–418.
135. Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 2067–75.
136. Chapman JS, Georgopapadakou NH. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**: 438–42.
137. Hirai K, Aoyama H, Irikura T, *et al.* Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **29**: 535–8.
138. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA, *et al.* Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet (London, England)* 1998; **351**: 797–9.
139. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 5638–42.
140. Poirel L, Liard A, Nordmann P, *et al.* Origin of plasmid-mediated quinolone

BIBLIOGRAFÍA

- resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3523–5.
141. Cattoir V, Poirel L, Mazel D, *et al.* *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2650–1.
142. Jacoby GA, Griffin CM, Hooper DC. *Citrobacter spp.* as a source of *qnrB* alleles. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4979–84.
143. Zhang R, Ichijo T, Huang Y-L, *et al.* High prevalence of *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes Environ* 2012; **27**: 158–63.
144. Sánchez MB, Hernández A, Rodríguez-Martínez JM, *et al.* Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 1–14.
145. Velasco C, Rodríguez-Martínez JM, Briaies A, *et al.* *smaqnr*, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **65**: 239–42.
146. Da Fonseca EL, Vicente AC. Spread of the *qnrVC* quinolone resistance determinant in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 457.
147. Guillard T, Cambau E, Neuwirth C, *et al.* Description of a 2,683-base-pair plasmid containing *qnrD* in two *Providencia rettgeri* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 565–8.
148. Guillard T, Grillon A, De Champs C, *et al.* Mobile insertion cassette elements found in small non-transmissible plasmids in *Proteaeae* may explain *qnrD* mobilization. *PLoS One* 2014; **9**: 1–8.
149. Albornoz E, Tijet N, De Belder D, *et al.* *qnrE1*, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of *Enterobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: 1–8.
150. Vetting MW, Hegde SS, Fajardo JE, *et al.* The pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 2006; **45**: 1–10.
151. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, *et al.* *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2297–9.
152. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, *et al.* Plasmid-mediated quinolone

- resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat* 2016; **29**: 13–29.
153. Fonseca EL, Freitas FDS, Vieira V V., et al. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 1129–31.
154. Hegde SS. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science (80-)* 2005; **308**: 1480–3.
155. Xiong X, Bromley EHC, Oelschlaeger P, et al. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: Conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 3917–27.
156. Park KS, Lee JH, Jeong DU, et al. Determination of pentapeptide repeat units in Qnr proteins by the structure-based alignment approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4475–8.
157. Ellington MJ, Woodford N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: Self-imposed selection pressure? *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 1026–9.
158. Chatterji M, Sengupta S, Nagaraja V. Chromosomally encoded gyrase inhibitor GyrI protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch Microbiol* 2003; **180**: 339–46.
159. Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, et al. Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of *qnrB1*, *qnrD* and *smaqnr* genes by SOS-dependent regulation. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2854–9.
160. Da Re S, Garnier F, Guérin E, et al. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep* 2009; **10**: 929–33.
161. Wang M, Jacoby GA, Mills DM, et al. SOS regulation of *qnrB* expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 821–3.
162. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3050–2.
163. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 118–25.
164. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a

BIBLIOGRAFÍA

new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; **12**: 83–8.

165. Ruiz E, Ocampo-Sosa AA, Alcoba-Flórez J, *et al.* Changes in ciprofloxacin resistance levels in *Enterobacter aerogenes* isolates associated with variable expression of the *aac(6′)-Ib-cr* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1097–100.

166. Frasson I, Cavallaro A, Bergo C, *et al.* Prevalence of *aac(6′)-Ib-cr* plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae in Italy. *Gut Pathog* 2011; **3**: 12.

167. Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Romo-Rodríguez P, *et al.* CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**.

168. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, *et al.* Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas spp.* *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 231–7.

169. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3801–4.

170. Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, *et al.* Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1564–6.

171. Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2464–9.

172. Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, *et al.* Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3332–7.

173. Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, *et al.* Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 145–7.

174. Perez F, Rudin SD, Marshall SH, *et al.* OqxAB, a quinolone and olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of

- human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4602–3.
175. Hong BK, Wang M, Chi HP, et al. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3582–4.
176. Rodríguez-Martínez JM, de Alba PD, Briales A, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 68–73.
177. Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3354–60.
178. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edn. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015; 487.
179. Radman M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci* 1975; **5A**: 355–67.
180. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 2014; **38**: 1126–45.
181. Erill I, Campoy S, Barbé J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* 2007; **31**: 637–56.
182. Erill I, Jara M, Salvador N, et al. Differences in LexA regulon structure among Proteobacteria through *in vivo* assisted comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 6617–26.
183. Claverys J-P, Prudhomme M, Martin B. Induction of competence regulons as a general response to stress in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2006; **60**: 451–75.
184. Fernández De Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, et al. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2000; **35**: 1560–72.
185. Wade JT, Reppas NB, Church GM, et al. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev* 2005; **19**: 2619–30.
186. Courcelle J, Khodursky A, Peter B, et al. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 2001;

BIBLIOGRAFÍA

158: 41–64.

187. Goodman MF. Better living with hyper-mutation. *Environ Mol Mutagen* 2016; **57**: 421–34.

188. Pennington JM, Rosenberg SM. Spontaneous DNA breakage in single living *Escherichia coli* cells. *Nat Genet* 2007; **39**: 797–802.

189. McGlynn P, Savery NJ, Dillingham MS. The conflict between DNA replication and transcription. *Mol Microbiol* 2012; **85**: 12–20.

190. Lang KS, Merrih H. The clash of macromolecular titans: Replication-transcription conflicts in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2018; **72**: annurev-micro-090817-062514.

191. Wimberly H, Shee C, Thornton PC, *et al.* R-loops and nicks initiate DNA breakage and genome instability in non-growing *Escherichia coli*. *Nat Commun* 2014; **5**: 1.

192. Wadhawan S, Gautam S, Sharma A. A component of gamma-radiation-induced cell death in *E. coli* is programmed and interlinked with activation of caspase-3 and SOS response. *Arch Microbiol* 2013; **195**: 545–57.

193. Weigle JJ. Induction of mutations in a bacterial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1953; **39**: 628–36.

194. Hertman I, Luria SE. Transduction studies on the role of a *rec*⁺ gene in the ultraviolet induction of prophage lambda. *J Mol Biol* 1967; **23**: 117–33.

195. Green MH, Donch J, Greenberg J. An immediate effect of inhibition of DNA synthesis on cell division in a Lon strain of *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1969; **8**: 409–11.

196. Aertsen A, Michiels CW. Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2005; **58**: 1381–91.

197. Aertsen A, Tesfazgi Mebrhatu M, *et al.* Activation of the *Salmonella typhimurium* Mrr protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **367**: 435–9.

198. Korshunov S, Imlay JA. Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006; **188**: 6326–34.

199. Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 1991; **55**: 561–85.

200. Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, *et al.* Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science (80-)* 2012; **336**: 315–9.

201. Lewin CS, Amyes SGB. The role of the SOS response in bacteria exposed to

- zidovudine or trimethoprim. *J Med Microbiol* 1991; **34**: 329–32.
202. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, *et al.* SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 2004; **305**: 1629–31.
203. Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet* 2010; **6**: 1–10.
204. Butala M, Zgur-Bertok D, Busby SJW. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 82–93.
205. Schlacher K, Pham P, Cox MM, *et al.* Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. *Chem Rev* 2006; **106**: 406–19.
206. Story RM, Weber IT, Steitz TA. The structure of the *E. coli* RecA protein monomer and polymer. *Nature* 1992; **355**: 318–25.
207. Joo C, McKinney SA, Nakamura M, *et al.* Real-time observation of RecA filament dynamics with single monomer resolution. *Cell* 2006; **126**: 515–27.
208. Jiang Q, Karata K, Woodgate R, *et al.* The active form of DNA polymerase V is UmuD'(2)C-RecA-ATP. *Nature* 2009; **460**: 359–63.
209. Kim B, Little JW. LexA and lambda CI repressors as enzymes: specific cleavage in an intermolecular reaction. *Cell* 1993; **73**: 1165–73.
210. Luo Y, Pfuetzner RA, Mosimann S, *et al.* Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* 2001; **106**: 585–94.
211. Zhang APP, Pigli YZ, Rice PA. Structure of the LexA–DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature* 2010; **466**: 883–6.
212. Adikesavan AK, Katsonis P, Marciano DC, *et al.* Separation of recombination and SOS response in *Escherichia coli* RecA suggests LexA interaction sites. *PLoS Genet* 2011; **7**.
213. Butala M, Klose D, Hodnik V, *et al.* Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 6546–57.
214. Lin LL, Little JW. Isolation and characterization of noncleavable (Ind-) mutants of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1988; **170**: 2163–73.
215. Wade JT. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the

BIBLIOGRAFÍA

- Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev* 2005; **19**: 2619–30.
216. Culyba MJ, Kubiak JM, Mo CY, *et al.* Non-equilibrium repressor binding kinetics link DNA damage dose to transcriptional timing within the SOS gene network. *PLoS Genet* 2018; **14**: e1007405.
217. Patel M, Jiang Q, Woodgate R, *et al.* A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010; **45**: 171–84.
218. Sommer S, Boudsocq F, Devoret R, *et al.* Specific RecA amino acid changes affect RecA-UmuD' C interaction. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 281–91.
219. Schnarr M, Oertel-Buchheit P, Kazmaier M, *et al.* DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* 1991; **73**: 423–31.
220. Keyamura K, Sakaguchi C, Kubota Y, *et al.* RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2013; **288**: 29229–37.
221. Wurihan G, Brambilla E, Wang S, *et al.* DnaA and LexA proteins regulate transcription of the *uvrB* gene in *Escherichia coli*: The role of DnaA in the control of the SOS regulon. *Front Microbiol* 2018; **9**.
222. Pagès V, Koffel-Schwartz N, Fuchs RPP. *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 2003; **2**: 273–84.
223. Stohl EA, Brockman JP, Burkle KL, *et al.* *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 2003; **278**: 2278–85.
224. Lusetti SL, Drees JC, Stohl EA, *et al.* The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA function. *J Biol Chem* 2004; **279**: 55073–9.
225. Yasuda T, Morimatsu K, Horii T, *et al.* Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI. *EMBO J* 1998; **17**: 3207–16.
226. Cox MM. Regulation of bacterial RecA Protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; **42**: 41–63.
227. Bagdasarian M, Bailone A, Angulo JF, *et al.* PsiB, and anti-SOS protein, is transiently expressed by the F sex factor during its transmission to an *Escherichia coli* K-12 recipient.

- Mol Microbiol* 1992; **6**: 885–93.
228. Petrova V, Chitteni-Pattu S, Drees JC, *et al.* An SOS inhibitor that binds to free RecA protein: the PsiB protein. *Mol Cell* 2009; **36**: 121–30.
229. Drees JC, Chitteni-Pattu S, McCaslin DR, *et al.* Inhibition of RecA protein function by the RdgC protein from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2006; **281**: 4708–17.
230. Lusetti SL, Cox MM. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 71–100.
231. Cromie GA, Connelly JC, Leach DR. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell* 2001; **8**: 1163–74.
232. Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, *et al.* Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1994; **58**: 401–65.
233. Kowalczykowski SC, Eggleston AK. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 991–1043.
234. Chen Z, Yang H, Pavletich NP. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* 2008; **453**: 489–4.
235. Dillingham MS, Spies M, Kowalczykowski SC. RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase. *Nature* 2003; **423**: 893–7.
236. Taylor AF, Smith GR. RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. *Nature* 2003; **423**: 889–93.
237. Smith GR, Kunes SM, Schultz DW, *et al.* Structure of chi hotspots of generalized recombination. *Cell* 1981; **24**: 429–36.
238. Stahl FW. Chi: a little sequence controls a big enzyme. *Genetics* 2005; **170**: 487–93.
239. Handa N, Yang L, Dillingham MS, *et al.* Molecular determinants responsible for recognition of the single-stranded DNA regulatory sequence, χ , by RecBCD enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 8901–6.
240. Yang L, Handa N, Liu B, *et al.* Alteration of χ recognition by RecBCD reveals a regulated molecular latch and suggests a channel-bypass mechanism for biological control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 8907–12.
241. Wang J, Chen R, Julin DA. A single nuclease active site of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme catalyzes single-stranded DNA degradation in both directions. *J Biol Chem* 2000; **275**: 507–13.

BIBLIOGRAFÍA

242. Dixon DA, Kowalczykowski SC. The recombination hotspot chi is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *E. coli* RecBCD enzyme. *Cell* 1993; **73**: 87–96.
243. Dixon DA, Kowalczykowski SC. Homologous pairing in vitro stimulated by the recombination hotspot, Chi. *Cell* 1991; **66**: 361–71.
244. Anderson DG, Kowalczykowski SC. The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a chi-regulated manner. *Cell* 1997; **90**: 77–86.
245. Morimatsu K, Kowalczykowski SC. RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: E5133-42.
246. Umezu K, Chi NW, Kolodner RD. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 3875–9.
247. Morimatsu K, Kowalczykowski SC. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell* 2003; **11**: 1337–47.
248. Morimatsu K, Wu Y, Kowalczykowski SC. RecFOR proteins target RecA protein to a DNA gap with either DNA or RNA at the 5' terminus: implication for repair of stalled replication forks. *J Biol Chem* 2012; **287**: 35621–30.
249. Jaciuk M, Nowak E, Skowronek K, *et al.* Structure of UvrA nucleotide excision repair protein in complex with modified DNA. *Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**: 191–7.
250. Kisker C, Kuper J, Van Houten B. Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**: a012591.
251. Theis K, Skorvaga M, Machius M, *et al.* The nucleotide excision repair protein UvrB, a helicase-like enzyme with a catch. *Mutat Res* 2000; **460**: 277–300.
252. Moolenaar GF, Höglund L, Goosen N. Clue to damage recognition by UvrB: residues in the beta-hairpin structure prevent binding to non-damaged DNA. *EMBO J* 2001; **20**: 6140–9.
253. Moolenaar GF, Schut M, Goosen N. Binding of the UvrB dimer to non-damaged and damaged DNA: residues Y92 and Y93 influence the stability of both subunits. *DNA Repair*

(*Amst*) 2005; **4**: 699–713.

254. Skorvaga M, Theis K, Mandavilli BS, *et al.* The beta -hairpin motif of UvrB is essential for DNA binding, damage processing, and UvrC-mediated incisions. *J Biol Chem* 2002; **277**: 1553–9.

255. Skorvaga M, DellaVecchia MJ, Croteau DL, *et al.* Identification of residues within UvrB that are important for efficient DNA binding and damage processing. *J Biol Chem* 2004; **279**: 51574–80.

256. Truglio JJ, Karakas E, Rhau B, *et al.* Structural basis for DNA recognition and processing by UvrB. *Nat Struct Mol Biol* 2006; **13**: 360–4.

257. Truglio JJ, Rhau B, Croteau DL, *et al.* Structural insights into the first incision reaction during nucleotide excision repair. *EMBO J* 2005; **24**: 885–94.

258. Karakas E, Truglio JJ, Croteau D, *et al.* Structure of the C-terminal half of UvrC reveals an RNase H endonuclease domain with an Argonaute-like catalytic triad. *EMBO J* 2007; **26**: 613–22.

259. Yang W. Lessons learned from UvrD helicase: mechanism for directional movement. *Annu Rev Biophys* 2010; **39**: 367–85.

260. Caron PR, Kushner SR, Grossman L. Involvement of helicase II (*uvrD* gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the *uvrABC* protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 4925–9.

261. Goodman MF. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 17–50.

262. Foster PL. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; **42**: 373–97.

263. Yang W, Gao Y. Translesion and repair DNA polymerases: Diverse Structure and Mechanism. *Annu Rev Biochem* 2018; **87**: 239–61.

264. Shinagawa H, Iwasaki H, Kato T, *et al.* RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 1806–10.

265. Burckhardt SE, Woodgate R, Scheuermann RH, *et al.* UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 1811–5.

266. Woodgate R, Rajagopalan M, Lu C, *et al.* UmuC mutagenesis protein of *Escherichia*

BIBLIOGRAFÍA

- coli*: purification and interaction with UmuD and UmuD'. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 7301–5.
267. Bruck I, Woodgate R, McEntee K, *et al.* Purification of a soluble UmuD'C complex from *Escherichia coli*. Cooperative binding of UmuD'C to single-stranded DNA. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10767–74.
268. Jaszczur M, Bertram JG, Robinson A, *et al.* Mutations for worse or better: low-fidelity DNA synthesis by SOS DNA polymerase V is a tightly regulated double-edged sword. *Biochemistry* 2016; **55**: 2309–18.
269. Krishna S, Maslov S, Sneppen K. UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* SOS response: a quantitative model. *PLoS Comput Biol* 2007; **3**: e41.
270. Woodgate R, Levine AS. Damage inducible mutagenesis: recent insights into the activities of the Umu family of mutagenesis proteins. *Cancer Surv* 1996; **28**: 117–40.
271. Rangarajan S, Woodgate R, Goodman MF. 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* 1999; **96**: 9224–9.
272. Wang F, Yang W. Structural insight into translesion synthesis by DNA Pol II. *Cell* 2009; **139**: 1279–89.
273. Henrikus SS, van Oijen AM, Robinson A. Specialised DNA polymerases in *Escherichia coli*: roles within multiple pathways. *Curr Genet* 2018.
274. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 2010; **8**: e1000317.
275. Molina-Quiroz RC, Silva-Valenzuela C, Brewster J, *et al.* Cyclic AMP regulates bacterial persistence through repression of the oxidative stress response and SOS-dependent DNA repair in uropathogenic *Escherichia coli*. *MBio* 2018; **9**.
276. Quinones M, Kimsey HH, Waldor MK. LexA cleavage is required for CTX prophage induction. *Mol Cell* 2005; **17**: 291–300.
277. Kimsey HH, Waldor MK. *Vibrio cholerae* LexA coordinates CTX prophage gene expression. *J Bacteriol* 2009; **191**: 6788–95.
278. Nassar FJ, Rahal EA, Sabra A, *et al.* Effects of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin release and role of the SOS response. *Foodborne Pathog Dis* 2013; **10**: 805–12.

279. Ubeda C, Maiques E, Knecht E, *et al.* Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* 2005; **56**: 836–44.
280. Maiques E, Ubeda C, Campoy S, *et al.* beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2006; **188**: 2726–9.
281. Costa SB, Campos ACC, Pereira ACM, *et al.* Adherence to abiotic surface induces SOS response in *Escherichia coli* K-12 strains under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology* 2014; **160**: 1964–73.
282. Walter BM, Cartman ST, Minton NP, *et al.* The SOS response master regulator LexA is associated with sporulation, motility and biofilm formation in *Clostridium difficile*. *PLoS One* 2015; **10**: e0144763.
283. Gotoh H, Kasaraneni N, Devineni N, *et al.* SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling* 2010; **26**: 603–11.
284. Gómez-Gómez J-M, Manfredi C, Alonso J-C, *et al.* A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biol* 2007; **5**: 14.
285. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, *et al.* The SOS response controls integron recombination. *Science* 2009; **324**: 1034.
286. Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, *et al.* Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob DNA* 2011; **2**: 6.
287. Mo CY, Manning SA, Roggiani M, *et al.* Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics. *mSphere* 2016; **1**: e00163-16.
288. Cirz RT, Chin JK, Andes DR, *et al.* Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol* 2005; **3**: e176.
289. Cirz RT, Jones MB, Gingles NA, *et al.* Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol* 2007; **189**: 531–9.
290. Cirz RT, Romesberg FE. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 220–5.

BIBLIOGRAFÍA

291. Fijalkowska IJ, Dunn RL, Schaaper RM. Genetic requirements and mutational specificity of the *Escherichia coli* SOS mutator activity. *J Bacteriol* 1997; **179**: 7435–45.
292. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 2010; **37**: 311–20.
293. Long H, Miller SF, Strauss C, *et al.* Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: E2498-505.
294. Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 4629–34.
295. Mo CY, Culyba MJ, Selwood T, *et al.* Inhibitors of LexA autoproteolysis and the bacterial SOS response discovered by an academic–industry partnership. *ACS Infect Dis* 2018; **4**: 349–59.
296. Huang F, Motlekar NA, Burgwin CM, *et al.* Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem Biol* 2011; **6**: 628–35.
297. Schröder W, Goerke C, Wolz C. Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 529–38.
298. Sharma V, Sakai Y, Smythe KA, *et al.* Knockdown of *recA* gene expression by artificial small RNAs in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **430**: 256–9.
299. Alam MK, Alhhazmi A, DeCoteau JF, *et al.* RecA inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. *Cell Chem Biol* 2016; **23**: 381–91.
300. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Breakpoints and Epidemiological Cut-Off values*. 2016. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
301. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edn. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015; 427.
302. Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2018; **6**.
303. Baquero F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updat* 2001; **4**: 93–105.
304. Machuca J, Briales A, Labrador G, *et al.* Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia*

- coli*. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3203–15.
305. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Sixth Informational Supplement M100-S26*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2016.
306. Tamae C, Liu A, Kim K, *et al*. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2008; **190**: 5981–8.
307. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, *et al*. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 1240–3.
308. Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, *et al*. The *Escherichia coli* SOS gene *dinF* protects against oxidative stress and bile salts. *PLoS One* 2012; **7**: e34791.
309. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 1-10
310. Schentag JJ, Meagher AK, Forrest A. Fluoroquinolone AUIC break points and the link to bacterial killing rates. Part 2: human trials. *Ann Pharmacother* 2003; **37**: 1478–88.
311. Schentag JJ. Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. *Clin Infect Dis* 2000; **31 Suppl 2**: S40-4.
312. Wright DH, Brown GH, Peterson ML, *et al*. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother* 2000; **46**: 669–83.
313. Li Y, Zhu G, Ng WJ, *et al*. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Sci Total Environ* 2014; **468–469**: 908–32.
314. Yeiser B, Pepper ED, Goodman MF, *et al*. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 8737–41.
315. Hoffman LR, D’Argenio DA, MacCoss MJ, *et al*. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005; **436**: 1171–5.
316. Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, *et al*. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 19484–9.
317. Briales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, *et al*. *In vitro* effect of *qnrA1*, *qnrB1*, and *qnrS1* genes on fluoroquinolone activity against isogenic *Escherichia coli* isolates with mutations in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1266–9.
318. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, *et al*. Spatiotemporal microbial evolution on

BIBLIOGRAFÍA

antibiotic landscapes. *Science (80-)* 2016; **353**: 1147–51.

319. Baym M, Stone LK, Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science (80-)* 2016; **351**: aad3292-aad3292.

320. Nautiyal A, Patil KN, Muniyappa K. Suramin is a potent and selective inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response: RecA as a potential target for antibacterial drug discovery. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1834–43.

321. Bunnell BE, Escobar JF, Bair KL, *et al.* Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli*. *PLoS One* 2017; **12**: e0178303.

322. Bellio P, Di Pietro L, Mancini A, *et al.* SOS response in bacteria: Inhibitory activity of lichen secondary metabolites against *Escherichia coli* RecA protein. *Phytomedicine* 2017; **29**: 11–8.

323. Yakimov A, Pobegalov G, Bakhlanova I, *et al.* Blocking the RecA activity and SOS-response in bacteria with a short α -helical peptide. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: 9788–96.

324. Bellio P, Brisdelli F, Perilli M, *et al.* Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in *Escherichia coli*. *Phytomedicine* 2014; **21**: 430–4.

325. Zeng X, Lin J. Factors influencing horizontal gene transfer in the intestine. *Anim Heal Res Rev* 2017; **18**: 153–9.

326. Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat Rev Genet* 2017; **18**: 690–9.

VIII. ANEXOS

ANEXO I. Publicaciones en revistas derivadas del trabajo en el laboratorio

1. *Cellular response to ciprofloxacin in Low-Level Quinolone-Resistant Escherichia coli.*

Machuca J, Recacha E, Briales A, Díaz de Alba P, Blázquez J, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM. *Frontiers in microbiology*. Julio de 2017.

2. *Molecular topology: A new strategy for antimicrobial resistance control.*

Zanni R, Galvez-Llompart M, Machuca J, García-Domenech R, Recacha E, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM, Galvez J. *European Journal of medicinal chemistry*. Septiembre de 2017.

3. *Cytotoxic effect associated with overexpression of QNR proteins in Escherichia coli.*

Machuca J, Díaz de Alba P, Recacha E, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM. *Microbial drug resistance*. Octubre de 2017.

4. *Impact of AAC(6)-Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in Escherichia coli.*

Machuca J, Ortiz M, Recacha E, Díaz de Alba P, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Martínez JM, Pascual A. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. Noviembre de 2016.

ANEXO II. Observaciones sobre la cuantificación de la mutagénesis

La medición de la mutagénesis bacteriana inducida por estrés se considera un tema controvertido. En la literatura, existen autores que han optado por utilizar el parámetro de frecuencia de mutantes en sus experimentos y otros se han decantado por la tasa de mutación.

La diferencia fundamental entre ambos es que la frecuencia de mutantes representa la proporción de mutantes en la población, la cual depende de factores como el tamaño poblacional o el momento en el que aparece la primera mutación, y la tasa de mutación refleja la probabilidad de que suceda una mutación por cada ciclo de replicación bacteriana. El principal problema de la frecuencia de mutantes, además de ser menos informativa es su baja reproducibilidad. Sin embargo, la utilización de la tasa de mutación, ha requerido normalmente de un alto número de réplicas y conocimientos específicos de informática no disponibles en todos los laboratorios.^{1,2}

En nuestro trabajo, la mutagénesis fue calculada inicialmente como frecuencia de mutantes. El objetivo era analizar la diferencia en la mutabilidad entre cepas con la respuesta SOS intacta y aquellas con la respuesta SOS suprimida, suponiendo en cualquier caso que ambos grupos estarían afectados por los mismos factores y podría ser un parámetro válido. Sin embargo, sugerencias posteriores llevadas a cabo por los revisores en el proceso de publicación del artículo 2, propiciaron la sustitución por la tasa de mutación. Se utilizó el programa FALCOR (*Fluctuation Analysis CalculatOR*) que permitió calcular la tasa de mutación con un bajo número de réplicas, pudiendo aprovechar los resultados de los recuentos utilizados en la frecuencia de mutantes.¹ Los datos de frecuencia de mutantes correlacionaron con los datos de tasa de mutación y se muestran en la tabla.

A pesar de elegir la tasa de mutación como parámetro, hay que considerar otros factores. Un estudio reciente afirma que los ensayos de mutagénesis inducida por estrés deben tener en cuenta la dinámica de la población e incluir la tasa de muerte en el cálculo de la tasa de mutación. El tamaño final de la población es usado para inferir el número de divisiones del ADN, parámetro crucial en el desarrollo adaptativo de una

ANEXOS

población. Sin embargo, si se produce muerte celular, serán necesarias más divisiones para alcanzar ese tamaño poblacional. Si no se tiene en cuenta la tasa de muerte, se sobreestimaré la tasa de mutación. Este trabajo demuestra como concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos como norfloxacino, son responsables de la sobreestimación de la tasa de mutación, reduciéndose de forma significativa al incluir la tasa de muerte, y como una tasa de mutación elevada no conduce a una mayor diversidad genética si la dinámica de la población resulta afectada (en presencia de un tamaño poblacional reducido).³

| Cepa | CMI ^a | Frecuencia de mutantes | | | |
|------------|------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | | 1 mg/L de CIP | 2,5 mg/L de CIP | 1xCMI de CIP | 4xCMI de CIP |
| ATCC 25922 | 0,004 | < 3x10 ⁻⁸ | ND | 7x10 ⁻¹ | 4x10 ⁻⁷ |
| ATCC ΔrecA | 0,001 | < 4x10 ⁻⁷ | ND | 5x10 ⁻⁷ | <3x10 ⁻⁹ |
| ATCC lexA1 | 0,002 | < 8x10 ⁻⁷ | ND | 2x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻⁸ |
| EC02 | 0,06 | < 2x10 ⁻⁸ | ND | 9x10 ⁻¹ | 2x10 ⁻⁵ |
| EC02 ΔrecA | 0,008 | < 5x10 ⁻⁷ | ND | 3x10 ⁻³ | < 3x10 ⁻⁹ |
| EC04 | 0,5 | 10 ⁻⁴ | < 4x10 ⁻⁸ | 6x10 ⁻¹ | 6x10 ⁻⁶ |
| EC04 ΔrecA | 0,125 | < 2x10 ⁻⁸ | < 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | < 4x10 ⁻⁹ |
| EC04 lexA1 | 0,5 | 3x10 ⁻⁵ | < 4x10 ⁻⁸ | 2x10 ⁻¹ | 8x10 ⁻⁷ |
| EC08 | 2 | ND ^b | 3x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻¹ | 8x10 ⁻⁸ |
| EC08 ΔrecA | 0,5 | ND | < 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | < 7x10 ⁻⁹ |
| EC09 | 4 | ND | ND | 4x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻⁷ |
| EC09 ΔrecA | 1 | ND | 3x10 ⁻⁵ | 2x10 ⁻⁷ | < 8x10 ⁻⁹ |
| EC09 lexA1 | 2 | ND | 5x10 ⁻¹ | 3x10 ⁻² | 7x10 ⁻⁸ |

^a CMI (por microdilución) de ciprofloxacino (CIP) (mg/L)

^b ND: No determinado

Los datos de frecuencia de mutantes corresponden a la media de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar estuvieron dentro del 15% de la media

Bibliografía

1. Couce A, Blázquez J. Estimating mutation rates in low-replication experiments. *Mutat Res* 2011; **714**: 26–32.
2. Zheng Q. A cautionary note on the mutation frequency in microbial research. *Mutat Res* 2018; **809**: 51–5.
3. Frenoy A, Bonhoeffer S. Death and population dynamics affect mutation rate estimates and evolvability under stress in bacteria. *PLoS Biol* 2018; **16**: e2005056.

ANEXO III. Material suplementario

Supplementary material for:

Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response

E. Recacha^{1,2, *}, J. Machuca^{1,3,4, *}, P. Díaz de Alba¹, M. Ramos-Guelfo¹, F. Docobo-Pérez^{2,3,4}, J. Rodríguez-Beltrán^{3,4}, J. Blázquez^{5,6}, A. Pascual^{1,2,3,4, ♦}, J.M. Rodríguez-Martínez^{2,3,4, ♦, *}

¹Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain; ²Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ³Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁴Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ⁵Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; ⁶Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain.

♦ Equal contribution; ♠ Equal contribution

* Corresponding author: Mailing address: Department of Microbiology; University of Seville. Avda Sánchez Pizjuán s/n. 41009 Spain. E-mail: jmrodriguez@us.es

MBio. 2017 Oct 10;8(5). pii: e00971-17. doi: 10.1128/mBio.00971-17.

Supplementary Methods

Strains, growth conditions and antimicrobial agents

Wild-type *E. coli* ATCC 25922 was used as the starting strain for all constructions (Table 1). This strain is routinely used in clinical laboratories as a control for antimicrobial susceptibility tests (www.atcc.org).¹ *E. coli* ATCC 25922 (wild-type) and isogenic EC02, EC04, EC08, EC09 and EC59 strains represent progressive degrees of fluoroquinolone resistance, ranging from susceptible to resistant. These strains harbor multiple chromosomally-mediated (GyrA and/or ParC modifications, a *marR* deletion that explains *acrAB*-TolC efflux pump overproduction) and plasmid-mediated (*qnrS*) resistance mechanisms (Table 1). *E. coli* ME12 *lexA1* (ME12 *lexA1 malB::Tn9*) was used as the source of *lexA* to *lexA1* gene replacement.²

Liquid or solid Luria Bertani medium (LB) was routinely used. Mueller-Hinton broth (MHB) and M9 minimal medium containing glucose as the sole carbon source were used as required for susceptibility and fluorescence assays, respectively. Strains were grown at 37°C. 30 mg/L kanamycin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in selective media was used for pBK-CMV and pMSrecA-gfp stability (Table S1B).

The following quinolones were used for the different assays: nalidixic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), ciprofloxacin (Sigma-Aldrich), levofloxacin (Sigma-Aldrich), moxifloxacin (Sigma-Aldrich), norfloxacin (Sigma-Aldrich) and ofloxacin (Sigma-Aldrich). Stock solutions were prepared in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (www.clsi.org).¹

Isogenic strain construction

lexA1 mutants (coding for a LexA G80D substitution)² were obtained by gene replacement, as previously described (Table 1, Table S1B).^{3,4} Briefly, an internal fragment of mutated gene from *E. coli* ME12 *lexA1* strain was cloned into a conventional pBK-CMV vector using specific primers, shown in Table S1B. Then, the mutated fragment was subcloned into the BamH1 site of suicide plasmid pST76-C. The construction was

introduced into the corresponding *E. coli* mutant by electroporation. The mutated fragment was inserted into the chromosome by homologous recombination. The resolution process was mediated by the pUC19RP12 vector and confirmed by PCR.

Disruption of the *recA* gene was carried out with a modified version of the method described by Datsenko and Wanner.⁵ Briefly, a kanamycin resistance gene from the pKD4 vector was amplified by PCR from genomic DNA using primers with 5' extensions homologous to the *recA* gene (see Table S1B). The Red helper plasmid, pKOBEG, a low copy number plasmid vector containing exonuclease and the β and γ functions of phage λ , was used to enhance the recombination process. The kanamycin resistance cassette was then eliminated using helper plasmid, pCP20, which encodes FLP recombinase, and subsequently cured.

The *qnrS* gene (including the promoter sequences ~150bp upstream of the encoding sequence) was cloned into the kanamycin-resistant pBK-CMV vector (in the opposite orientation with respect to the P_{lac} promoter) and electroporated into EC59 and its derivative mutants.³

Monitoring the induction of the SOS system

To validate the constructions aimed at inactivating the SOS response, the low-copy plasmid, pMSrecA-gfp, a GFP reporter-promoter fusion,⁶ was used to quantitate *recA* promoter activity (SOS induction) after the addition of ciprofloxacin (Table S1B). This construction was introduced into all mutants in our collection by electroporation. After overnight culture in LB, bacterial suspensions were diluted 10^{-2} -fold in 5 mL LB (containing kanamycin) for 6 h at 37°C with shaking (250 rpm) in a light-protected environment. Cells were diluted to achieve an OD_{625nm} of 0.1 (*ca.* 10^8 CFU/mL), then diluted 10^{-2} -fold in M9 medium at fixed (1 mg/L or 2.5 mg/L) or sublethal (1xMIC) concentrations of ciprofloxacin, or without ciprofloxacin, and transferred to 96-well, white flat bottom microplates. The microplates were read using the Infinite 200PRO multimode microplate reader (Tecan, Madrid, Spain). The excitation/emission wavelengths used were 485/535 nm. Each experiment was performed at least in quintuplicate. Average fluorescence was monitored for 24 h. Data were normalized to

the non-induced control (by extracting the fluorescent background) and relative to bacterial density (OD_{595nm}).

Bacterial growth rates

After overnight culture in LB at 37°C, bacterial suspensions were properly diluted to achieve an OD_{625nm} of 0.1 (*ca.* 10⁸ CFU/mL), then diluted 10⁻²-fold in M9 medium and 10⁻⁴-fold in MHB medium containing sublethal (0.5xMIC) or fixed concentrations of antimicrobial agent (1 mg/L, breakpoint for resistance according to EUCAST, or 2.5 mg/L, human serum C_{max} for ciprofloxacin).^{7,8} One hundred and fifty microliters of the diluted bacterial culture were then distributed among 96-well transparent flat bottom plates. The plates were sealed with transparent tape. The cultures were incubated at 37°C on an orbital shaker and agitated (2-mm orbital shaking, 450 rpm, 10 s) for 48 h and measured with an Infinite 200 PRO plate reader (Tecan). Optical density (OD_{595nm}) measurements were obtained every 20 min. At least six biological replicas were measured for each condition in at least two independent assays.

Microbial cell viability assays (ATP production)

The luminescence-based BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega) was used to determine the metabolic activity and viability of all mutants in this collection (Table 1) based on the SOS system induction status. This is a homogeneous procedure that determines the number of viable bacterial cells in a culture by quantifying ATP production (as an indicator of metabolically active cells). Cells were exposed to sublethal (0.5xMIC) ciprofloxacin concentrations of the tested strains harbouring a non-modified SOS system (*i.e.* intact *recA* and *lexA* genes) or fixed concentrations (1 mg/L meaning breakpoint for resistance according to EUCAST or 2.5 mg/L meaning serum C_{max} for ciprofloxacin) in MHB.^{7,8} Growth in drug-free broth was evaluated in parallel as a control. Cultures were incubated at 37°C, with shaking at 250 rpm. An initial inoculum of 10⁶ CFU/mL was used in all experiments. ATP production was determined at 0, 2, 4, 6, 8 and 24 h. At each time-point, the cells were washed with PBS and 100 µL of culture was mixed in a 1:1 proportion with BacTiter-Glo Reagent and distributed among 96-well, white flat bottom plates. ATP concentrations were measured using a luminometer

(Veritas, Turner Biosystems). At least six biological replicas under each condition were measured in at least two independent assays.

Quantification of live/dead bacteria by fluorescence

The Molecular Probes™ LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability kit (Invitrogen) was used to show the impact of SOS inactivation after a short period of antimicrobial exposure. This two-color fluorescence assay of bacterial viability uses a mixture of the green and red fluorescent nucleic acid stains, SYTO9 and propidium iodide (PI), respectively. With appropriate mixtures of the SYTO9 and PI stains, bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green, whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red, according to the kit instructions.

Cells were exposed at 1xMIC and 4xMIC ciprofloxacin concentration of the tested strains harbouring a non-modified SOS system (*i.e.* intact *recA* and *lexA* genes) or to a fixed concentration (1 mg/L, the breakpoint for resistance according to EUCAST; or 2.5 mg/L, the serum C_{max} for ciprofloxacin).^{7,8}

Fluorescence intensity was measured as follows in an Infinite 200Pro multireader. First, cells were cultured overnight in LB and diluted to achieve an OD_{625nm} of 0.1 (*ca.* 10^8 CFU/mL), then diluted 10^{-2} -fold in MHB and exposed to ciprofloxacin. After 4h, samples were centrifuged at 4,500 rpm for 5 min at 4°C and washed once in ice cold saline solution before staining, in accordance with the kit instructions (1.5 μ L of a 3.34 mM solution of SYTO9 in DMSO and 1.5 μ L of a 20 mM solution of PI in DMSO in 1 mL of cells). Two hundred microliter aliquots were then transferred in quintuplicate to 96-well microtiter plates. Fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 485/535 nm for SYTO9, and 535/590 nm for PI. Data were normalized as a SYTO9/PI ratio.

Fluorescence microscopy assays were performed using the Axio Vert.A1 system (Zeiss) and ZEN (blue edition, 2011) software. ImageJ 1.48v software (National Institute of Health, USA) was used for image analysis. Aliquots (2 mL) of exponentially growing cells ($\sim 10^8$ CFU/mL) were incubated with ciprofloxacin and shaken (250rpm) for 4 h at 37°C, as previously indicated, then prepared for staining, as described above. Two microliters

of each culture was used to prepare the samples, and images of the cells were obtained using an AxioCam 503 color microscope camera fitted with a 40x objective.

The number of viable cells was also quantified by flow cytometry (CYTOMICS FC500-MPL, Beckman Coulter). For this assay, cells were cultured in the same way and exposed to ciprofloxacin for 60 min. To prepare the cells for measurement, 1 mL of cell culture was washed once in ice cold PBS and resuspended in 1 mL of saline solution, stained according to the kit instructions, then incubated for 15 min before counting. The following PMT voltages were used: FL1 420, FL3 560. At least 10,000 cells per sample were collected. Flow cytometry acquisition was performed at a low flow rate (~30 events/s).⁹

Mice

Male immunocompetent C57BL/6 mice were obtained from the University of Seville and allowed to acclimatize for at least 1 week before the experiments began. The mice were housed in individually ventilated cages under specific pathogen-free conditions and water and standard food were given *ad libitum*. All animals were cared for in accordance with national guidelines and the studies were performed in accordance with guidelines approved by the Ethics and Clinical Research Committee of the Virgen Macarena and Virgen del Rocio University Hospitals (Reference Number 1086-N-15).

Pharmacokinetics and pharmacodynamics

Pharmacokinetic serum data from our previous work was used to construct a mathematical pharmacokinetic model.¹⁰ The observed ciprofloxacin concentrations in mice were fitted to a two-compartment model (intraperitoneal space and blood) using ADAPT5 software using the following differential equations.¹¹

$$XP_1 = R_1 - (X_1 \times K_{cp}) + (X_2 \times K_{pc})$$

$$XP_2 = (X_1 \times K_{cp}) - (X_2 \times K_{pc}) - (X_2 \times \frac{Cl}{V_p})$$

Where R_1 is the infusion of ciprofloxacin into the central compartment (peritoneum). X_1 and X_2 are the amounts of ciprofloxacin (mg) in the central compartment and peripheral compartment (blood), respectively. Cl is the clearance of ciprofloxacin from the peripheral compartment (L/h). V_p (L) is the volume of distribution of the drug in the peripheral compartment, and K_{cp} and K_{pc} are the first-order intercompartmental rate constants.

A range of dosages were simulated in order to obtain a favorable pharmacokinetic parameter of $AUC_{0-24h}/MIC \sim 50$ or ~ 100 , adjusted to the SOS-deficient strain in the isogenic pair EC08/EC08recA (EC08recA, ciprofloxacin MIC=0.5 mg/L).

Experimental model

Male immunocompetent C57BL/6 mice weighing 16 to 18 g were used. Using a murine model of peritoneal sepsis, the minimum lethal dose (MLD) for EC08 and EC08recA strains was determined as follows. Briefly, groups of 10 mice were infected intraperitoneally with 0.5 mL of bacterial suspension over a range of concentrations. Mortality was then monitored for 72h. The MLD for EC08 and EC08recA strains was set as the starting inoculum for further experiments (0.5 ml in a 1:10 dilution of an overnight culture, about 5×10^7 CFU/mL). Next, the murine model of peritoneal sepsis was used to evaluate the efficacy of ciprofloxacin between EC08 and EC08recA. Mice were infected intraperitoneally using the MLD. Two hours post-infection, antimicrobial therapy started. Animals were randomly assigned to different therapeutic groups: Group 1: ciprofloxacin administered intraperitoneally at 50 mg/Kg q12h; Group 2: ciprofloxacin administered intraperitoneally at 100 mg/Kg q12h; and the control group (no treatment).

At 24 h, the bacterial loads in the spleens of 15 mice per strain and ciprofloxacin dosage were determined. The spleens of mice that died during the experiment or were sacrificed (by lethal dose of sodium thiopental) were aseptically extracted, then weighed and processed for quantitative cultures, after being homogenized in 2 mL of sterile saline solution (Stomacher 80; Tekmar Co., Cincinnati, OH, USA). After a 10-fold dilution,

aliquots of 100 μ L were plated on Mueller-Hinton agar plates and incubated at 37°C overnight.

ROS detection using DCFH-DA

In order to determine whether changes in susceptibility, associated with an active or inactive SOS response, correlated with ROS formation, the radical-sensitive reporter dye, fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich), was used to examine the levels of oxidizing radicals. Overnight cultures were diluted 10^{-2} -fold in M9 minimal medium and grown to an OD_{600nm} of ~ 0.2 before adding the antibiotic. DCFH-DA was added after 2.5 h at a final concentration of 5 μ M. Microplate assays were read using an Infinite 200 PRO multimode microplate reader (Tecan). Excitation/emission wavelengths used were 485/535 nm. Average fluorescence was determined at 0 h (baseline) and at 18 h for microplate assays. Data were normalized to a no-dye control (background fluorescence) and OD_{595nm} (bacterial density). Bacterial cells were treated with ciprofloxacin at a concentration of 1 mg/L. At least six biological replicas per condition were measured in at least two independent assays.

Supplementary Results

Generation of *recA*-deficient and *lexA* mutant strains in *E. coli*

While other studies have used strains with inactivated LexA or deleted *recA* in highly-susceptible wild-type phenotypes to validate the SOS pathway as a therapeutic target, none of them have evaluated the spectrum of SOS activity against resistant or low-level resistant phenotypes in order to bring about a process of re-sensitization that could be used as an additional strategy for therapeutic use against resistant bacteria. To this end, we derived a series of *E. coli* ATCC 25922 strains that enabled us to systematically examine the consequences of altered SOS activity in terms of re-sensitization using a model against fluoroquinolones. The aim was to engineer strains with *lexA* variations (*lexA1*) or deleted *recA* with respect to the wild-type SOS phenotypes that would span the range of natural SOS system induction, partial SOS activation and finally constitutive SOS inactivation in a set of multiple quinolone resistance genotypes and phenotypes (Figure 1, Table 1).

The LexA1 enzyme that was generated in this set of strains with the gene replacement technique was a “hypoactive” G80D mutant, which has a very low cleavage rate;¹² deletion of the *recA* gene (the major SOS activator and sensor of DNA damage) led to constitutive SOS inactivation.

Several approaches were taken to verify the effectiveness of SOS inactivation in our collection. Induction of the SOS system was monitored with pMS*recA*-gfp, the gfp reporter-promoter fusion⁶ to quantify *recA* promoter activity (SOS induction) after the addition of ciprofloxacin at sublethal (1xMIC with respect or not to the MIC of the SOS wild-type) and fixed concentrations (of 1 mg/L or 2.5 mg/L) (data at 4 h are shown) (Figure S1). Both *recA*-deleted variants and *lexA1* mutants showed that induction of the SOS response (pMS*recA*-gfp) was drastically reduced under these conditions. For example, at 1xMIC of ciprofloxacin, the reduction was of 90-94% in Δ *recA* variants and 80-88% in *lexA1* mutants. At the fixed 1 mg/L concentration of ciprofloxacin, the reduction was in the range of 92-97% in Δ *recA* variants and around 86% in *lexA1*

mutants, and at 2.5 mg/L, it was around 98% in $\Delta recA$ variants and around 90% in *lexA1* mutants (Figure S1). It was not possible to evaluate the results for the ATCC wild-type strain at the fixed ciprofloxacin concentrations due to its high level of susceptibility, which explains the elevated level of DNA damage and cell death. Interestingly, even the EC02 strain (coding only for a S83L substitution and with a low MIC value, 0.06 mg/L) had a detectable SOS response under the relevant therapeutic concentrations.

In addition, a comparison of isogenic pairs according to SOS system induction status using disk diffusion susceptibility tests and/or fluorescent microscopy showed these differences of SOS induction in the generated collection (Figure S1).

Monitoring bacterial *in vitro* growth in the presence of quinolones

In vitro growth curves were analyzed at subinhibitory concentrations of ciprofloxacin (0.5xMIC based on the susceptibility of strains with unmodified SOS systems) or at fixed concentrations (1 mg/L breakpoint for resistance according to EUCAST, or 2.5 mg/L serum C_{max} for ciprofloxacin).^{7,8} At fixed concentrations, growth was observed only in the specific cases of the isogenic pairs EC08/EC08recA, EC09/EC09recA and EC59/EC59recA. At 1 mg/L of ciprofloxacin, only strains EC08 (and not EC08recA), EC09 (and not EC09recA), EC59 and EC59recA grew (Figure S6) at both 8 h and 24 h (this behavior was stable after 48 h). Growth rates (OD_{595nm}) for EC08/EC08recA were 0.27/0.08 at 8 h and 0.56/0.08 at 24 h ($P < 0.001$). Interestingly, EC59recA clearly showed delayed growth (Figure S6, Figure S8A). Growth curve studies with 2.5 mg/L of ciprofloxacin showed that only the EC09 (and not EC09recA), EC59 and EC59recA strains grew (Figure S6) at both 8 h and 24 h (this behavior was stable after 48 h). Growth rates (OD_{595nm}) for EC09/EC09recA were 0.13/0.08 at 8 h and 0.32/0.08 at 24 h; for EC59/EC59recA, they were 0.33/0.12 at 8 h and 0.61/0.32 at 24 h ($P < 0.001$). In the case of EC59recA, delayed growth was even more obvious ($P < 0.001$). In the presence of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin (0.5xMIC according to the susceptibility of strains with unmodified SOS systems), obvious differences were also observed for all isogenic pairs and growth was observed only in strains harboring the wild-type SOS response (OD_{595nm} : ~ 0.4 vs ~ 0.08 at 8 hours, $P < 0.001$) (Figure S6, Figure S8A). Worthy of note, at subinhibitory concentrations, the most resistant strains, EC08, EC09 and EC59,

showed delayed growth after 24 h of incubation, compared with the most susceptible strains, ATCC, EC02 and EC04. These data support the efficacy of inactivating the SOS response in LLQR or resistant strains in order to prevent bacterial growth at relevant fluoroquinolone concentrations, or in accordance with MIC values, over shorter and longer periods of time. Moreover, a clear correlation were observed when bacterial viability was measured in terms of ATP production (Figure S8BC).

SOS inactivation leads to increased ROS in resistant strains

At the test concentration (1 mg/L of ciprofloxacin), only minor but significant differences of ROS production were observed for susceptible isogenic groups (ATCC, EC02, EC04) ($p < 0.05$). No significant differences were observed in the highly resistant group (EC59). The tested concentration was too high in the first case and too low in the second case to show clearer differences in ROS production. However, at this clinically relevant concentration of ciprofloxacin, strong significant differences ($p < 0.001$) were observed in the isogenic EC08 and EC09 groups, the ones in which a process of resensitization of clinical category had previously been noted. SOS inactivation led to 2.9-fold and 4.2-fold increases in ROS production, associated with LexA1 modification and *recA* gene deletion, compared with the EC09 mutant, and to a 10.3-fold increase, associated with a *recA* gene deletion, compared with the EC08 mutant (Figure S7). No differences were observed in the absence of the drug, indicating that the observed differences were related to drug response and SOS modulation (data not shown). This association between increased ROS production and SOS inactivation following treatment with a bactericidal antibiotic (1 mg/L of ciprofloxacin) suggests that ROS may actively contribute to the bactericidal activity of fluoroquinolones.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. (A) Genotypes and fluoroquinolone susceptibility (by microdilution) of isogenic strains. (B) Oligonucleotides and plasmids used in this study.

Table S1A. Genotypes and fluoroquinolone susceptibility (by microdilution) of isogenic strains.

| Strain ^a | Mechanism of quinolone resistance | | | | | SOS system | MIC (Fold) ^{b,d} | | | | | | CC (CLSI/EUCAST) ^c | Source or reference |
|---------------------|-----------------------------------|--------------|-------------|-------------|------------|----------------------|---------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|---------|-------------------------------|---------------------|
| | <i>gyrA1</i> | <i>gyrA2</i> | <i>parC</i> | <i>marR</i> | <i>qnr</i> | | CIP | LVX | MXF | NFX | OFX | NAL | | |
| ATCC ^e | - | - | - | - | - | WT ^f | 0.004 | 0.015 | 0.015 | 0.03 | 0.03 | 2 | S/S | (3) |
| ATCCrecA | - | - | - | - | - | Δ <i>recA</i> | 0.001 (4) | 0.002 (8) | 0.001 (15) | 0.015 (2) | 0.008 (4) | 1 (2) | S/S | This study |
| ATCClexA1 | - | - | - | - | - | <i>lexA1</i> | 0.002 (2) | 0.008 (2) | 0.015 (1) | 0.015 (2) | 0.03 (1) | 2 (1) | S/S | This study |
| EC02 | S83L | - | - | - | - | WT | 0.06 | 0.125 | 0.06 | 0.5 | 0.5 | 256 | S/S | (3) |
| EC02recA | S83L | - | - | - | - | Δ <i>recA</i> | 0.008 (8) | 0.03 (4) | 0.015 (4) | 0.25 (2) | 0.125 (4) | 128 (2) | S/S | This study |
| EC04 | S83L | - | S80R | - | - | WT | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1 | 0.5 | 256 | S/S | (3) |
| EC04recA | S83L | - | S80R | - | - | Δ <i>recA</i> | 0.125 (4) | 0.125 (4) | 0.125 (4) | 0.5 (2) | 0.25 (2) | 256 (1) | S/S | This study |
| EC04lexA1 | S83L | - | S80R | - | - | <i>lexA1</i> | 0.5 (1) | 0.5 (1) | 0.5 (1) | 0.5 (2) | 0.5 (1) | 256 (1) | S/S | This study |
| EC08 | S83L | D87N | S80R | - | - | WT | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 256 | I/R | (3) |
| EC08recA | S83L | D87N | S80R | - | - | Δ <i>recA</i> | 0.5 (4) | 0.5 (4) | 0.5 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 256 (1) | S/S | This study |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|------|------|------|---------------|------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|-----|------------|
| EC09 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | - | WT | 4 | 4 | 4 | 8 | 8 | 512 | R/R | (3) |
| EC09recA | S83L | D87N | S80R | Δ marR | - | Δ recA | 1 (4) | 1 (4) | 1 (4) | 2 (4) | 2 (4) | 256 (2) | S/I | This study |
| EC09lexA1 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | - | lexA1 | 2 (2) | 2 (2) | 2 (2) | 2 (4) | 2 (4) | 256 (2) | I/R | This study |
| EC59 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | qnrS | WT | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 512 | R/R | (3) |
| EC59recA | S83L | D87N | S80R | Δ marR | qnrS | Δ recA | 8 (4) | 16 (2) | 8 (4) | 8 (4) | 16 (2) | 512 (1) | R/R | This study |
| EC59lexA1 | S83L | D87N | S80R | Δ marR | qnrS | lexA1 | 32 (1) | 32 (1) | 32 (1) | 32 (1) | 32 (1) | 512 (1) | R/R | This study |

^aGenotype. Strains are isogenic to *E. coli* ATCC 25922 and carry only chromosomal modifications, *qnrS* gene and/or SOS dysfunction [*recA* deletion or non-proteolizable LexA variants (LexA1)]. Resistance-associated mutations located in the GyrA and ParC proteins have been defined as resistance mechanisms that alter the target site

^bMIC (mg/L) of ciprofloxacin by Etest

^c CC (CLSI/EUCAST) means clinical categories for ciprofloxacin according to CLSI or EUCAST breakpoints^{1,7}

^d Number of fold reduction in MIC of each quinolone compared to wild-type strain for the SOS system in each isogenic subgroup

^e *E. coli* ATCC 25922

^f Wild-type

S, susceptible; I, intermediate susceptibility; R, resistance

Table S1B. Oligonucleotides and plasmids used in this study.

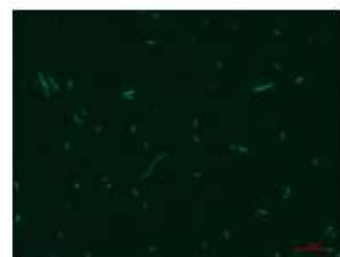
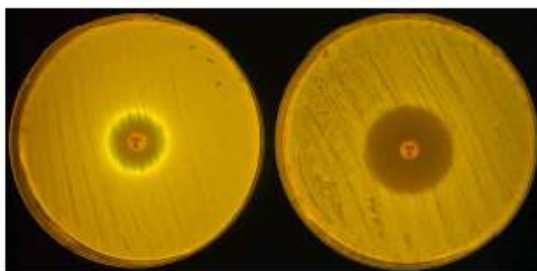
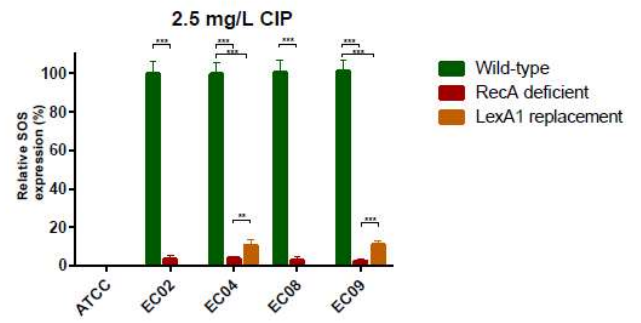
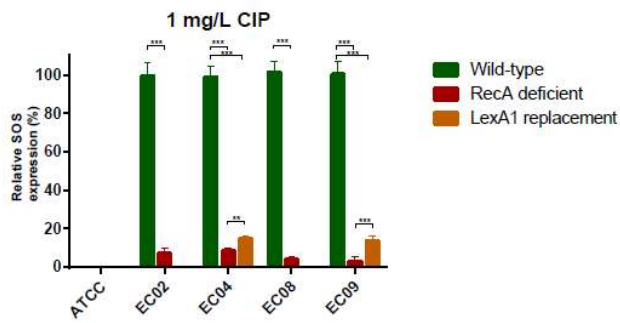
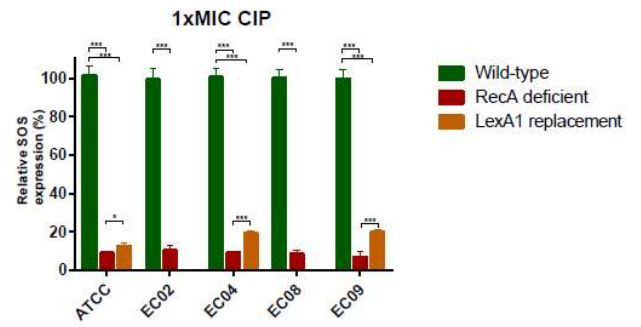
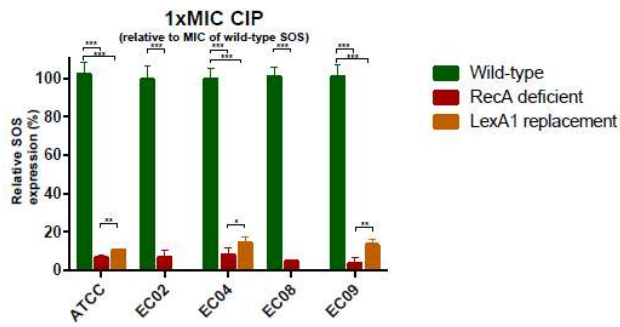
| Primer or plasmid | Sequence ^a | Use in this study | Source or reference |
|--|---|----------------------------------|---------------------|
| Gene Replacement | | | |
| Pre-lexA1-Bam | 5'- <u>cgggatcc</u> g GTGATGCTGGTGATGATTGTGGA-3' | Mutagenesis of <i>lexA</i> | This study |
| Post-lexA1-Bam | 5'- <u>cgggatcc</u> g GTAAGGCGAGATGCCAGAGTGCT-3' | Mutagenesis of <i>lexA</i> | This study |
| Pre-lexA1 | 5'-GCGGCATTCCGTCAGGAAGGCGTA-3' | <i>lexA</i> amplification | This study |
| Post-lexA1 | 5'-GCACCAACCGCCACGCCGCCAA-3' | <i>lexA</i> amplification | This study |
| ST76-1 | 5'-CGACTCACTATAGGGAGACCG-3' | pST76C cloning testing | (4) |
| ST76-2 | 5'-TGCCTGCAGGTCGACTCTAGAG-3' | pST76C cloning testing | (4) |
| Inactivation of chromosomal genes | | | |
| H1-recA-P1 | 5'-CAGAACATATTGACTATCCGGTATTACCCGGCATGACAGGAGTAAAAATGGCTATCGACGAAAACAAACA-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' | <i>recA</i> inactivation | This study |
| H2-recA-P2 | 5'-ATGCGACCCTTGTGTATCAAACAAGACGATTAATAATCTTCGTTAGTTTCTGCTACGCCTTCGCTATCAT-ATGGAATTAGCCATGGTCC-3' | <i>recA</i> inactivation | This study |
| Pre-H1-recA | 5' -TCGTCAGGCTACTGCGTATGCAT-3' | <i>recA</i> inactivation testing | This study |
| Post-H2-recA | 5' -GTACCGCACGATCCAACAGGCGA-3' | <i>recA</i> inactivation testing | This study |
| K1 | 5' -CAGTCATAGCCGAATAGCCT-3' | Chromosomal inactivation | (5) |
| K2 | 5' -CGGTGCCCTGAATGAACTGC-3' | Chromosomal inactivation | (5) |
| Kt | 5'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3' | Chromosomal inactivation | (5) |
| Plasmids | | | |
| pBK-CMV | | Cloning vector | Stratagene |

| | | |
|-------------|---|-----|
| pST76C | Gene replacement/ suicide vector | (4) |
| pUC19RP12 | Gene replacement/ resolution vector | (4) |
| pKD4 | Chromosomal inactivation | (5) |
| pKOBEG | Chromosomal inactivation/ helper vector | (5) |
| pCP20 | Chromosomal inactivation/ resolution vector low copy, GFP | (5) |
| pMS201 | reporter vector (rep-pSC101 Km ^R gfp) | (6) |
| pMSrecA-gfp | recA-gfp reporter promoter fusion | (6) |

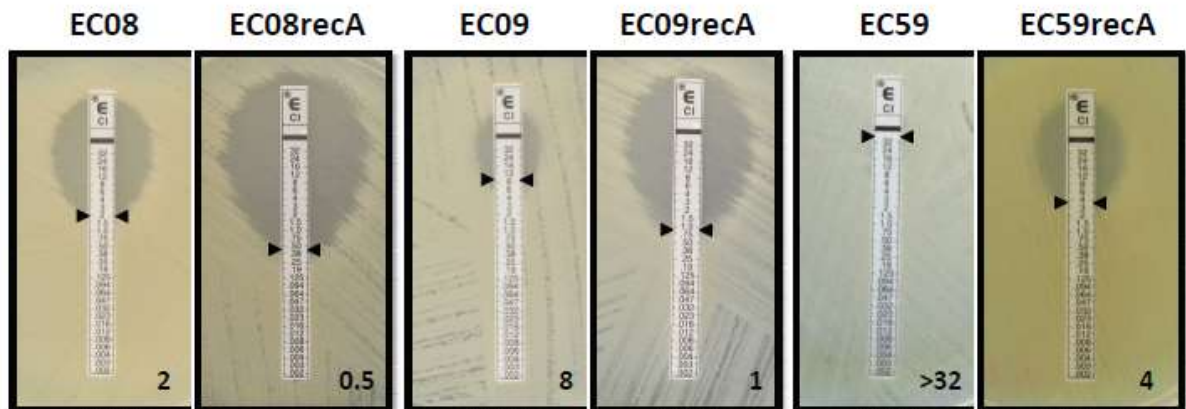
^aUnderlined nucleotides correspond to the *Bam*HI site used for cloning.

Supplementary Figures

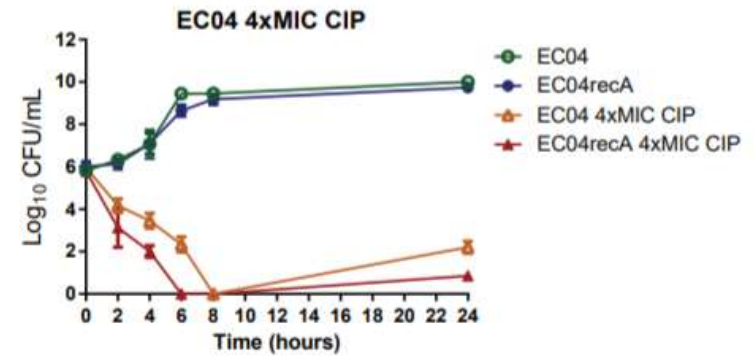
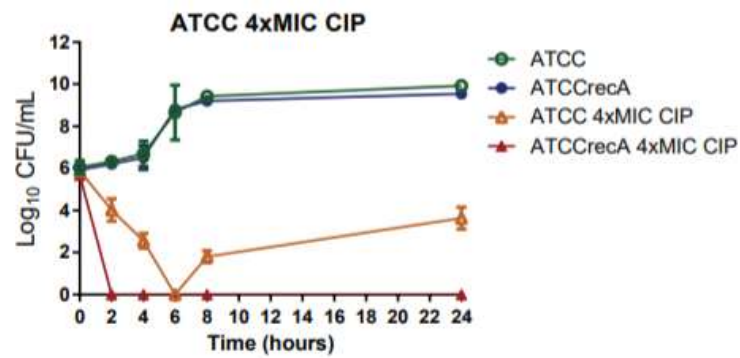
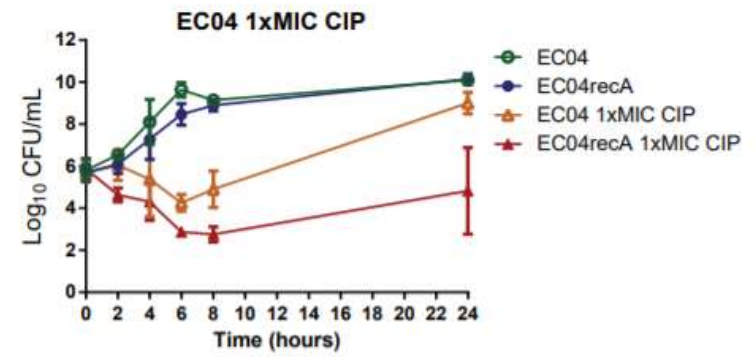
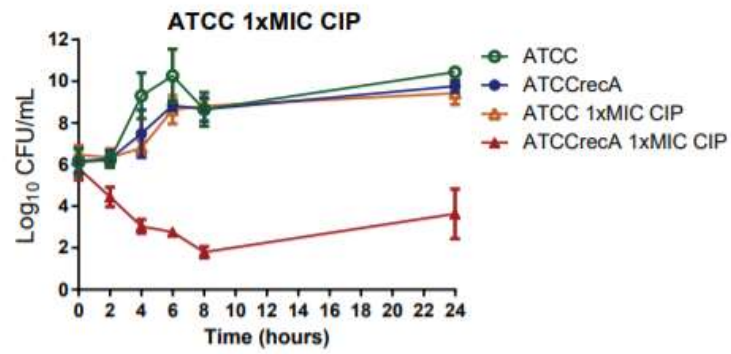
Supplementary figure 1. Monitoring the SOS response in engineered *recA* and *lexA* variants obtained from isogenic quinolone-resistant *E. coli*. Ciprofloxacin (CIP) induces DNA damage leading to activation of the SOS response. Ciprofloxacin-induced green fluorescent protein (GFP) expression from the pMSrecA-gfp vector was used to quantify *recA* promoter activity (SOS induction) after the addition of a fluoroquinolone (ciprofloxacin) at a sublethal concentration (1× MIC, relative to the MIC of the wild-type SOS or not) or fixed concentration (1 mg/liter or 2.5 mg/liter). Data were normalized to the noninduced control (by extracting the fluorescent background) and relative to bacterial density (optical density at 595 nm [OD₅₉₅]). No data are shown for the ATCC 25922 (ATCC) strain at fixed concentrations (1 mg/liter or 2.5 mg/liter) due to the extremely high susceptibility under these conditions. Values that are significantly different are indicated by asterisks as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (Bottom) Representative ciprofloxacin MIC gradient disks for strains EC09 (left) and EC09recA (right) harboring a pMSrecA-gfp vector, and green fluorescent bacteria corresponding to strain EC09 are shown.

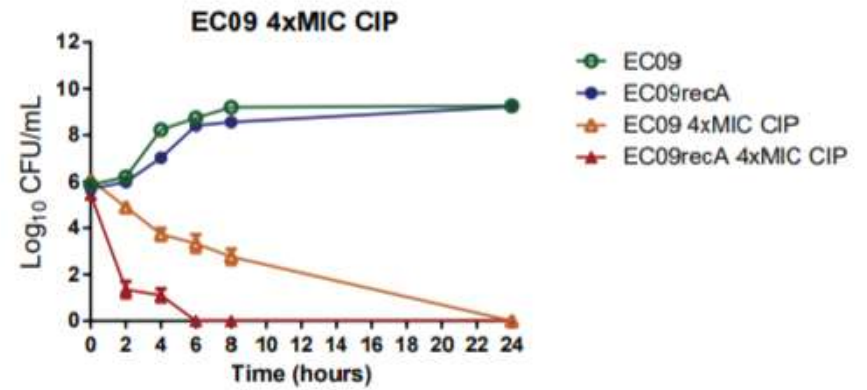
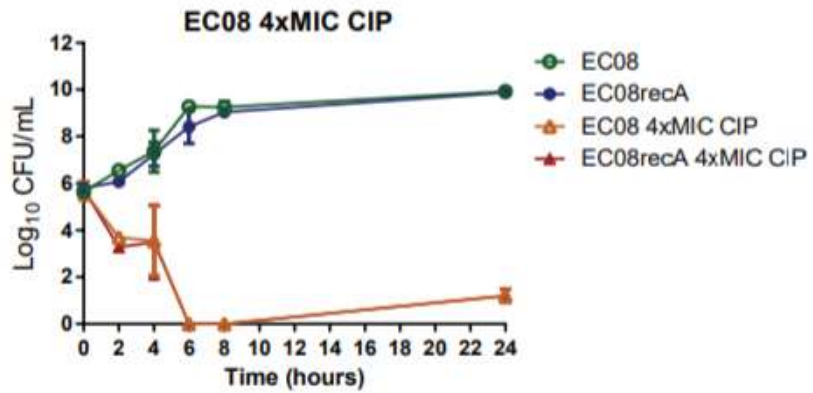
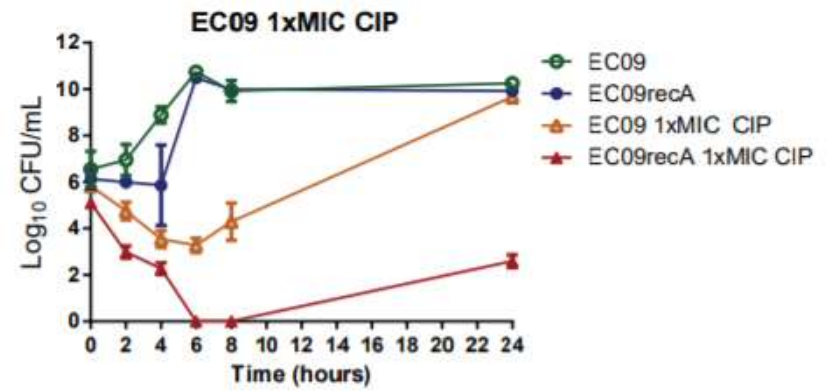
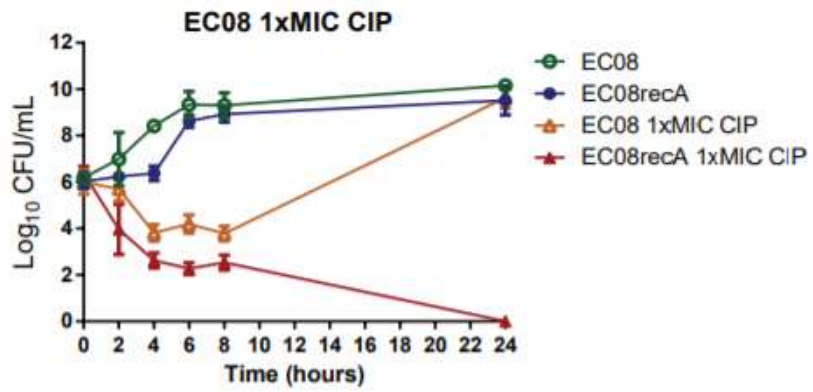


Supplementary figure 2. Ciprofloxacin susceptibility testing for three representative isogenic groups of strains (strains EC08, EC09, and EC59) using the MIC gradient strip method. It was observed that constitutive SOS inactivation (*recA* gene deletion) has a clear influence on ciprofloxacin activity, leading to a significant decrease in MIC. MIC values (shown in milligrams per liter) are indicated at the bottom right of each image.

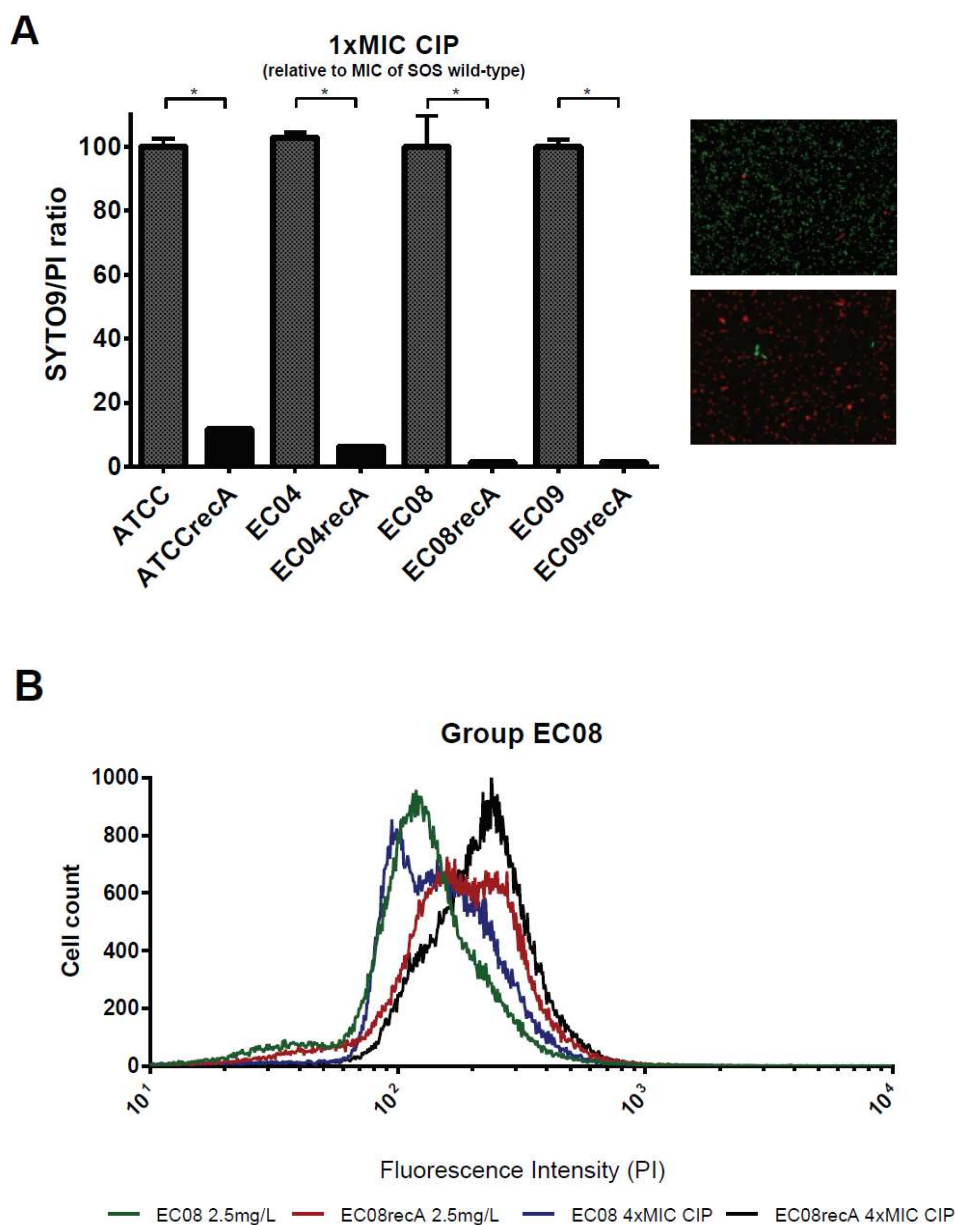


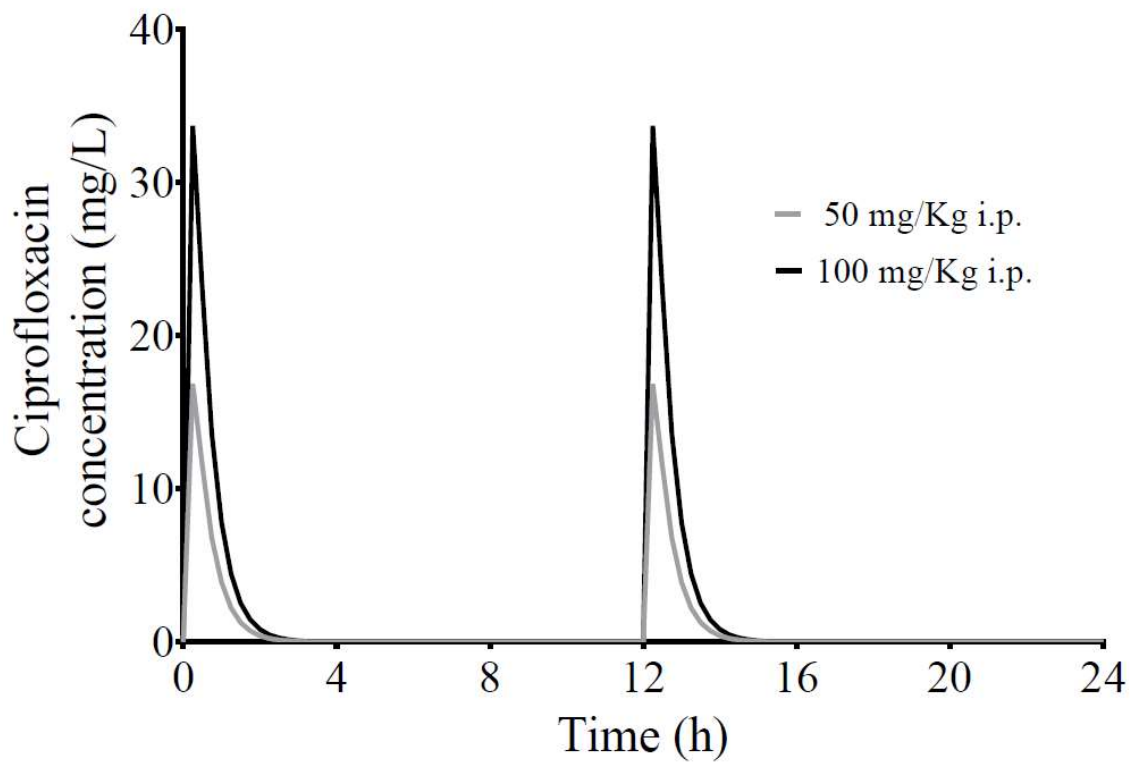
Supplementary figure 3. SOS inactivation enhances bactericidal activity against resistant strains. Viable bacterial counts of ATCC 25922 (ATCC)/ATCCrecA, EC04/EC04recA, EC08/EC08recA, and EC09/EC09recA isogenic pairs in time-kill assays with ciprofloxacin (CIP) concentrations of 1× MIC and 4× MIC (relative to the MICs of the wild-type SOS), respectively. The data are represented as the means from at least three independent measurements. Standard deviations are indicated by the error bars (standard deviations not shown are smaller than the symbols).





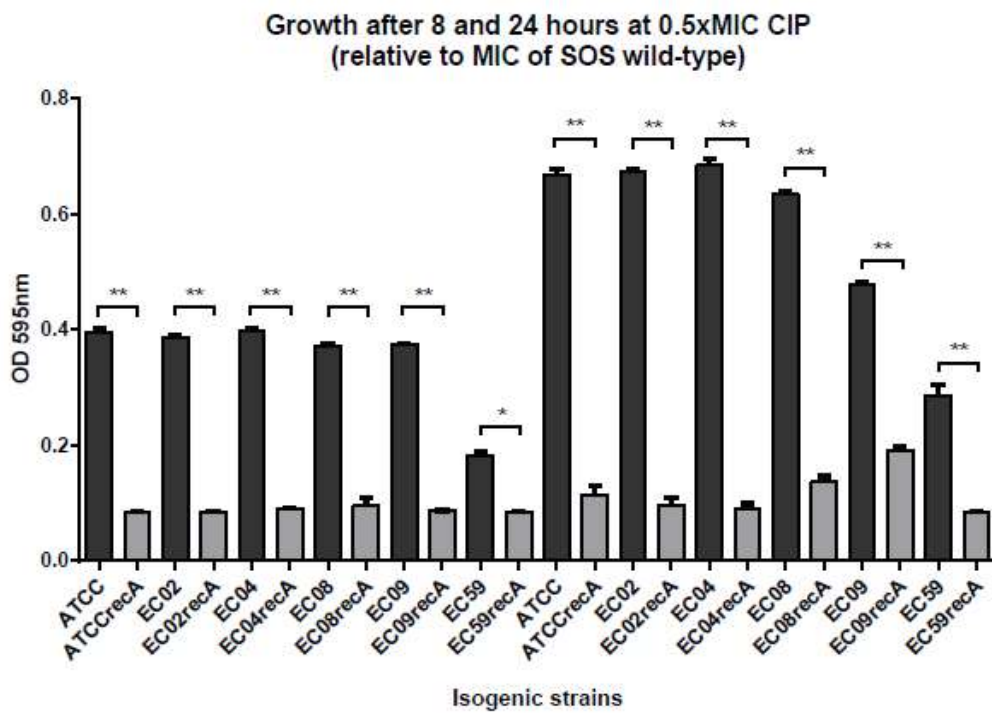
Supplementary figure 4. LIVE/DEAD staining. (A) Quantification of isogenic resistant *E. coli* strains exposed to 1× MIC of ciprofloxacin (relative to the MICs of strains with a functional SOS system) for 4 h. Representative images of strains EC08/EC08recA exposed to 2.5 mg/liter (C_{max}) of ciprofloxacin for 4 h are shown. Significant *P* values are noted (*, $P < 0.001$). **(B)** Flow cytometry of the EC08 group of isogenic LLQR cells (harboring a natural [WT] or inactive SOS system [$\Delta recA$]) treated for 60 min at 2.5 mg/liter or at 4× MIC (relative to the MIC of the strain with wild-type SOS) of ciprofloxacin. Survival was measured as staining with red fluorescent propidium iodide (PI).

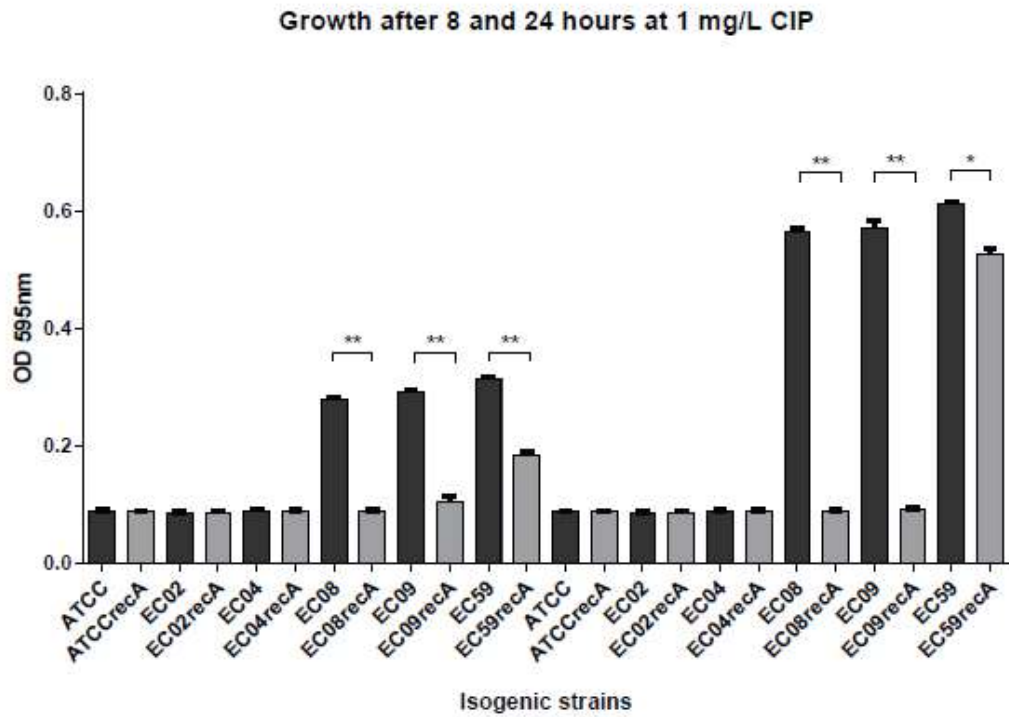
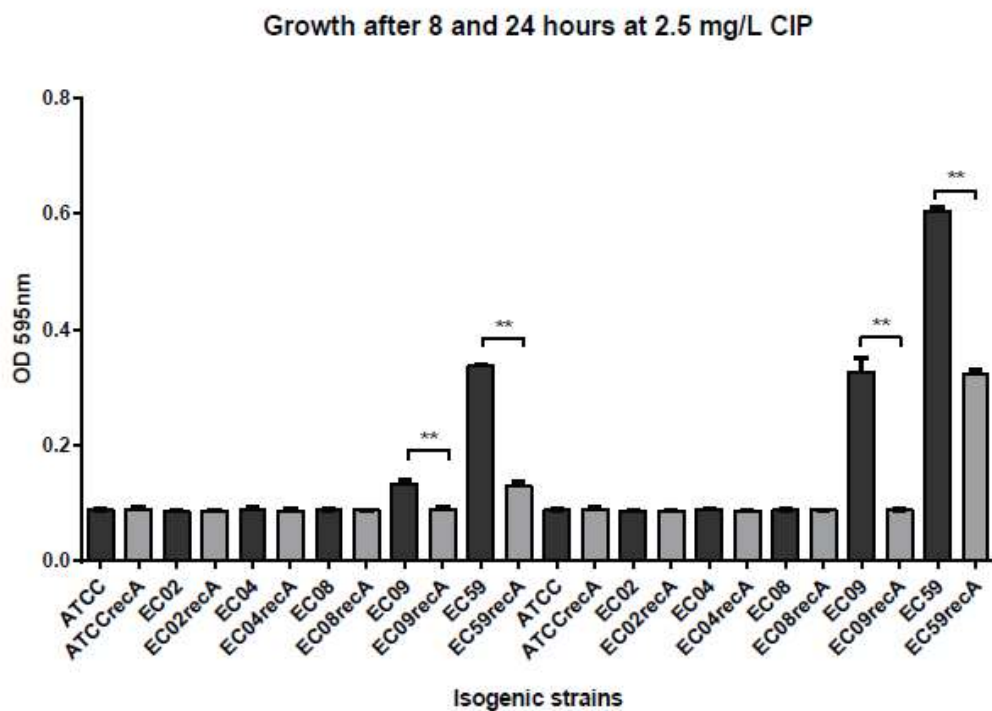


Supplementary figure 5. Pharmacokinetic conditions for *in vivo* murine model.

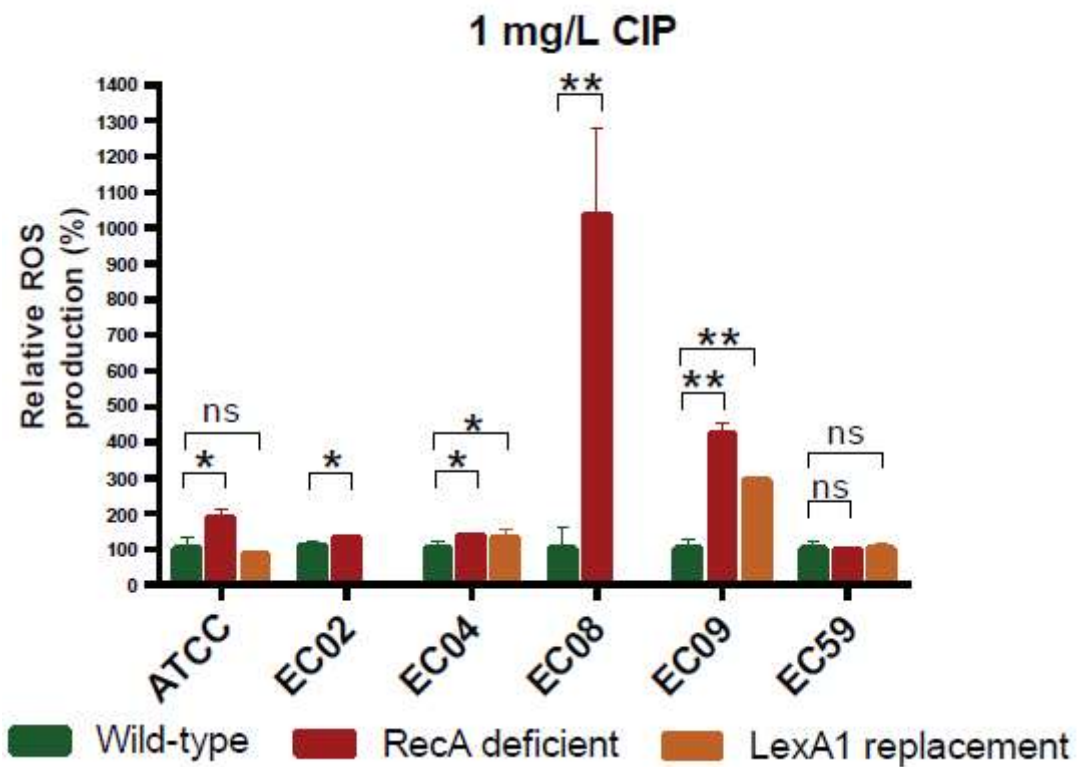
Supplementary figure 6. Impact of the SOS response on cell growth in the presence of quinolones. Growth curve data, at 8 h and 24 h, of strains exposed to sublethal stress at 0.5× MIC relative to the MIC of a strain with wild-type SOS (**A**) and to a 1 mg/liter fixed concentration (**B**) and a 2.5 mg/liter fixed concentration of ciprofloxacin stress (**C**). The data are represented as the means from five independent measurements. Significant *P* values are noted (*, *P* < 0.01; **, *P* < 0.001).

A



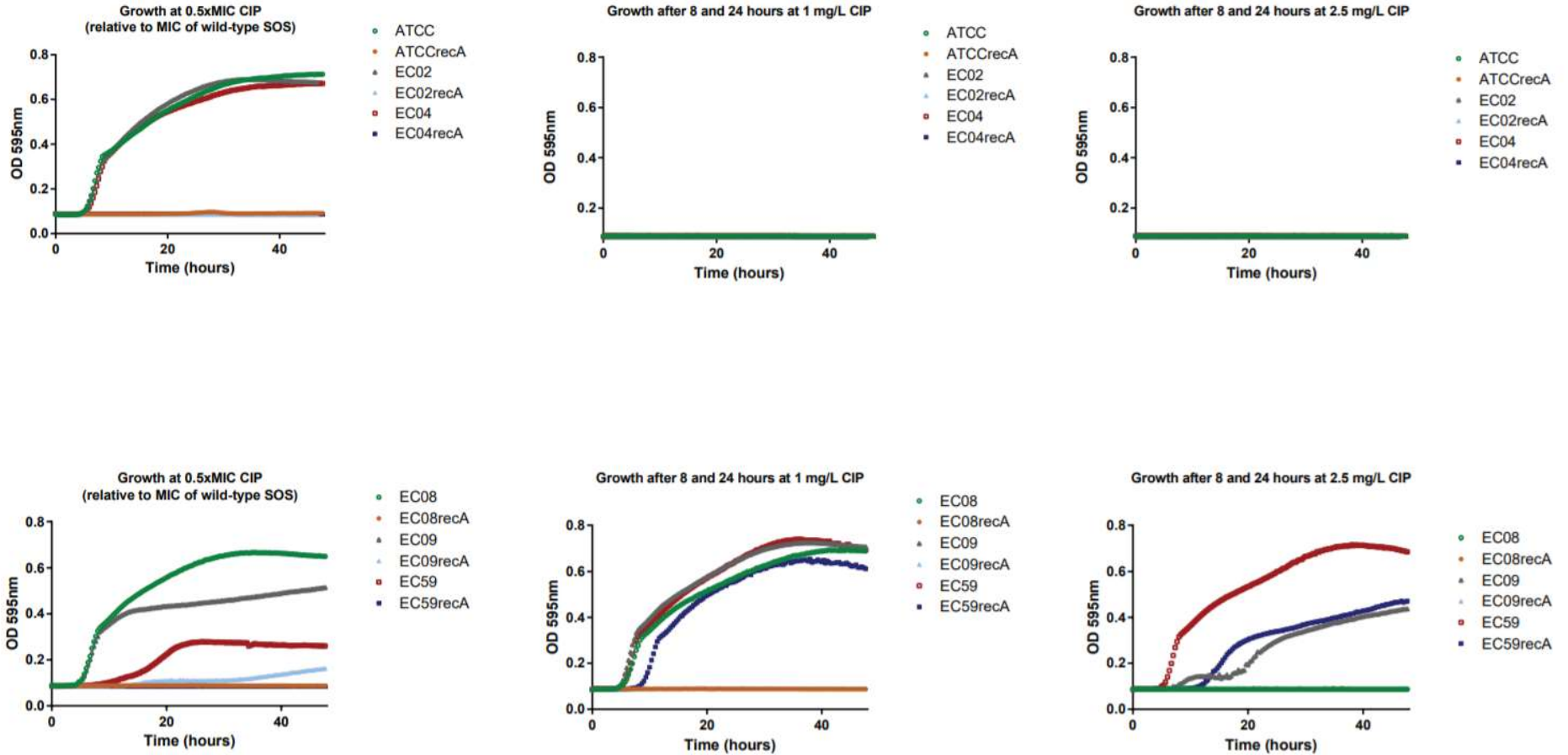
B**C**

Supplementary figure 7. SOS inactivation increases ROS production in resistant isogenic *E. coli* strains at clinically relevant ciprofloxacin (CIP) concentrations. Bacterial cells were treated with ciprofloxacin at a concentration of 1 mg/liter. Significant *P* values are noted (*, $P < 0.05$; ** $P < 0.001$). ns means nonsignificant differences.

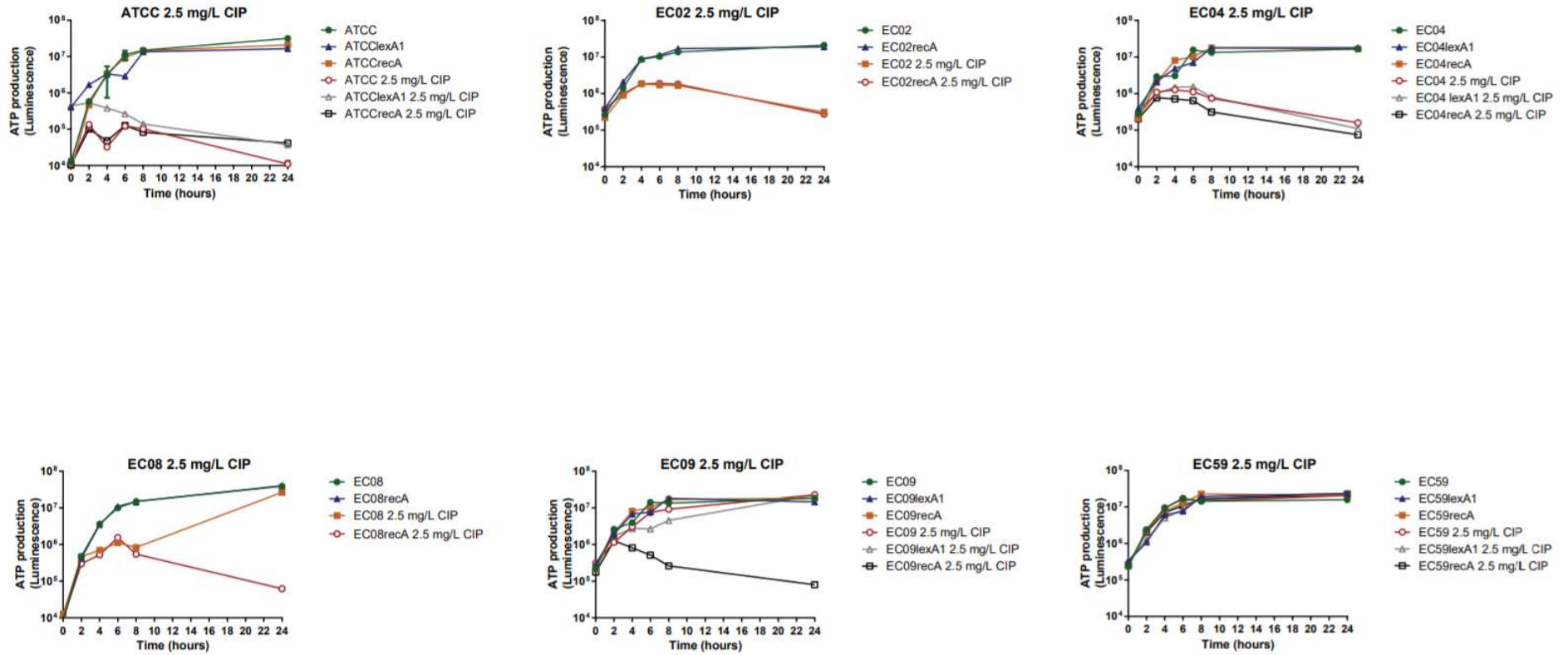


Supplementary figure 8. Impact of SOS response on cell growth and ATP production in the presence of quinolones. (A) Growth curves of strains exposed to sublethal stress at 0.5× MIC, relative to the MIC of the wild-type SOS phenotype, and at fixed 1 mg/liter and 2.5 mg/liter concentrations of ciprofloxacin (CIP) stress. **(B and C)** Monitoring of ATP production of ATCC/ATCCrecA, EC02/EC02recA EC04/EC04recA, EC08/EC08recA, EC09/EC09recA and EC59/EC59recA isogenic pairs in the presence of (B) 2.5 mg/liter concentrations of ciprofloxacin (human serum C_{max}) or (C) a sublethal concentration of ciprofloxacin at 0.5× MIC, relative to the MIC of the wild-type SOS. Data are shown as the means of at least 5 independent measurements. Standard deviations are indicated by the error bars (standard deviations not shown are smaller than the symbols).

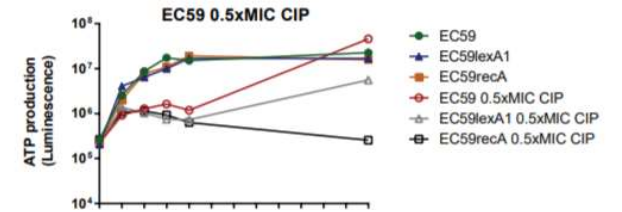
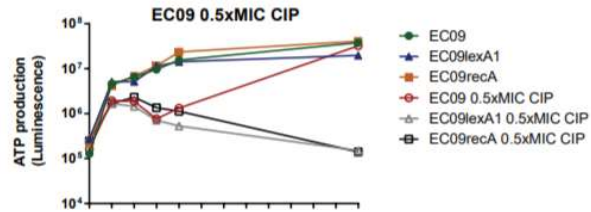
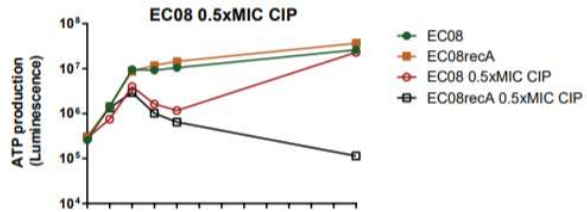
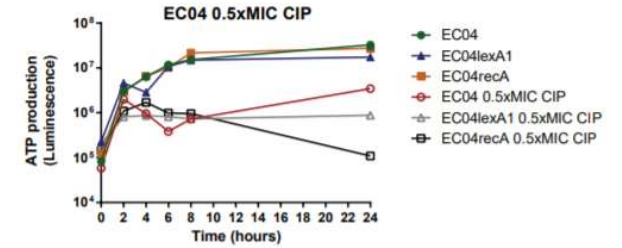
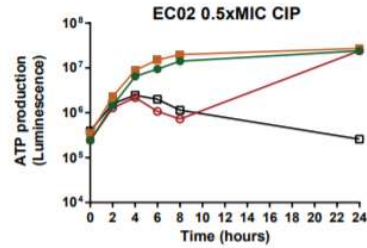
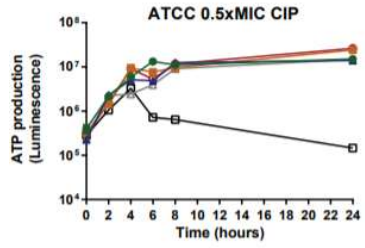
A



B



C



Supplementary References

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Sixth Informational Supplement M100-S26*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2016.
2. Elez M, Radman M, Matic I. The frequency and structure of recombinant products is determined by the cellular level of MutL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 8935–40.
3. Machuca J, Briales A, Labrador G, *et al.* Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3203–15.
4. Pósfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, *et al.* Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 4409–15.
5. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 6640–5.
6. Zaslaver A, Bren A, Ronen M, *et al.* A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods* 2006; **3**: 623–8.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Breakpoints and Epidemiological Cut-Off values*. 2016. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
8. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edn. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015; 427.
9. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**: 423–35
10. Domínguez-Herrera J, Velasco C, Docobo-Pérez F, *et al.* Impact of *qnrA1*, *qnrB1* and *qnrS1* on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by *Escherichia coli* with or without the GyrA mutation Ser83Leu. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1609–15.

11. D'Argenio DZ, Schumitzky A, Wang X. ADAPT 5 User's Guide: pharmacokinetic/pharmacodynamic Systems Analysis Software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, CA. 2009.
12. Mo CY, Birdwell LD, Kohli RM. Specificity determinants for autoproteolysis of LexA, a key regulator of bacterial SOS mutagenesis. *Biochemistry* 2014; **53**: 3158–68.

Supplementary material for:

Suppression of the SOS response modifies spatiotemporal evolution, post-antibiotic effect, bacterial fitness and biofilm formation in quinolone-resistant *Escherichia coli*.

E. Recacha^{1,*}, J. Machuca^{1,*}, S. Díaz-Díaz^{2,3,4}, A. García-Duque¹, M. Ramos-Guelfo¹, F. Docobo-Pérez^{2,3,4}, J. Blázquez⁵, A. Pascual^{1,2,3,4,◆}, J.M. Rodríguez-Martínez^{2,3,4,◆,*}

¹*Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain.*; ²*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain*; ³*Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain*; ⁴*Instituto de Biomedicina de Sevilla IBIS, Hospital Universitario Virgen Macarena/CSIC/Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain*; ⁵*Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain*

◆ Equal contribution; ♠ Equal contribution

* Corresponding author: Mailing address: Department of Microbiology; University of Seville. Avda Sánchez Pizjuán s/n. 41009 Spain. E-mail: jmrodriguez@us.es

J Antimicrob Chemother. 2018 Oct 16. doi: 10.1093/jac/dky407

Supplementary Methods

Strains, growth conditions and antimicrobial agents

Sixteen isogenic *E. coli* strains were used (based on wild-type *E. coli* ATCC 25922) harboring chromosomally- and/or plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms combined with *recA* deletion and/or *lexA* replacement by *lexA1*. These strains represent progressive degrees of fluoroquinolone resistance, ranging from susceptible to resistant¹ (see Supplementary Data).

Liquid or solid LB medium and Mueller-Hinton broth (MHB) were used. Strains were grown at 37°C. Ciprofloxacin was used for the different assays (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Kanamycin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 30 mg/L was used for plasmid maintenance. The *qnrS* gene was cloned into the pBK-CMV vector as described.² Expression of ciprofloxacin-induced GFP in the kanamycin-resistant pMS*recA*-gfp vector was used to detect *recA* promoter activity (SOS induction).³

Determination of Mutation Rate

Overnight cultures of *E. coli* were diluted 1:10,000 and incubated for 16 hours in the absence of ciprofloxacin. The mutation rate was determined by spreading an overnight culture of viable microorganisms (100 µL) on LB agar plates, with and without ciprofloxacin (4xMIC as selection concentrations). Ciprofloxacin concentrations were relative to MICs for strains harboring the unmodified SOS response (that is, with intact *recA* and *lexA* genes). Selected isogenic groups were also exposed to fixed selection concentrations of ciprofloxacin: 1 mg/L for the ATCC, EC02 and EC04 groups [CLSI breakpoint for resistance]⁴ and 2.5 mg/L for the EC04, EC08 and EC09 groups [peak serum ciprofloxacin concentrations (C_{max})].⁵ The colony count was determined after 48 h at 37°C in three independent assays. The colony counts from the three replicates were then used in the MSS maximum-likelihood method to estimate the number of mutational events per culture using the FALCOR website (<http://www.mitochondria.org/protocols/FALCOR.html>).⁶

Mutant Prevention Concentration (MPC) determination

MPCs were determined as previously described by Machuca *et al.*⁷ In summary, for each strain used in the study, 100 μ L of an overnight culture was inoculated into 100 mL of MH broth, then incubated at 37°C with aeration for ~6 h, until an OD₅₄₀ of ~1.0 was reached (Genesys 20, Thermo, Barcelona, Spain), corresponding to $\sim 10^9$ cells/mL. 10 mL aliquots of culture were then centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet containing $\geq 10^{10}$ cells resuspended in the remaining liquid and spread onto a MH agar plate containing specific concentrations of quinolone. Each strain was tested against ciprofloxacin in serial dilution at different concentrations (using log₂ dilutions ranging from 0.001 to 128 mg/L). Plates were incubated at 37°C for a total of 96 h and examined every 24 h for the appearance of colonies. The MPC was recorded as the lowest quinolone concentration at which no colonies grew on an agar plate. The MPC for each strain was determined in at least two independent experiments. The variation between experiments was not more than one log₂ dilution.

Agar gradient plate experiments

A key aspect of bacterial survival is the ability to evolve while migrating across spatially varying environmental challenges (spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes).⁸ Gradient plate assays (120.5 mm) were used to evaluate microbial evolution as a function of the SOS response available. Several maximum concentrations of ciprofloxacin were used: 1 mg/L, 2.5 mg/L and 1x- or 4xMIC (relative to the wild-type SOS response). BM2 swarming medium was used.⁹ Each plate was first tilted at ~5 degrees from the horizontal and a first layer of molten agar containing selective agents was added (30 mL). After the initial layer hardened, the plate was laid flat and a second layer of molten agar lacking selective agents was poured (30 mL).¹⁰ MHA plates containing ciprofloxacin (2.5 mg/L at maximum concentration) were also used to demonstrate the differential response associated with SOS response availability in terms of resistance selection. The plates were incubated for a maximum of 240 hours.

Whole Genome Sequencing

Genomic DNA from 29 evolved mutants (obtained from the zone separating growth and non-growth) and their respective parental strains was extracted and sequenced using MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA), generating 300 bp paired-end reads. The library was prepared using the Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina), which involves DNA fragmentation, adaptor ligation and amplification. Raw reads were quality filtered and assembled into contigs using the CLC genomics workbench 9.5.2. (CLC bio, QIAGEN) and the default settings of the software. An average coverage of 50× was observed. Contigs were annotated using RAST 2.0 (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). SNP analysis and mutation/variant detection was carried out in a CLC genomics workbench 9.5.2 using *E. coli* ATCC 25922 (Genbank accession: CP009072.1) as the reference. BLASTn/p® (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) was used to compare sequences.

Growth competition assays

E. coli ATCC 25922, EC02, EC04, EC08 and EC09 were used as standard reference strains against derived $\Delta recA$ (kanamycin-resistant) mutants. EC59 $\Delta lacZ$ was tested against EC59 $\Delta recA$ ($\Delta lacZ$ mutation is neutral).² To initiate the growth competition assay, each strain was grown in LB for 12 hours at 37°C, diluted to $OD_{625} \approx 0.08-0.1$, and mixed in a 1:1 ratio. 200 μ L were then inoculated into 5 mL of LB broth and grown for 24 hours to complete a growth cycle. Each successive growth cycle was initiated by diluting the mixture 10^{-3} fold into LB broth. After the initial mixing, appropriate dilutions of the mixture were plated at 48 h (2 cycles) and 96 h (4 cycles). LB agar plates containing 30 mg/L kanamycin or 40 mg/L X-gal and 100 μ M (28.83 mg/L) IPTG were used to quantify each bacterial population.² Plates were incubated overnight at 37°C. Relative Fitness (RF) was calculated as the ratio of the \log_{10} CFU densities of wild-type strains and deficient SOS response strains ($RF = (\log_{10}S1_{d1} - \log_{10}S1_{d0}) / (\log_{10}S2_{d1} - \log_{10}S2_{d0})$), where $S1_{d1}$ and $S1_{d0}$ are the respective CFU densities of the mutant strain at the end and the beginning of the competition experiment, and $S2_{d1}$ and $S2_{d0}$ the equivalent values for the control strain. An RF score >1 indicated that the mutant strain had a selective

advantage over the control strain, whereas a score <1 represented a fitness cost. Note that fitness defects may be due to defects at any stage of the growth cycle (lag, exponential, stationary phases). Competition assays were also carried out at 0.5xMIC of ciprofloxacin. Ciprofloxacin concentrations were relative to MICs for strains harbouring the modified SOS response (*recA* deleted). The ATCC, EC02 and EC04 groups were also exposed to environmental concentrations of ciprofloxacin (0.002 mg/L).¹¹ Each competition assay was tested in at least 6 independent experiments.

Determination of post-antibiotic effect (PAE) of ciprofloxacin

ATCC, EC02, EC04 y EC08 groups were selected to show the impact of suppression of the SOS response on the post-antibiotic effect (PAE) *in vitro* by exposing the bacteria (10^7 CFU/mL) to fixed concentrations of 1 and 2.5 mg/L of ciprofloxacin for 2 h. The antibiotic was removed from the culture by three centrifugations and resuspended in fresh MHB. The antibiotic-free bacterial re-suspension was then incubated at 37°C and shaken. After removal of the drug, viable counts were performed hourly for the next 6 h and at 24 h. A growth control, prepared and treated in a similar way to the test solution but without being exposed to antibiotics, was included in each experiment. The PAE was calculated as previously described.¹²

Biofilm production

Biofilm production was assessed by a previously described spectrophotometric method.¹³ Overnight bacterial cultures in TSB containing 0.25% glucose were diluted at 1:100 in M9 minimal medium ($\sim 10^6$ cells/mL). Sub-MIC concentrations of ciprofloxacin (1/16xMIC for each of the respective SOS wild-type strains) were fixed and 200 μ L of culture was added to the wells of a 96-well flat-bottom tissue culture plate (Cellstar®, Greiner bio-one) and incubated for 48 h at 37°C for biofilm growth. Briefly, biofilms formed on the plate were washed twice with PBS to remove planktonic cells, and adherent bacteria were fixed with 95% ethanol for 10 min and stained with 0.1% crystal violet for 15 min. To measure biofilm formation, crystal violet was solubilized in 33% glacial acetic acid and the absorbance of the solubilized dye was measured at 590 nm (Infinite 200 PRO. Tecan).

Statistical analysis

For statistical evaluation, the Student's t-test was used when two groups were compared. Differences were considered significant when P values were ≤ 0.05 .

Supplementary Table

Table S1. Genotypes and ciprofloxacin susceptibility (by Etest) of isogenic strains.

| Strain ^a | <i>gyrA1</i> | <i>gyrA2</i> | <i>parC</i> | <i>marR</i> | <i>qnr</i> | SOS system | MIC ^b | CC (CLSI/EUCAST) ^c | No. of Fold ^d | Source or reference |
|---------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|-----------------|------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------------|
| ATCC ^e | - | - | - | - | - | WT ^f | 0.008 | S/S | | Lab collection |
| ATCCrecA | - | - | - | - | - | Δ recA | <0.002 | S/S | >4 | (1) |
| ATCClexA1 | - | - | - | - | - | lexA1 | 0.004 | S/S | 2 | (1) |
| EC02 | S83L | - | - | - | - | WT | 0.25 | S/S | | (1) |
| EC02recA | S83L | - | - | - | - | Δ recA | 0.03 | S/S | 8 | (1) |
| EC04 | S83L | - | S80R | - | - | WT | 0.5 | S/S | | (1) |
| EC04recA | S83L | - | S80R | - | - | Δ recA | 0.125 | S/S | 4 | (1) |
| EC04lexA1 | S83L | - | S80R | - | - | lexA1 | 0.5 | S/S | 1 | (1) |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|------|------|------|---------------|-------------|---------------|-----|------------|----|-----|
| EC08 | S83L | D87N | S80R | - | - | WT | 2 | I/R | | (1) |
| EC08recA | S83L | D87N | S80R | - | - | $\Delta recA$ | 0.5 | S/S | 4 | (1) |
| EC09 | S83L | D87N | S80R | $\Delta marR$ | - | WT | 8 | R/R | | (1) |
| EC09recA | S83L | D87N | S80R | $\Delta marR$ | - | $\Delta recA$ | 1 | S/I | 8 | (1) |
| EC09lexA1 | S83L | D87N | S80R | $\Delta marR$ | - | <i>lexA1</i> | 2 | I/R | 4 | (1) |
| EC59 | S83L | D87N | S80R | $\Delta marR$ | <i>qnrS</i> | WT | >32 | R/R | | (1) |
| EC59recA | S83L | D87N | S80R | $\Delta marR$ | <i>qnrS</i> | $\Delta recA$ | 4 | R/R | >8 | (1) |
| EC59lexA1 | S83L | D87N | S80R | $\Delta marR$ | <i>qnrS</i> | <i>lexA1</i> | 32 | R/R | >1 | (1) |

^aGenotype. Strains are isogenic to *E. coli* ATCC 25922 and carry only chromosomal modifications, the *qnrS* gene and/or SOS dysfunction [*recA* deletion or non-proteolizable LexA variant (LexA1)]. Resistance-associated mutations located in the GyrA and ParC proteins have been defined as resistance mechanisms that alter the target site

^bMIC (mg/L) of ciprofloxacin by Etest

^cCC (CLSI/EUCAST) refers to clinical categories according to CLSI or EUCAST breakpoints^{4,14}

^dFold reduction in MIC compared to wild-type strain for the SOS system in each isogenic subgroup

^e*E. coli* ATCC 25922

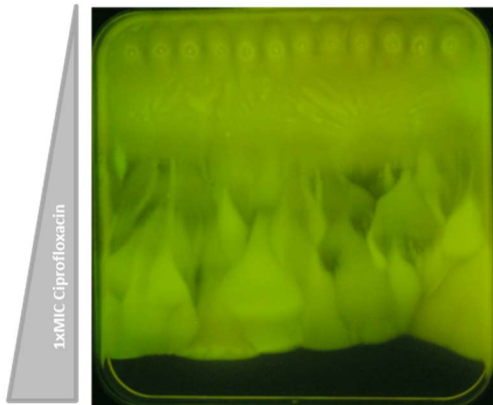
^fWild-type

S, susceptible; I, intermediate susceptibility; R, resistant

Subgroups with clinical category changes are indicated in bold. Wild-type strains for SOS response and *recA* or *lexA1* deficient mutants are indicated in green, red or yellow, respectively

Supplementary Figure Legends

Supplementary figure 1. Agar gradient plate experiments for studying spatiotemporal microbial evolution. (A) Swimming motility of EC02 (pMS-PrecA) at 1xMIC of ciprofloxacin after 96 hours of microbial evolution associated with SOS response functionality. **(B)** Swimming motility of EC04 (pMS-PrecA) at 4xMIC of ciprofloxacin after 96 hours of microbial evolution associated with SOS response functionality. **(C)** Swimming motility of EC04 at 2.5 mg/L ciprofloxacin after 96 hours of microbial evolution associated with SOS response functionality. **(D)** EC08 (pMS-PrecA) at 2.5 mg/L ciprofloxacin after 48 hours of microbial evolution associated with SOS response functionality. Images are aligned with linear contrast enhancement but are otherwise unedited.

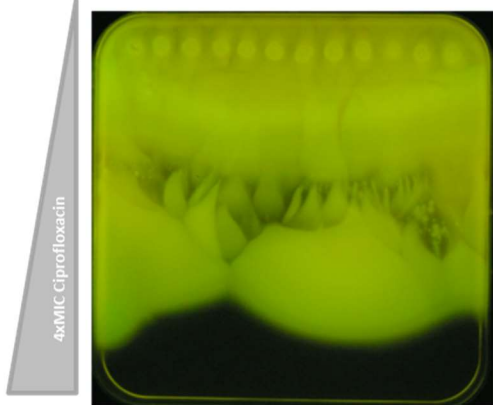
A

1xMIC Ciprofloxacin

EC02 pMS-Preca (MIC 0.25 mg/L)

EC02 Δ recA pMS-Preca (MIC 0.03 mg/L)

96 hours

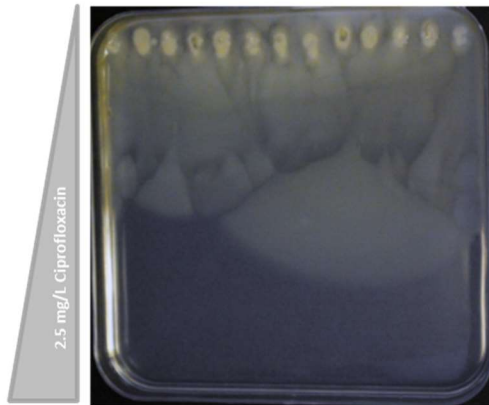
B

4xMIC Ciprofloxacin

EC04 pMS-Preca (MIC 0.5 mg/L)

EC04 Δ recA pMS-Preca (MIC 0.125 mg/L)

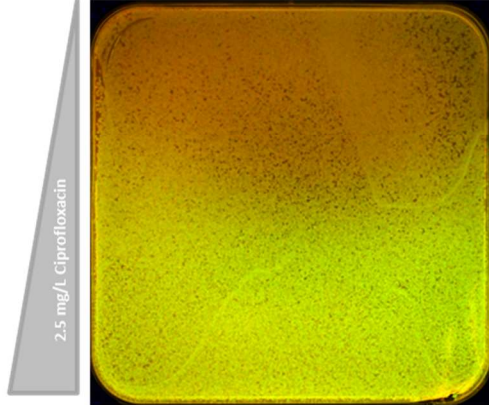
96 hours

C

2.5 mg/L Ciprofloxacin

EC04 (MIC 0.5 mg/L)

96 hours

D

2.5 mg/L Ciprofloxacin

EC08 pMS-Preca (MIC 2 mg/L)

EC08 Δ recA pMS-Preca (MIC 0.5 mg/L)

48 hours

Supplementary References

1. Recacha E, Machuca J, Díaz de Alba P, *et al.* Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *MBio* 2017; **8**: e00971-17.
2. Machuca J, Briales A, Labrador G, *et al.* Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 3203–15.
3. Drayman N, Karin O, Mayo A, *et al.* Dynamic proteomics of herpes simplex virus infection. *MBio* 2017; **8**: e01612-17.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Sixth Informational Supplement M100-S26. CLSI, Wayne, PA, USA, 2016.
5. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edn. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015; 427.
6. Hall BM, Ma C-X, Liang P, *et al.* Fluctuation analysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1564–5.
7. Marcusson LL, Olofsson SK, Lindgren PK, *et al.* Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 938–43.
8. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, *et al.* Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science (80-)* 2016; **353**: 1147–51.
9. Overhage J, Bains M, Brazas MD, *et al.* Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008; **190**: 2671–9.
10. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, *et al.* Oligomerized pool engineering

(OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc* 2009; **4**: 1471–501.

11. Li Y, Zhu G, Ng WJ, *et al.* A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *Sci Total Environ* 2014; **468–469**: 908–32.

12. Craig WA, Gudmunsson S. Postantibiotic effect. In: V Lorian, ed. *Antibiotics in Medicine*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1991; 403-31.

13. García I, Ballesta S, Gilaberte Y, *et al.* Antimicrobial photodynamic activity of hypericin against methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future Microbiol* 2015; **10**: 347–56.

14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Breakpoints and Epidemiological Cut-Off values*. 2016. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

