

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



“El complejo ClpXP controla la respuesta SOS y la inducción de profagos en *Staphylococcus aureus*”

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Carmen Ferrera Valle

Dirigida por: Dr. José R. Penadés Casanova

VALENCIA

2015

Este trabajo ha sido realizado gracias a las siguientes ayudas:

- BIO2008-05284-C02-02, Ministerio de Ciencia e Innovación.
- BIO201-30503-CA-01, Ministerio de Economía y Competitividad.

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

A Jose, por varios motivos : dejarme un hueco en el lab , facilitarme una beca para hacer el PhD y contar conmigo para la mudanza a Glasgow. A mi familia por su apoyo económico y moral durante mis años de formación. A mis compañeros del lab, a todos y cada uno de ellos. A mis amigas que durante estos años han seguido a mi lado, el apoyo mas importante que he tenido, GRACIAS!

Índice



ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

<i>Staphylococcus aureus</i>	1
Bacteriófagos.....	2
Complejos proteolíticos.....	8
Respuesta SOS.....	10

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

Objetivos.....	17
----------------	----

CAPÍTULO III: RESULTADOS

I. El complejo ClpXP controla la inducción de profagos en <i>Staphylococcus aureus</i>	
Estudio del ciclo vírico en profagos de S.aureus en ausencia de las proteínas Clp.....	23
Papel de las proteínas Clp en la inducción de profagos.....	28
Estudio de las proteasas ClpX y ClpP en E.coli.....	30
Papel de las proteínas Clp en la replicación de los fagos de S. aureus	32
Las mutaciones en las proteasas ClpP y ClpX no afectan a la movilidad de islas de patogenicidad.....	33
II. La degradación del represor cl en <i>Staphylococcus aureus</i> está controlada por las proteasas ClpP y ClpX	
Estudios del represor cl a nivel transcripcional y proteico en los mutantes Clp. ..	36
III. El complejo ClpPX controla la respuesta SOS en <i>Staphylococcus aureus</i>	
Estudio del represor LexA en los mutantes de las proteasas Clp	46
Las proteasas Clp están implicadas en la respuesta SOS.....	52

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Las proteínas Clp regulan la expresión de genes en virulencia 57

La degradación del represor cl en Staphylococcus aureus esta controlada por las proteínas Clp 59

Las proteasas intervienen en la respuesta SOS mediante LexA..... 60

CAPÍTULO V: MATERIAL Y MÉTODOS

Metodología general 68

Bacterias, plásmidos y medios utilizados en estos estudios..... 70

Manipulaciones del DNA..... 72

Southern blot..... 74

Análisis computacional..... 76

Purificación de proteínas..... 77

Métodos bioquímicos 79

Ensayo enzimático para la cuantificación de la actividad β -lactamasa en los plásmidos de fusión transcripcional 80

Metodología utilizada en los estudios de inducción de fagos 81

Inducción de profagos..... 82

Titulación de fagos 83

Transducción..... 84

Precipitación de fagos..... 85

Microscopía electrónica..... 86

Extracción del DNA para el estudio de replicación de fagos 86

Metodología utilizada para la obtención de mutantes..... 86

Obtención de mutantes por delección 87

Tabla de cepas utilizadas en estos estudios..... 86

Tabla de plásmidos utilizados en estos estudios..... 88

Tabla de cebadores utilizados en estos estudios..... 89

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Conclusiones 100

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía 102

Abreviaturas



ABREVIATURAS UTILIZADAS

ϕ	Fago
Δ	Delección
amp	Ampicilina
<i>att</i>	Sitio de integración
<i>att_B</i>	Sitio de integración en el cromosoma bacteriano
<i>att_L</i>	Sitio de integración izquierdo
<i>att_R</i>	Sitio de integración derecho
<i>bla</i>	Gen que codifica la β -lactamasa
bulk	DNA mayoritario (DNA genómico + fágico)
°C	Grados Celsius
cDNA	DNA copia de RNAm
CsCl	Cloruro de cesio
DIG	Digooxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO _(nm)	Densidad óptica a una cierta longitud de onda (nm)
EDTA	Ácido etilediaminotetraacético
EGM	Elemento genético móvil
EMSA	Electroforesis en gel de retardo
<i>erm</i>	Gen que codifica resistencia a eritromicina
erm	Eritromicina
G	Gravedades
H	Hora
IP	Isla de patogenicidad
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kv	Kilovoltio
LB	Medio luria bertani
min	Minuto
ml	Mililitro
MC	Mitomicina C
mM	Milimolar
MW	Marcador de tamaño del DNA
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
ORF	Pauta abierta de lectura
Ori	Origen de replicación
PEG	Polietilenglicol

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SaPI	Isla de patogenicidad de <i>S. aureus</i>
SAGs	Superantígenos
tetM	Gen que codifica resistencia a tetraciclina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TSA	Medio tripticasa soja agar
TSB	Caldo tripticasa soja
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonia
uv	Ultravioleta
WT	Cepa salvaje (wild type)
Xgal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar

Capítulo I



Introducción

1. *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son bacterias Gram-positivas que pertenecen a la familia Micrococcaceae. Tienen forma redondeada y se asocian formando agrupaciones irregulares o su forma típica de racimos de uva (Biberstein, 1994; Quinn, 1999).

Staphylococcus aureus es un microorganismo ubicuo, que de forma natural se halla en la piel y en las membranas mucosas de los mamíferos y aves. En ocasiones actúa como agente etiológico de procesos patológicos tanto en el hombre como en los animales domésticos. Esto se debe a que posee un gran número de factores de patogenicidad que le permiten colonizar y sobrevivir en una amplia variedad de tejidos y hospedadores (Dinges *et al.*, 2000). Según diversos estudios en el hombre, casi el 30% de la población adulta es portador nasal persistente de *S. aureus* (Wertheim *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 1986). La infección por *S. aureus* se produce tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas, que favorecen la penetración del microorganismo de la piel hasta los tejidos más profundos, pudiendo originar procesos como neumonía, osteomielitis, endocarditis, artritis, pleuritis y meningitis. Esta bacteria es una de las causas más frecuentes y graves de infecciones nosocomiales, siendo especialmente importantes las cepas que presentan multirresistencia a los antibióticos, sobre todo a la meticilina y a la vancomicina, ya que constituyen un grave problema de Salud Pública.

S. aureus también es uno de los mayores patógenos en medicina veterinaria, afectando a diversas especies animales, infectándose un elevado número de explotaciones animales, implicando graves pérdidas económicas y suponiendo un riesgo de zoonosis. En los animales, *S. aureus* produce principalmente mastitis en rumiantes (Bergonier *et al.*, 2003; Barkema *et al.*, 2006), osteitis en pollos (McCullagh *et al.*, 1998) y abscesos, pododermatitis y mastitis en conejos (Corpa *et al.*, 2009).

2. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son muy abundantes en todo tipo de hábitat. Estudios de recuentos de bacteriófagos en el suelo han mostrado que se encuentran muy bien representados, tanto que debe subrayarse su papel en la depredación de las bacterias, siendo por tanto, controlador y estimulador del crecimiento bacteriano (Ashelford *et al.*, 2003). Otros estudios realizados en una amplia variedad de ambientes acuáticos han documentado que, generalmente, existe un orden de magnitud superior de virus que de bacterias, por lo que son considerados la clase más abundante de la biosfera (Wommack *et al.*, 2000).

Los fagos juegan un papel muy importante en la transmisión de factores de virulencia, bien porque están codificados en su genoma, o de forma indirecta como vehículo de información genética no codificada por el fago, como es el caso de las islas de patogenicidad de *S. aureus*.

Como se observa en la Fig. 1, los bacteriófagos pueden clasificarse dependiendo de su ciclo de vida en:

- Fagos líticos virulentos, que tras su multiplicación provocan la lisis de la célula hospedadora, liberando una nueva progenie fágica en un proceso conocido como ciclo lítico.

- Fagos atemperados, en los que el DNA viral se integra en el genoma de la bacteria infectada y se replica junto a éste, transmitiéndose de una generación a otra (transferencia vertical) sin que se produzca la lisis celular. Este fenómeno se conoce como lisogenia, a la cepa así infectada como lisógeno y al DNA viral integrado como profago. Ante situaciones de estrés, tales como luz UV, agentes que dañen el ADN y algunos antibióticos (Maiques *et al.*, 2006; Ubeda *et al.*, 2005), los fagos se inducen y pasan a un ciclo lítico que conducirá a la lisis celular. Durante la inducción, los fagos se escinden del cromosoma bacteriano y comienzan a replicarse, se encapsidan y se transfieren horizontalmente a otras cepas bacterianas.

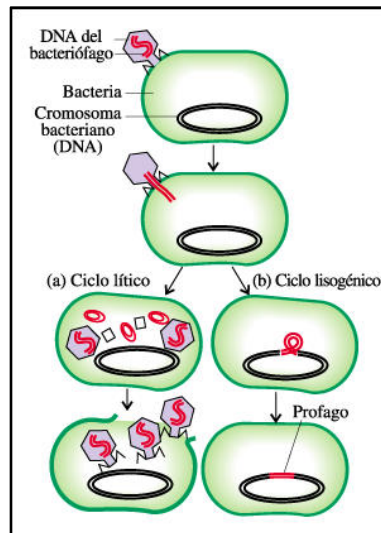


Figura 1. Ciclos de vida de los bacteriófagos. (<http://phage.org/>).

Los dos ciclos alternativos (lítico y lisogénico) de los bacteriófagos están regulados por proteínas reguladoras (represores) codificadas por el fago. Estos represores generalmente bloquean la transcripción de los genes fágicos mediante su unión a las secuencias promotoras en el ADN. Los represores dependiendo de la bacteria y fago pueden contener un único o varios dominios, existiendo como monómeros o multímeros en solución. Dependiendo del tipo de fago, el represor puede ser de diferentes tamaños, secuencias y tipos (Campbell *et al.*, 1994).

Para los fagos temperados de *S. aureus* como el fago $\phi 80$ alpha producen un represor, CI y un antirrepresor, Cro, para controlar tanto el ciclo lítico como lisogénico. Mientras que el represor lisogénico (CI) parece ser requerido para el establecimiento de la lisogenia, Cro se necesita para promover el desarrollo lítico de los fagos mediante la inhibición de la expresión de CI (Iandolo *et al.*, 2002). La síntesis de CI y Cro ocurre desde los genes contiguos *ci* y *cro*, los cuales se sitúan divergentemente en el genoma de los fagos.

Bajo condiciones de daño celular, se desencadena la respuesta SOS como mecanismo de supervivencia por parte de la bacteria, en presencia de RecA* se promueve la autoescisión del represor CI seguida de una degradación proteolítica, lo cual libera la represión de *cro* y permite por tanto la expresión de los genes implicados en el ciclo lítico (Oppenheim *et al.*, 2005).

2.1. Bacteriófagos y proteasas

Estudios previos han demostrado como las proteínas Clp están involucradas en el metabolismo de otros represores de fagos. Un ejemplo de ello lo encontramos en el fago lambda, infectivo para *Escherichia coli*. La escisión dependiente de RecA del represor λ del fago lambda, el cual conlleva la inducción del mismo, fue uno de los primeros ejemplos reconocidos como evento específico proteolítico involucrado en la regulación de la expresión genética (Roberts *et al.*, 1975). Desde entonces, una variedad de proteasas dependientes de ATP en *E. coli* han sido mostradas por degradar proteínas reguladoras tanto del fago como de la bacteria. Ejemplos de ello se encuentran en la proteína Sula, el fago lambda N y el plásmido F que codifica para proteínas CcdA son sustratos de la proteasa Lon (Mizusawa *et al.*, 1983, Van Melderen *et al.*, 1994). No solo la proteasa Lon ha sido estudiada en este género, en *E. coli* la proteasa dependiente de ATP ClpP fue identificada por intervenir en la degradación de sustratos (Gottesman *et al.*, 1992) existiendo un equivalente procariótico en el proteosoma eucariótico (Peters *et al.*, 2012).

Otro ejemplo de represor que ha sido objeto de estudio es el del bacteriófago Mu, denominado Rep, es conocido por estabilizar y mantener la lisogenia mediante su unión a los segmentos de ADN (O1, O2 y O3) actuando como operador y potenciador de la transposición, llevando a cabo las funciones necesarias para la replicación de Mu. Bajo ciertas condiciones fisiológicas en la bacteria, como la entrada en fase estacionaria, se puede promover la degradación o inactivación del represor llevando a la desrepresión de las funciones de transposición (Lamrani *et al.*, 1999). El dominio C-terminal (CTD) de Rep no solo contiene los motivos de reconocimiento para el inicio de la proteólisis si no que también modula la asociación del dominio N-terminal de unión al ADN (DBD) con el ADN, siendo el represor Rep sustrato de la proteasa ClpXP (Welty *et al.*, 1997).

Estudios previos demostraron que los últimos cinco residuos (VKKAV) del dominio CTD (CTD5) de Rep pueden funcionar como motivo de reconocimiento de ClpX, siendo capaz de promover la degradación del sustrato heterólogo cuando es unido al extremo C-terminal. Sin embargo, aparentemente la degradación de la proteína depende de cómo es presentado este motivo. Rep puede rápidamente ser degradado por desnaturalización debido a altas temperaturas (Mukhopadhyay *et al.*, 2003) o mediante la presencia de represores negativos Vir, los cuales tienen un C-terminal alterado y son altamente susceptibles de degradación por el complejo ClpXP (Geuskens *et al.*, 1992).

3. Complejos proteolíticos

En general las células están expuestas a números factores de estrés como pueden ser calor, radiación o agentes desnaturizantes, entre otros, los cuales causan la desnaturización de las proteínas, con la subsecuente agregación de las mismas. Para poder superar estos factores adversos las células disponen de mecanismos para incrementar la síntesis de proteínas de shock térmico (Hsp's) que incluyen tanto a proteasas como chaperonas (Mogk *et al.*, 2004).

Uno de los mas conservados procesos biológicos es la proteólisis intracelular, que es llevada a cabo por proteínas dependientes de ATP. En las células la proteólisis mantiene y forma el proteoma celular mediante la eliminación de las proteínas dañadas y la regulación de proteínas funcionales, como por ejemplo proteínas de regulación (Gottesman *et al.*, 1999).

Las proteasas dependientes de ATP son complejos proteolíticos conservados entre las eubacterias y las mitocondrias o cloroplastos de células eucariotas. En bacterias patógenas como *S. aureus* intervienen en diferentes procesos biológicos, como por ejemplo en el control de factores tanto de virulencia como de colonización (Gottesman *et al.*, 1992). Así, pueden tener un doble papel al eliminar proteínas dañadas durante situaciones de estrés y asegurar también la degradación de los principales reguladores como Spx, LexA o CtsR (Frees *et al.*, 2005). Otros ejemplos de vías metabólicas donde intervienen pueden ser en el metabolismo de la pared celular, supervivencia durante la fase estacionaria y la división celular y adaptación ante los cambios ambientales del hábitat. Por lo tanto los complejos proteolíticos son uno de los componentes claves en la respuesta al estrés ya que son requeridas para superar las adversas condiciones que se dan en el huésped (Li *et al.*, 2010).

Los dos componentes clave que forman los complejos proteolíticos son las **chaperonas** y las **proteasas**. Las **chaperonas** afectan a las estructuras proteicas mediante diferentes mecanismos y a menudo requieren ATP como energía para sus actividades. Están implicadas en ayudar a plegar las proteínas correctamente en su forma activa facilitando procesos moleculares. Las chaperonas también monitorizan estructuras proteicas a través de la célula y pueden rescatar aquellas que se encuentran desnaturizadas o desplegadas. Esta función es particularmente importante durante periodos de estrés donde hay un considerable incremento de proteínas dañadas. En determinados momentos, como en el final de la vida útil de las proteínas o cuando se dan daños irreversibles en la proteína, las chaperonas facilitan la degradación de esas proteínas mediante proteasas específicas, las cuales se

encuentran en la célula llevando a cabo diferentes roles (Wickner *et al.*, 1999; Gottesman *et al.*, 1997).

En cuanto al segundo componente, pero no menos importante, en el complejo proteolítico encontramos las **proteasas**. Como se ha citado anteriormente sobre las proteasas, no sólo son importantes para la eliminación de proteínas dañadas, si no que además están involucradas en el procesamiento de ciertas enzimas y proteínas reguladoras en su forma activa. Los productos proteicos obtenidos tras la proteólisis pueden actuar como señales de regulación que afectan a la expresión de algunos genes. Las proteasas degradan las proteínas mediante la ruptura del enlace peptídico entre aminoácidos, éstas pueden ser designadas como endo- o exopeptidasas, dependiendo de la posición del enlace peptídico partido dentro de la cadena polipeptídica. Las proteasas pueden ser también clasificadas según el sitio catalítico usado para romper los enlaces peptídicos de los substratos proteicos o bien pueden ser divididas en dos grupos diferenciados dependiendo si requieren energía en forma de ATP para llevar a cabo sus funciones. El grupo más caracterizado de proteasas dependientes de ATP se engloban en el grupo AAA+ (ATPasas asociadas a diversas actividades celulares)(Wickner *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004).

3.1. Proteasas AAA+

Las proteasas AAA+ son un grupo diverso de proteasas dependientes de ATP que incluyen los proteosomas 20S y 26S, FtsH, Lon, HslUV y proteasas Clp (Neuwald *et al.*, 1999). Son componentes clave en la mayoría de sistemas de supervivencia en células al igual que en la regulación de muchos eventos celulares. Frecuentemente funcionan en el proceso esencial de mantenimiento celular. También pueden ser inducibles por estrés, como por ejemplo Lon y proteasas ClpP en *E. coli*, aportando una extra actividad proteolítica necesaria para tratar la acumulación de proteínas dañadas de manera irreversible (Baker *et al.*, 2006; Sauer *et al.*, 2011).

Las proteasas AAA+ consisten en dos partes diferenciadas : una ATPasa perteneciente a la superfamilia AAA+ y un núcleo proteolítico. Ambas partes pueden tanto estar separadas dentro del mismo polipéptido como FtsH y Lon, o pueden estar divididas en dos o mas subunidades diferentes, como HslV, los proteosomas 20S y 26S y las proteasas Clp. Tanto en un caso como en el otro, los componentes ATPasa debe de poseer como mínimo un dominio AAA+ que contiene a su vez un dominio Walker A y B donde la unión e hidrólisis de nucleótidos ocurre (Neuwald *et al.*, 1999).

Los componentes ATPasa son responsables del reconocimiento de sustratos, generalmente forman estructuras cilíndricas hexaméricas con un poro central, en el cual las proteínas sustrato de unión son desplegadas y translocadas al núcleo proteolítico. El núcleo proteolítico está formado por una estructura en forma de barril, que consta de seis (HslV, Lon, FtsH) o siete subunidades (Clp, 20S y 26 proteosoma), donde los sitios activos se encuentran dentro de la estructura cilíndrica. El tipo de sitio activo y el mecanismo de degradación difiere entre las proteasas AAA+. La forma cilíndrica de la cámara proteolítica tiene una entrada estrecha a través de la cual solo proteínas desplegadas pueden pasar, razón por la cual el sustrato debe ser desplegado por el componente ATPasa previamente a la translocación (Baker *et al.*, 2006).

Las proteasas AAA+ varían en la especificidad del sustrato, para que las proteínas diana sean reconocidas por las proteasas, algunas de los sustratos poseen adicionales secuencias peptídicas en el dominio C-terminal, como por ejemplo SsrA, o en el dominio N-terminal, como por ejemplo la ubiquitina. Cambios estructurales en el sustrato como un desplegamiento parcial pueden también actuar como señal de reconocimiento. Una vez que el sustrato es identificado y unido, cada AAA+ proteasa tiene el mismo mecanismo básico para desplegar las proteínas e introducir las en la cámara proteolítica. Mediante la unión de ATP y la hidrólisis, los componentes ATPasa llevan a cabo cambios transformacionales que producen el desplegamiento de la proteína, así el polipéptido es translocado a través del poro central hasta la cámara proteolítica, donde progresivamente será degradado en diferentes sitios dando lugar a pequeños productos peptídicos (Kirstein *et al.*, 2009).

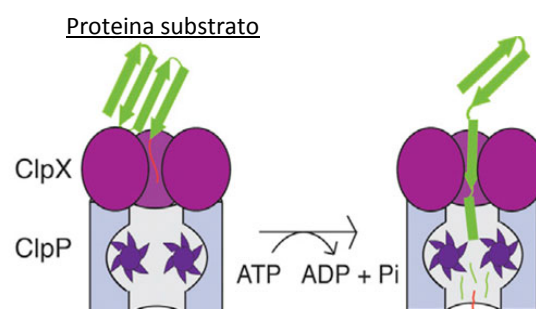


Figura 2. Modelo para el mecanismo de degradación de proteínas mediante las proteasas AAA+. El sustrato interactúa con la chaperona **ClpX** el cual es desplegado y translocado a través del núcleo central mediante el uso de la energía procedente de la hidrólisis de ATP. Posteriormente el sustrato es degradado en la cámara proteolítica, proteasa **ClpP**

3.1.1 Proteasas Clp

Las proteasas Clp han sido encontradas en diversas formas de vida, desde la bacteria hasta el ser humano, al igual que en parásitos y plantas. Clp son proteasas del tipo serina cuyo sitio catalítico lo forman residuos de aspartato, serina e histidina, siendo los tres aminoácidos esenciales para formar el sitio catalítico (Maurizi *et al.*, 1990). El núcleo proteolítico consiste en un único tipo de subunidad catalíticamente activo (ClpP) pero el tipo y la actividad de las subunidades pueden variar considerablemente dependiendo del organismo. Como otras AAA+ proteasas, Clp posee una parte ATPasa con forma de anillo hexamérico y un núcleo proteolítico formado por dos idénticos anillos heptaméricos ((Tsukiyama *et al.*, 1995; Gottesman *et al.*, 1997). Los componentes ATPasa de las proteasas Clp son reconocidas como miembros de la familia HSP100, chaperonas moleculares que pueden ser clasificadas en dos grupos principales, dependiendo del número de dominios AAA+ que posean. (Figura 3).

A. Clase I : Proteínas que poseen dos dominios AAA+, es decir, dos dominios de unión de ATP-nucleótidos. En este grupo podemos encontrar proteínas como ClpA, ClpB (presentes en *E.coli*) ClpC, ClpD, ClpE y ClpL (presentes en *B.subtilis*). La mayoría de los miembros de esta clase contienen una región que separa AAA+1 y AAA+2. Esta región común posee un dominio enrollado y se repite varias veces en la proteína, en concreto cuatro veces en ClpB y dos veces en ClpC y ClpE.

B. Clase II : Proteínas que contienen un dominio AAA+ cual es homólogo al segundo dominio AAA+ de las proteínas pertenecientes a la Clase I. Miembros de esta familia incluye como por ejemplo ClpX y ClpY (HslU). (Schirmer *et al.*, 1996)

En todos los casos de las proteínas pertenecientes a la familia Clp/Hsp, se observa que poseen un dominio N-terminal similar aunque puede variar considerablemente dentro de las proteínas. Ejemplos de ellos se encuentran en las proteínas ClpE y ClpX que poseen un dominio de unión de Zinc en su dominio N-terminal. ClpY tiene un dominio intermedio (I-dominio) situado dentro del modulo AAA+, el cual es correspondiente al dominio N-terminal de las proteínas Clp. En ClpA, el N-terminal esta compuesto de 150 secuencias de residuos con dos repeticiones de 75 aminoácidos (también conocido como dominio R). Esta estructura se observó en ClpA sola como formando un complejo de ClpA junto con una proteína adaptadora específica conocida como ClpS (Dougan *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2002).

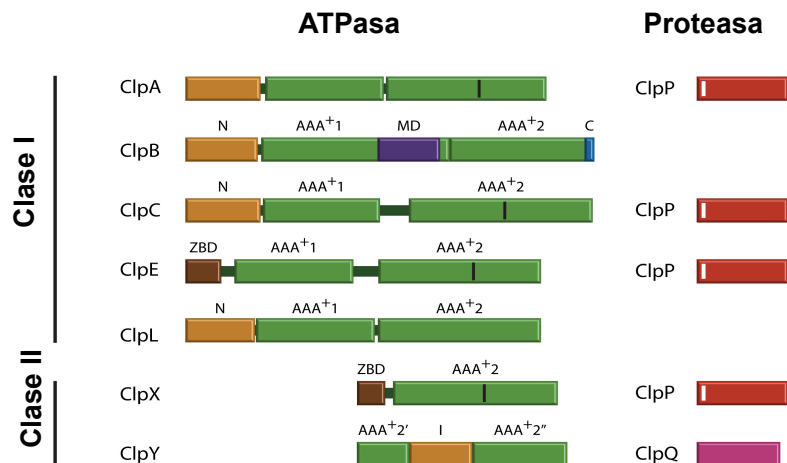


Figura 3. Estructuras de los dominios presentes en las proteasas Clp . Las ATPasas pertenecientes a la clase I y II se muestran en la parte izquierda de la imagen con sus respectivas proteasas asociadas en la derecha de la imagen. Los 70 residuos en el dominio N-terminal se muestran en color naranja. El dominio N-terminal de unión al Zinc (ZBD) de ClpE y ClpX se representan en color marrón. Los dominios AAA+ se muestran en color verde. El dominio enrollado situado en la parte central (MD) de ClpB se representa en color lila, el cual se sitúa dentro del dominio AAA+1. El dominio C-terminal de ClpB se muestra en color azul. La interacción de ClpP con las ATPasas se representan en color negro situado en la parte central de los AAA+2. El bucle axial en ClpP se muestra en color blanco.

En cuanto a la distribución de las proteínas Clp en los diferentes géneros bacterianos, se ven diferencias dependiendo de un género u otro. Así en bacterias Gram negativas como *E.coli* se encuentran mayoritariamente proteasas ClpA, ClpX, ClpP y ClpS (Dogan *et al.*, 2002). El gen ClpX se encuentra en un operon junto con ClpP y ambos son co-expresados constitutivamente (bajo el control de $\sigma 70$). Los genes *clpA* y *clpS* están situados en un segundo operon y se expresan también bajo control de $\sigma 70$. Estudios mutacionales han mostrado que la variedad de proteínas Clp en *Escherichia coli* no son esenciales para el crecimiento, pero si son cruciales para la supervivencia y crecimiento bajo condiciones de estrés (Erbse *et al.*, 2006).

Respecto a las bacterias Gram positivas, en la mayoría que se han estudiado hasta ahora se han visto cuatro tipos de ATPasas : ClpX, ClpE, ClpL , ClpB y ClpY. En cuanto al núcleo proteolítico se ha visto como tipo de proteasa, ClpP y ClpQ (Frees *et al.*, 2007). En muchas de estas bacterias el gen *clpP* es inducible bajo condiciones de estrés por choque térmico, tanto elevadas como bajas temperaturas (Gaillot *et al.*, 2000). Al contrario que ocurre con la función de ClpX, la cual varía significativamente entre bacterias Gram positivas y *E.coli* (Nair *et al.*, 1999). La delección del gen *clpX* en *Bacillus subtilis* conlleva a la restricción en el crecimiento durante condiciones de

elevada temperatura (Gerth *et al.*, 1998), mientras que la misma mutación en *Staphylococcus aureus* incrementa la capacidad de tolerancia ante condiciones de estrés por elevadas temperaturas y bajas. En general en el género *Streptococci* ClpX es esencial para el crecimiento normal (Skinner *et al.*, 2001). En cuanto a la proteasa ClpC. ClpE en *B.subtilis* es relativamente bajo durante el crecimiento normal en la bacteria pero se incrementa en situaciones de estrés (Mienthke *et al.*, 2006), el nivel de ClpE es regulado en bacterias Gram positivas por la presencia de ClpCP y ClpXP (Derre *et al.*, 1999). La expresión de la mayoría de las proteínas Clp en bacterias Gram positiva, excepto ClpX, es controlada a través de un sistema que involucra el represor CtsR, que a su vez es regulado por tres proteasas Clp dependiendo de las condiciones de crecimiento. (Nakano *et al.*, 2002).

4. Respuesta SOS

Como se ha citado anteriormente, durante situaciones de estrés, la bacteria desencadena un mecanismo llamado Respuesta SOS, mediante la cual se permite la supervivencia de dicho organismo. Existen múltiples agentes que promueven la respuesta SOS en la bacteria. La mayoría provocan daños en el DNA. Alguno de estos agentes son la radiación ultravioleta, agentes químicos como la mitomicina C (agente alquilante que produce entrecruzamientos en el DNA) y ciertos antibióticos como las quinolonas. También se han descrito agentes capaces de inducir el sistema SOS sin causar aparentemente daños en el DNA, como la inducción mediada por altas presiones en *E. coli* (Aertsen *et al.*, 2004), o la inducción del SOS, de forma dependiente de cAMP, en condiciones de inanición (Taddei *et al.*, 1995). Durante el proceso de síntesis semiconservativa de DNA, la horquilla de duplicación puede encontrar lesiones o deformaciones en la estructura helicoidal del DNA que detienen o bloquean a la polimerasa, dando lugar a huecos o regiones de una hebra a los que se une RecA para iniciar el proceso que conduce a la activación de SOS. Los anillos de ciclobutano, también conocidos como dímeros de pirimidina, que resultan de la exposición a la luz ultravioleta son un ejemplo clásico de este tipo de deformaciones en la hélice de DNA. Otro caso es el de las rupturas dobles, en donde es necesaria la intervención de diversas enzimas como helicasas o nucleasas, para que finalmente se forme el sustrato que pueda reconocer RecA y se inicie la respuesta SOS (Radman 1975).

El sistema SOS es un regulón compuesto por más de 40 genes, que controla la respuesta frente a daños en el ADN. Está controlado por las proteínas LexA y RecA. El producto de *recA* actúa como regulador positivo y el de *lexA* como represor del sistema (Redman 1975). **LexA** es un dímero formado por dos subunidades cada una

de 22.7 kD, unidas a través de sus extremos carboxílicos 9-11. Gracias a la atracción de los extremos amino, el dímero reconoce y se pega a una secuencia consenso conocida como “caja SOS”, presente en todos los operadores de los genes pertenecientes a esta vía, e impide el reconocimiento por la polimerasa de RNA con lo que bloquea la transcripción (Luo *et al.*, 2001). La proteína **RecA** funciona como regulador positivo del sistema SOS. En presencia de dATP o de ATP, RecA forma filamentos en el ssDNA, adquiriendo actividad coproteasa (RecA*) ayudando en la hidrólisis del represor LexA, el cual se separa en dos fragmentos polipeptídicos sin actividad, lo que produce la desrepresión del sistema y la transcripción de los genes del sistema SOS (Little *et al.*, 1980) (Figura 4). Cuando ocurre alguna lesión o se interrumpe la síntesis de DNA se genera una señal que promueve el paso de la proteína RecA al llamado estado activo (RecA*) y donde funciona como coproteasa al promover la autodegradación de LexA por la ruptura del enlace peptídico Ala 84-Gly 85 que se encuentra a la mitad de la proteína. En este estado LexA es incapaz de unirse a la caja SOS con lo que se incrementa la expresión de los genes de la vía. Un aspecto importante en cuanto a la respuesta SOS es que su actividad se puede regular de acuerdo al grado de daño inflingido sobre el material genético. Así, el momento de la transcripción, la duración y el nivel de expresión de cada gen SOS varía dependiendo de la cantidad de daño que se genere y de la afinidad de cada operador de SOS por el represor LexA. Una vez reparado el daño genético, se pierde la señal de inducción, cesa la degradación del represor LexA, aumentan sus niveles intracelulares y se vuelve a unir a los operadores de SOS, con lo que se inactiva nuevamente el sistema (Little *et al.*, 1980)

El control de la transcripción de *lexA* está muy finamente regulado, de manera que el nivel de respuesta SOS es proporcional al nivel de daño que se produce, evitando así falsos disparos de la respuesta que podrían producir una disminución en la tasa de crecimiento (Camas *et al.*, 2006). Además de RecA y LexA, se han descrito otros reguladores como DinI, que podría actuar como un regulador negativo modulando la inducción de la respuesta SOS al inhibir la autoproteólisis de LexA (Yasuda *et al.*, 1998). Cuando se genera la respuesta SOS se desencadena la expresión de múltiples genes que participan en la reparación, replicación, recombinación y división celular. Además de la inducción de estos genes, cuando se induce el sistema SOS también puede inducirse la transcripción de otros genes extracromosómicos, como los que codifican para colicinas y microcinas (Gillor *et al.*, 2008).

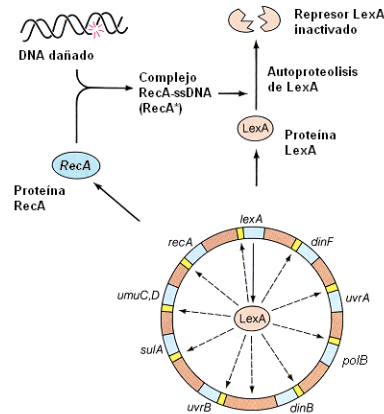


Figura 4. Representación esquemática de la inducción del sistema SOS. Cuando se producen daños en el DNA o la replicación del DNA se bloquea se acumula DNA de cadena simple (ssDNA). La proteína RecA se une al ssDNA formando el complejo RecA*, el cual ayuda en la hidrólisis de LexA, que deja de ejercer su función represora permitiendo la transcripción de los genes SOS.

4.1. Proteasas y Respuesta SOS

Hay estudios que relacionan la degradación en *Escherichia coli* por parte de las proteasas ClpXP y Lon (Little *et al.*, 1983; Neher *et al.*, 2003). En los últimos años cada vez más estudios han demostrado que muchas proteínas del regulón SOS son inestables, y estos cambios en la estabilidad proteolítica son importantes para el control proteico. *E. coli* emplea tres proteasas citoplasmáticas dependientes de ATP : ClpXP, Lon y HslUV para degradar numerosas proteínas reguladoras de la respuesta SOS. Ejemplos de ello es el represor LexA, un componente de la vía de NER (nucleotide excision repair) UvrA, componentes de la polimerasa V como UmuD, UmuD' y Umuc), la proteína reparadora de rotura en DNA conocida como RecN y el inhibidor en la división celular SulA (Neher *et al.*, 2003). Recientes estudios en *E. coli* han mostrado como de todas las proteínas implicadas en la respuesta SOS un 25% fueron sustratos de ClpXP (Neher *et al.*, 2006).

Con respecto a LexA, ClpXP reconoce específicamente los fragmentos por destrucción generados tras la escisión de LexA promovida por la activación de RecA*. La nueva secuencia C-terminal presente en el fragmento N-terminal en LexA (VAA-coo-), que es similar a la secuencia diana (LAA-coo-) presente en *ssrA*, sustrato también de ClpXP (Neher *et al.*, 2003). Los residuos LAA presentes en el final de la secuencia en *SsrA* son determinantes para el reconocimiento por ClpXP (Flynn *et al.*, 2001). Estudios posteriores mostraron por qué era importante el extremo C-terminal carboxilado para la interacción con ClpX, explicando por qué esta secuencia es

específicamente reconocida cuando se localiza en la parte C-terminal de la proteína. Por tanto la degradación del fragmento N-terminal por parte de ClpXP juega un importante papel biológico al ayudar a la supervivencia celular en condiciones de daño en el ADN (Neher *et al.*, 2003).

NER es una vía de reparo de ADN que elimina un amplio rango de lesiones en el ADN a través de las proteínas UvrABC. Los genes *uvrA* y *uvrB* codifican componentes claves en esta vía y pertenecen a la red SOS (Kenyon *et al.*, 1982). Se ha mostrado como es necesario la presencia de ADN no dañado para la degradación dependiente de ClpXP de UvrA in vitro. Esta observación sugiere que UvrA se una al ADN no dañado y esta forma es reconocida por ClpXP (Pruteanu *et al.*, 2009).

Las proteínas Umu actúan de acuerdo con RecA, SsB y la polimerasa III para facilitar el proceso de transducción. Las proteínas Umu son sustratos de las proteasas Lon y ClpXP y su estabilidad está profundamente relacionada por la interacción con las demás proteínas. La proteasa Lon rápidamente degrada UmuD antes de que se convierta en su forma activa conocida como UmuD y también degrada UmuC antes de su estabilización por la interacción con UmuD.

La proteína RecN esta involucrada en el reparo de la rotura de la doble cadena de ADN, esta proteína posee un periodo de vida corta y es degradada por ClpXP mediante la vía de reconocimiento de la señal de degradación de su extremo C-terminal (Neher *et al.*, 2006). La secuencia del extremo C-terminal de RecN es muy similar a la secuencia diana de degradación de *ssrA*. El daño inducido en el ADN promueve diferentes formas de RecN tanto asociadas al nucleoide como al citoplasma. La degradación de RecN citoplasmático mediante ClpXP es importante para la viabilidad celular en células bajo estrés con ADN dañado (Nagashima *et al.*, 2006).

Capítulo II



Objetivos

Como hemos mencionado anteriormente, las proteasas Clp son esenciales para la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. Estudios previos relacionan las proteasas Clp con el represor LexA de la respuesta SOS (Cohn *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta la homología entre LexA y el represor CI para los profagos de *Staphylococcus aureus* decidimos centrarnos en la posible implicación de las proteasas en su metabolismo. En concreto, los objetivos que nos planteamos en la presente tesis doctoral son:

- ❖ Caracterización de las proteasas Clp en la biología de bacteriófagos de *S. aureus*.
- ❖ Caracterización del represor CI en mutantes Clp en *S. aureus*.
- ❖ Caracterización del represor LexA en mutantes Clp en *S. aureus*.
- ❖ Estudio de la respuesta SOS en mutantes Clp. en *S. aureus*.

Capítulo III



Resultados

- I. **El complejo ClpPX controla la inducción profagos de *Staphylococcus aureus*.**

Estudios previos han demostrado una implicación de las proteínas Clp en la degradación del represor LexA durante la respuesta SOS (Cohn *et al.*, 2010). Dado que Cl y LexA son estructuralmente análogos, nos centramos en el estudio de una posible implicación de estas proteasas en el metabolismo del represor Cl. Concretamente, estudiamos si las proteasas Clp podían afectar a los ciclos líticos o lisogénicos de los fagos de *S. aureus*.

Papel de las proteínas Clp en la inducción de profagos

Para estudiar la posible relación de las proteínas Clp y los bacteriófagos se procedió a realizar el siguiente experimento: se generaron mutantes de las principales proteasas Clp en *S. aureus* y las cepas mutantes obtenidas se infectaron con diferentes profagos, con el objetivo de testar el comportamiento de dichos fagos en ausencia de estas proteínas mediante la titulación de los mismos. Para la elaboración de mutantes nos centramos en las proteínas Clp más comunes en *S. aureus*: X, C, L, YQ, B y P, y se obtuvieron mutantes en la cepa RN450, la cual no posee ningún profago. En cuanto a los bacteriófagos, se estudiaron los fagos modelos de *S. aureus* $\phi 80\alpha$, $\phi 11$, $\phi 85$ y ϕ SLT. Los fagos $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$ poseen un represor Cl diferente al fago $\phi 85$ y ϕ SLT, cuyos represores tienen una estructura diferente y actúan mediante otras vías metabólicas.

En cuanto a la proteasa ClpP se generó un mutante adicional en el que se expresaba la proteína pero ésta era afuncional al tener mutado el sitio catalítico (mutante Clp P⁻). También se quiso estudiar un doble mutante de ClpX y ClpP, al ser éste el principal complejo proteolítico en *S. aureus*, con el objetivo de analizar los posibles efectos en ausencia de ambas proteínas.

Para la elaboración de mutantes se generaron inicialmente mutantes mediante la inserción de cassettes de eritromicina. A partir de los mismos se generaron lisógenos en los diferentes mutantes en las proteasas. Posteriormente, los profagos presentes en las distintas cepas generadas se indujeron con mitomicina C (MC), y el título de los fagos obtenidos se analizó utilizando la cepa RN4220 como aceptora. Tal y como se observa en la Tabla 1 las proteasas ClpP y ClpX resultaron esenciales para la inducción de los profagos residentes, al observarse un descenso en el número de partículas infectivas formadas en comparación con la cepa silvestre y el resto de mutantes Clp.

Tabla 1 : Efecto en el título de fago $\phi 80$ alpha, fago $\phi 11$, fago $\phi 85$ y fago ϕ SLT durante la inducción de los mutantes Clp.

Cepa Donadora	Título $\phi 80\alpha$ ^b	Título $\phi 11$ ^b	Título $\phi 85$ ^b	Transducción ϕ SLT ^c
RN450	6.8×10^{10}	7.3×10^8	6.8×10^9	1.3×10^6
$\Delta clpX::erm$	< 10	< 10	4.6×10^7	4.6×10^2
$\Delta clpP::erm$	1.4×10^4	2.2×10^4	3.4×10^7	2.2×10^2
$\Delta clpP'::erm$	1.7×10^4	1.3×10^4	1.7×10^7	1.3×10^2
$\Delta clpC::erm$	7.8×10^9	7.8×10^9	8.8×10^9	7.5×10^6
$\Delta clpPX::erm$	< 10	< 10	2.3×10^7	1.2×10^2
$\Delta clpB::erm$	9.7×10^9	5.3×10^9	4.5×10^9	3.2×10^6
$\Delta clpL::erm$	6.5×10^9	8.1×10^8	6.5×10^9	2.9×10^6
$\Delta clpYQ::erm$	4.5×10^9	4.6×10^9	4.9×10^9	7.7×10^6

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando la cepa RN450 como aceptora.

^c N° de transductantes x ml de cultivo inducido, usando la cepa RN450 como aceptora.

En vista a los resultados en la Tabla 1, se observa como la ausencia de ClpP impacta en menor grado en el título del fago que el causado por la proteasa ClpX en el fago $\phi 80$ alpha y fago $\phi 11$. Otra observación a tener en cuenta es como estas proteasas afectan en grado diferente según el profago residente, observándose un efecto más dramático en el fago $\phi 80$ alpha, fago $\phi 11$ y en un menor grado en el fago $\phi 85$ y fago ϕ SLT.

Con los datos obtenidos decidimos centrarnos en el papel de las proteasas ClpX y ClpP en la inducción de profagos, generando una segunda versión de mutantes mediante delección por pMAD, de esta manera nos aseguramos testar los mutantes sin riesgo de conllevar ninguna alteración en el fenotipo por la inserción de cassettes.

Seguimos el mismo procedimiento que el llevado a cabo para la inducción de profagos en la primera versión de mutantes, usando la cepa RN450 y el mutante *clpC* como controles. Como se puede observar en la Tabla 2, se obtienen resultados similares que en la Tabla 1, confirmándose como la presencia de las proteínas Clp son esenciales para la inducción de los profagos residentes.

Tabla 2 : Efecto en el título de fago $\phi 80$ alpha, fago $\phi 11$, fago $\phi 85$ y fago ϕ SLT durante la inducción de los mutantes Clp.

Cepa Donadora	Título $\phi 80\alpha$ ^b	Título $\phi 11$ ^b	Título $\phi 85$ ^b	Transducción ϕ SLT ^c
RN450	4.5×10^{10}	6.8×10^8	5.8×10^9	8.2×10^6
$\Delta clpX$	< 10	< 10	6.2×10^7	3.6×10^2
$\Delta clpP$	2.6×10^4	3.7×10^4	2.1×10^7	1.0×10^2
$\Delta clpP^+$	7.1×10^4	1.8×10^4	5.7×10^7	3.2×10^2
$\Delta clpC$	5.2×10^9	8.0×10^9	3.8×10^9	4.9×10^6
$\Delta clpPX$	< 10	< 10	2.1×10^7	1.0×10^2

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando la cepa RN450 como aceptora.

^c N° de transductantes x ml de cultivo inducido, usando la cepa RN450 como aceptora.

Analizando los resultados obtenidos en las Tablas 1 y 2 se puede observar como las proteasas ClpP y ClpX son esenciales para la inducción de los profagos residentes. Curiosamente, y aunque se asume que ambas proteasas actúan de manera conjunta, el mutante en *clpX* mostró un título menor que el mutante en *clpP* tras la inducción de los fagos 80α y $\phi 11$, pero no tras la inducción de los fagos ϕ SLT y $\phi 85$, lo que sugiere que ClpX posee funciones adicionales para la inducción del ciclo de los fagos 80α y $\phi 11$. La base molecular que explica esta diferencia de inducción está en estudio.

La complementación de los mutantes ClpP y ClpX restaura la inducción de los profagos residentes

Con el objetivo de corroborar el papel de las proteínas Clp en la inducción de fagos se realizaron las complementaciones de los mutantes con proteasas ClpX y ClpP procedentes de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, de esta manera podremos analizar si el efecto negativo en la inducción de los fagos es generado únicamente por la ausencia proteasas. Además se nos permitirá estudiar si estas proteínas están conservadas a lo largo del genero bacteriano Gram positivo.

Se analizó la capacidad de producir partículas infectivas por parte del fago lisógeno en los mutantes complementados. Decidimos centrarnos en uno de los fagos más estudiados para *S. aureus* y que más se afectaba por la ausencia de las proteasas, así se procedió a la inducción del fago $\phi 11$ en las diferentes cepas para poder testar el título del mismo. Como se observa en la Tabla 3, en las cepas complementadas durante la inducción se restaura el título del fago, confirmándose que el efecto negativo generado en la inducción es debido únicamente por la ausencia de las proteasas ClpP y ClpX.

Tabla 3 : Efecto en el título del fago $\phi 11$ durante la inducción en los mutantes Clp y en los mutantes complementados con las proteasas Clp de *S. aureus* y *E. faecalis*.

Cepa Donadora	Título $\phi 11$ ^b	Cepa Donadora	Título $\phi 11$ ^b
RN450 $\phi 11$ RN451	8.6×10^9	RN450 $\phi 11$ RN451	8.6×10^9
$\Delta clpX$ $\phi 11$ JP8106	<10	$\Delta clpP$ $\phi 11$ JP8107	1.8×10^4
$\Delta clpX$ $\phi 11$ JP9917	4.2×10^9	$\Delta clpP$ $\phi 11$ JP9913	6.7×10^9
$\Delta clpX$ $\phi 11$ JP9918	3.1×10^9	$\Delta clpP$ $\phi 11$ JP9914	7.4×10^9

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN450 como cepa aceptora.

Como se observa en la Tabla 3, la inducción del fago es restaurada con la presencia de dichas proteasas, tanto las procedentes de *S. aureus* como *E. faecalis*, indicando pues que las proteínas Clp son esenciales para la inducción de los fagos y se encuentran conservadas a lo largo del género Gram positivo.

Papel de las proteínas Clp en el ciclo de los fagos de *S. aureus*

A la vista de los resultados previos, nos planteamos conocer si las proteínas Clp influían en otras fases del ciclo del fago. Los fagos temperados, tras su inducción, presentan 4 fases claramente diferenciadas: escisión, replicación, empaquetamiento y lisis celular.

Con el objetivo de testar si algún estadio del ciclo se veía afectado por la ausencia de dichas proteasas realizamos una PCR con oligonucleótidos específicos del fago $\phi 11$ para medir la capacidad de escisión en la cepa salvaje y en los lisógenos mutantes Clp. Como control se utilizó la cepa lisogénica para el fago $\phi 11$ (RN451) que es capaz de escindir. En la Figura 5 se puede observar como la mutación en *clpX* afectaba a la escisión durante el ciclo del fago, a diferencia de lo observado para el mutante en *clpP*, *clpC* y cepa silvestre, donde se aprecia banda de escisión.

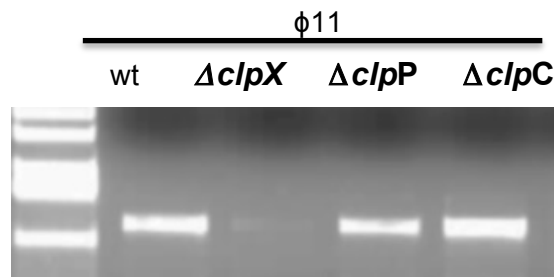


Figura 5. PCR de escisión. Tras la extracción de ADN de muestras tomadas de un cultivo a los 90 minutos tras la inducción con MC, se llevó a cabo la PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el fago $\phi 11$. Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), RN451 $\phi 11$ (cepa silvestre carril 1), $\Delta clpX$ $\phi 11$ (carril 2), $\Delta clpP$ $\phi 11$ (carril 3), $\Delta clpC$ $\phi 11$ (carril 4). La presencia de banda indica la escisión del fago, la cual es ausente en el mutante en *clpX*.

En vista a los resultados de la Figura 5, vemos la etapa de escisión del fago se afectaba en el mutante *clpX*, indicando el doble papel de la proteasa ClpX durante el ciclo lisogénico del fago en los procesos de inducción y escisión. Este dato resuelve la pregunta planteada acerca del efecto dramático en el título del fago en el mutante *clpX*.

Decidimos entonces analizar la siguiente etapa en el ciclo de los fagos temperados, la replicación. Estudiamos la capacidad de los profagos inducidos para replicar en los diferentes mutantes. Para ello se analizó la replicación del fago $\phi 11$ tras la inducción de la cepas salvaje, y de los mutantes *clpP* y *clpX*. Se trataron las cepas con mitomicina C (MC) y se tomaron muestras a los 0 y 60 minutos tras la inducción.

Una vez procesadas las muestras, se separaron en un gel de agarosa, donde se fotografiaron, para realizar posteriormente un Southern blot con una sonda específica para el fago. Asumimos que si se observa una banda significativa de replicación, el fago debe replicar correctamente. En los mutantes de las proteasas *clpX* y *clpP* no se observa dicha banda, asumimos pues que la inducción del fago $\phi 11$ está afectada (Figura 6).



Figura 6. Estudio de la replicación del fago $\phi 11$ en los mutantes Clp. Tras la inducción con MC, se tomaron muestras a los tiempos indicados y una vez procesadas, se realizó un Southern blot con una sonda específica para dicho fago. La banda que aparece a los 60 min se corresponde con el DNA del fago en replicación (carril 2). Las mutaciones en las proteasas Clp afectan a la inducción del fago (carril 4 y 14) la cual es restaurada en los mutantes complementados con las proteasas tanto de *Staphylococcus aureus* como de *Enterococcus faecalis* (carril 6, 8, 10 y 12).

La Figura 6 muestra como el profago residente no puede inducirse en ausencia de las proteasas ClpX y ClpP y como la inducción es restaurada al complementar las cepas mutantes, concluyendo pues que el efecto negativo observado durante la inducción de los profagos se debe únicamente a la ausencia de las proteínas ClpX y ClpP. Estos datos corroboran a los obtenidos durante los estudios de inducción (Tabla 1 y 2), donde se aprecia como las proteasas ClpX y ClpP son esenciales para la inducción del fago al afectarse durante la ausencia de las proteínas. En la Figura 2 vemos como las proteasas Clp se encuentran conservadas dentro del género bacteriano Gram positivo, al obtener el mismo resultado de complementación con las proteasas tanto de *S. aureus* y *E. faecalis*.

Como resumen a lo obtenido hasta ahora vemos que las proteasas influyen en la inducción de los fagos lisógenos al estar afectadas la inducción de los mismos en ausencia de las proteasas ClpX y ClpP. Aunque ambas están implicadas en el ciclo de los fagos en diferente grado : el efecto en el comportamiento del fago en ausencia de ClpX es diferente al mostrado en ausencia de ClpP, debido a su implicación durante la escisión. Durante la inducción del fago también se aprecia como según el profago

residente el efecto en la inducción varía por la ausencia de las proteasas varía, afectándose de manera diferente el fago $\phi 80$ alpha, fago $\phi 11$, fago $\phi 85$ y fago ϕ SLT. Con los experimentos de complementación se ve como las proteasas son las causantes del fenotipo negativo generado durante la inducción y cómo estas proteínas Clp se encuentran conservadas a lo largo del género Gram positivo.

Las proteínas Clp no afectan la infección de profagos

Considerando que los bacteriófagos tienen dos ciclos de desarrollo, lítico y lisogénico, se procedió a estudiar si las proteasas tenían un papel determinante durante el ciclo lítico, por lo que nos centramos en la infección con los fagos.

Inicialmente, las diferentes cepas mutantes se infectaron con los fagos en estudio, y se comparó el título de estos fagos en las cepas mutantes y en la cepa original. En este caso decidimos infectar los mutantes obtenidos por pMAD y los mutantes por inserción. Tal y como se puede comprobar en las Tabla 4, las proteasas Clp no afectan al ciclo lítico de los fagos.

Tabla 4 : Efecto en el título de fago $\phi 80$ alpha, fago $\phi 11$, fago $\phi 85$ y fago ϕ SLT durante la infección de los mutantes Clp.

Cepa Aceptora	Título $\phi 80\alpha$ ^b	Título $\phi 11$ ^b	Título $\phi 85$ ^b	Transducción ϕ SLT ^c
RN450	1.2×10^{10}	6.5×10^9	7.9×10^8	5.2×10^6
$\Delta clpX$	6.0×10^9	7.0×10^9	5.7×10^9	6.6×10^6
$\Delta clpP$	7.4×10^9	5.3×10^9	8.9×10^8	7.4×10^6
$\Delta clpP^-$	8.6×10^9	9.0×10^9	5.3×10^9	3.3×10^6
$\Delta clpC$	3.9×10^9	6.7×10^9	4.6×10^9	5.3×10^6
$\Delta clpPX$	2.3×10^9	1.6×10^9	6.6×10^9	3.4×10^6
$\Delta clpB::erm$	5.1×10^9	8.1×10^9	3.8×10^9	6.9×10^6
$\Delta clpL::erm$	7.0×10^9	6.9×10^9	8.9×10^8	7.1×10^6
$\Delta clpYQ::erm$	9.8×10^9	8.3×10^9	5.5×10^9	4.2×10^6

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de calvas de fago x ml de cultivo inducido.

^c N° de transductantes x ml de cultivo inducido.

En vista a los resultados obtenidos en Tabla 4, vemos como el ciclo lítico de los fagos estudiados no se afecta, centrándonos pues en el ciclo lisogénico, al ser esta vía afectada por las proteínas Clp. Una de las proteínas implicadas en la regulación del ciclo lisogénico es el represor CI, el cual no interviene durante el ciclo lítico. Considerando los resultados previos del papel de las proteínas Clp respecto al ciclo lisogénico y los estudios previos respecto a LexA (Cohn *et al.*, 2010), represor homólogo de CI, decidimos analizar un posible papel de las proteasas en el metabolismo del represor CI del fago modelo $\phi 11$.

Estudio de las proteasas ClpX y ClpP en *E. coli*

Dado que el complejo proteolítico ClpPX es esencial para la inducción de los fagos de las *S. aureus* (bacteria Gram-positiva), nos preguntamos si eso también sería cierto para las bacterias Gram-negativas (*E. coli*). Para ello se generaron mutantes en *E. coli* en los genes *clpX* y *clpP*. Siguiendo con la misma estrategia que anteriormente se elaboraron lisógenos en las cepas mutantes para los profagos lambda, HK106 y HK544, y se indujeron para poder testar el título de los mismos (Tabla 5). El objetivo era analizar el posible efecto de dichas proteasas pudiesen tener en el ciclo de estos fagos. Contrariamente a lo que ocurre en *S. aureus*, las proteasas ClpPX no tuvieron ningún papel en la inducción de los profagos en *E. coli* (Tabla 5). Tampoco se encontraron diferencias al analizar el ciclo lítico de los fagos (Tabla 6). Nuestros resultados, por tanto, sugieren que las proteasas Clp únicamente tienen un papel en la inducción de profagos en bacterias Gram positivas.

Tabla 5 : Efecto en el título de los fagos $\phi \lambda$, ϕ HK106 y ϕ HK544 durante la inducción de los lisógenos en los mutantes Clp.

Cepa Donadora	Título $\phi \lambda$ ^b	Título ϕ HK106 ^b	Título ϕ 544 ^b
MG1655 + fago	5.6×10^7	2.5×10^6	3.6×10^7
$\Delta clpX$ + fago	8.1×10^7	6.7×10^5	7.4×10^7
$\Delta clpP$ + fago	4.3×10^7	5.4×10^6	6.8×10^7

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando MG1655 como cepa aceptora.

Tabla 6: Efecto en el título de los fagos $\phi \lambda$, ϕ HK106 y ϕ HK544 durante la infección de los mutantes Clp.

Cepa Aceptora	Título $\phi \lambda$ _b	Título ϕ HK106 _b	Título ϕ HK544 _b
JP 10363 MG1655	6.8×10^7	1.8×10^5	4.7×10^7
JP 11089 Δ ClpX	5.7×10^7	3.3×10^5	9.4×10^7
JP 11090 Δ ClpP	8.4×10^7	1.3×10^5	9.2×10^7

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de calvas de fago x ml de cultivo inducido.

Las mutaciones en las proteasas ClpP y ClpX no afectan a la movilidad de islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) son segmentos cromosomales discretos, de un tamaño variable de entre 15-20 Kb, que generalmente codifican para toxinas, como la del síndrome del shock tóxico (TSST-1) u otros superantígenos (Lindsay *et al.*, 1998; Novick, 2003), o para otros factores de virulencia o de adaptación al hospedador (Ubeda *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2010).

Las SaPIs presentan una relación muy estrecha con los bacteriófagos de *S. aureus*, similar a la relación que mantienen los fagos P2 y P4 de *E. coli*, donde el fago satélite P4 parasita algunas de las funciones de P2 para poder transferirse (Ghisotti *et al.*, 1995; Lindqvist *et al.*, 1993). Así, para la movilización de las SaPIs es necesaria la infección de la cepa portadora de isla por parte de un fago o la inducción de profagos residentes, lo que conlleva la escisión de la isla del cromosoma bacteriano, su replicación, empaquetamiento y su transferencia en alta frecuencia (Lindsay *et al.*, 1998; Ubeda *et al.*, 2005).

Considerando los experimentos previos respecto al efecto en los profagos de *S. aureus* en ausencia de las proteasas Clp y teniendo en cuenta que las SaPIs son movilizadas mediante la inducción de profagos, se procedió a testar la transducción de isla en los mutantes mediante la infección de la cepa silvestre y mutantes portadores de isla, con el objetivo de analizar posibles efectos en la movilidad de este elemento genético. Para ello se testó el título de isla en los mutantes usando como fagos infectivos $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$. En la Tabla 7 se observa como la ausencia de estas proteasas no afectan a la transducción de la isla.

Tabla 7: Efecto en la transducción de isla mediante infección del fago $\phi 80\alpha$ y fago $\phi 11$ en los mutantes Clp.

Cepa Donadora	ϕ	Título Transducción ^b	ϕ	Título Transducción ^b
JP 1794	$\phi 11$	2.4×10^8	$\phi 80\alpha$	1.6×10^8
JP 12513	$\phi 11$	6.3×10^7	$\phi 80\alpha$	6.6×10^8
JP 12514	$\phi 11$	5.1×10^7	$\phi 80\alpha$	7.2×10^8
JP 12516	$\phi 11$	3.2×10^8	$\phi 80\alpha$	5.1×10^8
JP 12517	$\phi 11$	5.5×10^7	$\phi 80\alpha$	3.4×10^8
JP 12518	$\phi 11$	2.9×10^8	$\phi 80\alpha$	5.9×10^8

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN450 como cepa aceptora.

En vista del experimento de transducción de isla se puede observar como las mutaciones en las proteasas no afectan a la movilidad de la isla, el fago puede transducir dicho elemento genético en ausencia de las proteínas Clp, a diferencia de lo que ocurre en los resultados previos con respecto a la inducción de los profagos, (Tabla 1 y 2). Por lo que podemos concluir esta parte de resultados con la implicación de las proteínas ClpX y ClpP en la inducción de los fagos, al contrario de lo que ocurre durante el proceso de infección y la transducción de isla, donde no se observan alteraciones. Con todos los datos obtenidos hasta ahora nos llevan al estudio de una posible implicación de las proteínas Clp en el represor CI, al ser la proteína reguladora del ciclo lisogénico y ser homóloga de LexA.

II. La degradación del represor CI en *Staphylococcus aureus* está controlada por las proteasas ClpP y ClpX.

Los bacteriofagos temperados están regulados por proteínas represoras (CI-like) codificadas por el fago. Durante la lisogenia las proteínas reguladoras bloquean la transcripción de los genes implicados en el ciclo lítico por la unión a los promotores tempranos en la secuencia de ADN. En fagos de *E. coli* la inducción del fago lítico ocurre después de la activación de la respuesta SOS, la cual promueve, a través de la activación de RecA*, la autodegradación del represor *ci*, resultando en un dominio C-terminal y un dominio de unión a ADN N-terminal, el cual mantiene cierta actividad de unión al ADN (Flynn *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que el represor CI es la proteína clave durante la inducción de profagos nos quisimos centrar en su estudio. Como se ha comentado previamente en la introducción, CI es una proteína homóloga al represor LexA, la cual estudios previos han demostrado la implicación de las proteasas en su degradación durante la respuesta SOS, concretamente en la degradación del extremo N-terminal de LexA (Cohn *et al.*; 2010). En vista a los resultados obtenidos anteriormente nos planteamos una posible hipótesis del papel de las proteasas Clp en la regulación de *ci* durante condiciones de estrés en la bacteria modelo *Staphylococcus aureus*.

Estudios del represor *ci* a nivel transcripcional y proteico en los mutantes Clp

Con el objetivo de analizar la hipótesis planteada anteriormente se generaron fusiones transcripcionales que expresan el represor *ci* y antirepresor *cro* usando el plásmido pCN41 (Figura 3). De este manera se nos permite el análisis de su expresión durante la activación del ciclo lítico. Para ello dichas construcciones se transformaron en la bacteria modelo *S. aureus* y en los diferentes mutantes en *clpX* y *clpP*. Con el fin de analizar la expresión del represor *ci* se realizó el ensayo beta-lactamasa, se adicionó al medio mitomicina c (MC), induciendo así la respuesta SOS y activación del ciclo lítico, y se tomaron muestras a diferentes tiempos. La presencia del gen beta-lactamasa seguida del antirepresor *cro* nos permite estudiar la activación de la fase lítica, de manera que cualquier alteración en el represor *ci* se verá reflejada en los ensayos al ser esta proteína la reguladora del ciclo (Capítulo 1. Introducción)

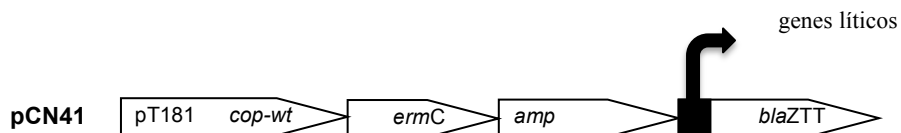
En cuanto a las fusiones transcripcionales se testaron inicialmente la construcción control tanto en la cepa silvestre como en los mutantes Clp (pJP 1686, Figura 7). Para el ensayo beta lactamasa se tomó muestra a los 90 minutos tras adicionar al medio MC. Como se observa en la Figura 4, en la cepa silvestre la expresión de genes líticos no está alterada, a diferencia de lo que ocurre en las cepas

mutantes, donde no hay expresión. Indicando pues una implicación de las proteínas Clp con el represor CI.

A continuación, decidimos estudiar a nivel proteico el represor CI. Para su completo estudio usamos como modelo la construcción anterior añadiendo un epítipo 3xflag, que nos permite su seguimiento a nivel proteico. Para ello probamos añadir el epítipo tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal del represor CI con el objetivo de comprobar si la presencia del epítipo altera la funcionalidad de la proteína (Figura 7, pJP 1626 y pJP 1688). Mediante el ensayo beta-lactamasa y usando como controles las construcciones anteriores libres del epítipo se observó que la presencia del epítipo en el extremo N-terminal no afectaba a la expresión de *cl* (Figura 8).

Continuamos pues con las construcciones que poseen el epítipo en el extremo N-terminal. Repetimos la misma estrategia del ensayo beta-lactamasa y estudiamos la cepa silvestre y mutantes Clp con dicha construcción. En vista a los resultados obtenidos, se observa como la activación del ciclo lítico sigue estando bloqueada en los mutantes *clpX* y *clpP* (Figura 8).

Como controles para los experimentos de fusión transcripcional y expresión proteica se emplearon dos diferentes tipos de represor CI. En uno de ellos se adicionó un codón de parada just detrás de la zona de corte promovida por RecA* (AG) (Figura 3, pJP1627), con el objetivo de estudiar el fragmento N-terminal y su posible relación con las proteínas Clp. Decidimos estudiar este fragmento en base a estudios anteriores que relacionan el fragmento N-terminal de LexA y las proteínas Clp (Cohn *et al.*, 2010). El siguiente control fue el represor *cl* no degradable, se mutó la zona de corte promovido por RecA* impidiéndose entonces la degradación de la proteína. Mediante esta construcción podremos estudiar como se comportan las proteínas Clp durante el bloqueo de la respuesta SOS (Figura 7, pJP1628).



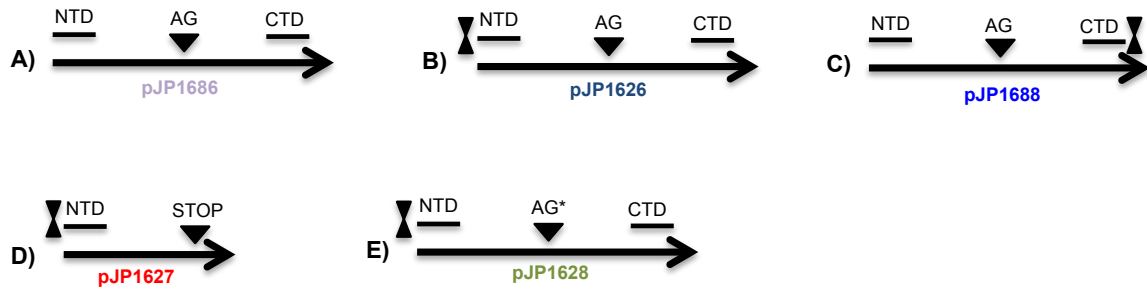


Figura 7. Fusiones transcripcionales para analizar la expresión del represor *cI* durante la inducción del fago en los mutantes *Clp*. A) El plásmido pJP1686 expresa el represor *cI*. B) El plásmido pJP1626 expresa el represor *cI* con presencia del epítipo 3xflag en el extremo N-terminal. C) El plásmido pJP1688 expresa el represor *cI* con presencia del epítipo 3xflag en el extremo C-terminal. D) El plásmido pJP1627 expresa *cI* con un codon de parada en el sitio de corte AG, en el cual se produce la escisión en presencia de RecA* E) El plásmido pJP1628 expresa el represor *cI* no degradable.

Como se puede observar en la Figura 8, la ausencia en las proteasas ClpP y ClpX afectan a la expresión de los genes implicados en el ciclo lítico, la cual permanece bloqueada. El fragmento N-terminal (pJP1627) sigue teniendo capacidad represora como se observa en la cepa silvestre, a diferencia de lo que ocurre en los mutantes ClpP, donde se observa de nuevo bloqueo en la expresión de genes líticos.

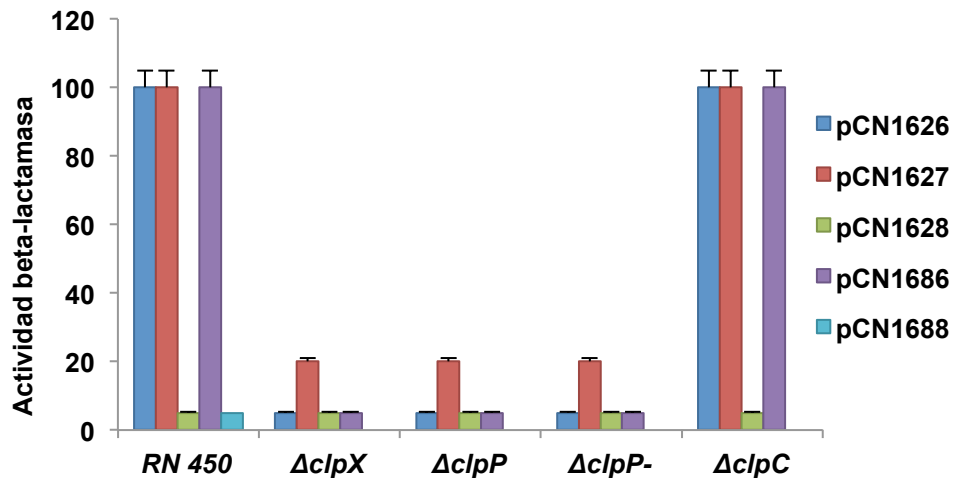


Figura 8. Análisis transcripcional del represor *cI* durante la inducción de la respuesta SOS. Se procedió al ensayo beta-lactamasa mediante la adicción al medio de MC induciendo así la respuesta SOS. A) En los mutantes en *clpX* y *clpP* se observa como la expresión de los genes líticos esta bloqueada usando el plasmido pCN1626. B) El fragmento N-terminal del

repressor CI (pCN1627) bloquea la activación de genes líticos en los mutantes en *clpP* y *clpX* durante la respuesta SOS. **C)** La presencia de el repressor no degradable bloquea la activación de la respuesta SOS, impidiendo la escisión del repressor CI. **D)** El epítipo 3xflag en el extremo N-terminal no afecta a la expresión de la proteína.

Durante el estudio de como las proteínas Clp inflúan en la degradación del repressor se quisieron testar las construcciones con el objetivo de corroborar una vez más la funcionalidad del repressor *cl*. Para ello se infectaron los diferentes mutantes portadores de las construcciones que expresan el repressor CI, con y sin epítipo. Los datos obtenidos en la Tabla 8 reflejan la incapacidad de formar lisógenos para el fago ϕ 11 usando la cepa silvestre portadora del plásmido pCN1686 y pCN1626, donde el repressor bloquea la infección, al contrario de lo que ocurre en las cepas mutantes de las proteínas Clp. Este resultado corrobora el hecho que las proteínas Clp intervienen en el metabolismo del repressor CI y que la expresión del repressor en ambas construcciones funciona correctamente al bloquear la infección por parte del fago ϕ 11.

Tabla 8 : Generación de lisógenos en mutantes Clp con la presencia del repressor *cl*.

Cepa aceptora		ϕ	Resultado lisógeno
RN450	pJP1686/26	ϕ 11	Negativo
$\Delta clpX$	pJP1686/26	ϕ 11	Positivo
$\Delta clpP$	pJP1686/26	ϕ 11	Positivo
$\Delta clpP^+$	pJP1686/26	ϕ 11	Positivo
$\Delta clpPX$	pJP1686/26	ϕ 11	Positivo

Una vez comprobado la funcionalidad del repressor en las construcciones nos centramos en el estudio del repressor a nivel proteico. Se ha visto anteriormente mediante las fusiones transcripcionales como las proteasas ClpX y ClpP están implicadas en la regulación del repressor, debido a que durante la ausencia de dichas proteasas el repressor *cl* permanece estable durante la activación de la respuesta SOS, bloqueando así la expresión de los genes líticos. Con el fin de seguir estudiando el

repressor CI y su implicación con dichas proteínas, a continuación se procedió a la cuantificación proteica del repressor CI en los diferentes mutantes mediante Western blot.

Para este estudio se emplearon los plásmidos que llevan integrado un epítipo 3xflag en la región N-terminal del repressor CI. Mediante Western blot se analizó la expresión del repressor durante la activación del ciclo lítico (adición al medio de MC) y se tomó muestra a los 90 minutos. En la Figura 9 se observa como bajo condiciones de daño celular el repressor CI permanece estable en ausencia de las proteasas ClpX y ClpP, por lo que ambas proteasas intervienen en la escisión del repressor CI en presencia de RecA*. Estos resultados corroboran los obtenidos con las fusiones transcripcionales (Figura 8).

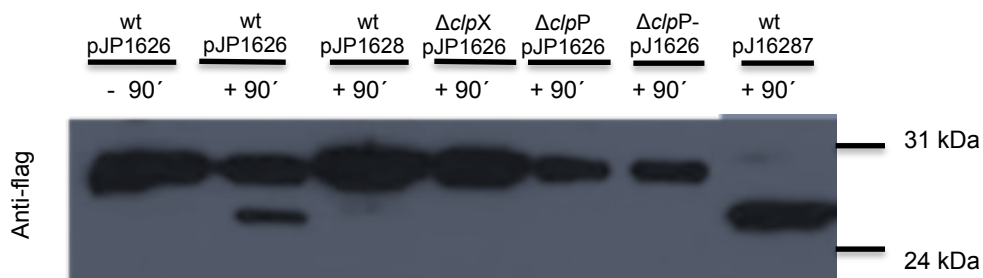


Figura 9. Análisis proteico del repressor CI durante la respuesta SOS. Se puede observar como el repressor CI permanece sin degradar durante la activación de ciclo lítico en las cepas mutantes Clp (carril 4, 5 y 6) al contrario que en la cepa silvestre, la cual presenta escisión del repressor CI durante la respuesta SOS (carril 2). Como controles se emplearon el repressor CI degradado (carril 7) y el repressor CI no degradable (carril 3).

Teniendo en cuenta los resultados en la Figura 9 vemos como el repressor no se escinde en ausencia de las proteasas ClpX y ClpP bajo situación de daño celular, a diferencia de lo ocurrido en la cepa silvestre. Este resultado difiere con los estudios acerca de LexA y las proteasas Clp, donde la ausencia de ambas proteasas no influyen en la escisión del repressor LexA durante la respuesta SOS (Cohn *et al.*, 2010).

Considerando el papel importante de la respuesta SOS en nuestros prografos modelos, a continuación se quiso analizar el efecto del repressor CI en cepas donde no se da la respuesta SOS al ser las cepas LexA no degradable. Con el objetivo de analizar el comportamiento del repressor en condiciones donde la escisión del mismo está bloqueada. Para ello se siguieron los mismos pasos que en el experimento

anterior (Figura 9) con la diferencia en este caso, que las cepas empleadas son LexA – (LexA no degradable).

Como se puede observar en la Figura 10, el represor en la cepa silvestre permanece estable en presencia de daño celular, al igual que lo observado en el represor CI para los mutantes Clp, al estar bloqueada la respuesta SOS.

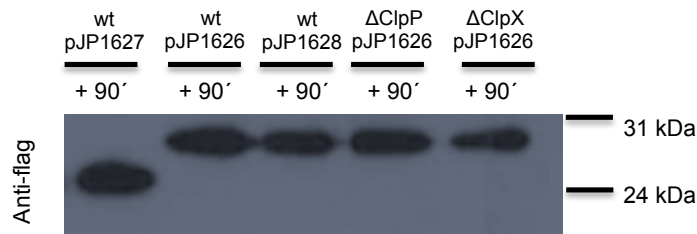


Figura 10. Análisis proteico del represor CI durante el bloqueo de la respuesta SOS. Bajo circunstancias de daño celular se observa como la presencia de LexA no degradable impide la activación de la respuesta SOS, y en consecuencia la degradación del represor permanece bloqueada en la cepa wt (carril 2). Lo mismo se aprecia en los mutantes Clp (carril 4 y 5). Como controles se emplean el represor CI degradado (carril 1) y el represor CI no degradable (carril 3).

Como se ha comentado anteriormente, estudios previos han demostrado la implicación de las proteasas Clp en la degradación del extremo N-terminal en LexA, así en ausencia de las proteasas ClpP y ClpX se ha visto que tras la inducción de la respuesta SOS el dominio N-terminal permanece estable después de la escisión de LexA (Cohn *et al*; 2010). Con el objetivo de estudiar si ocurría lo mismo en el represor CI, nos centramos en el estudio del fragmento N-terminal del represor. Para ello se empleó el plásmido pJP1627 (Figura 7) en el cual se ha clonado el represor CI con un codon de parada en el sitio de corte AG por el cual se promueve su escisión en presencia de RecA*. Se procedió al estudio de este represor en cepas mutantes de Clp y cepa silvestre a nivel proteico mediante Western blot. Los resultados obtenidos nos muestran que en los mutantes Clp el dominio N-terminal del represor permanece estable tras inducir la respuesta, bloqueando así la activación de genes líticos, por lo que ambas proteasas están involucradas en la degradación de dicho fragmento (Figura 11).

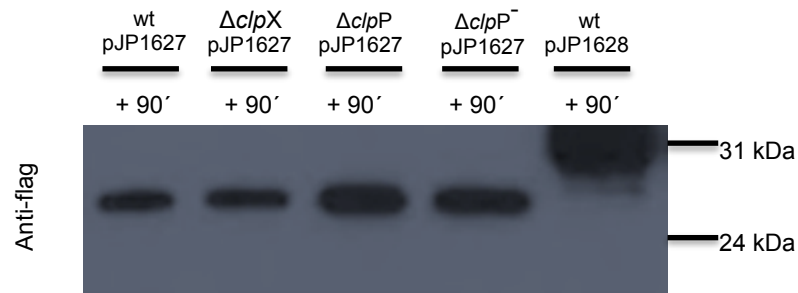


Figura 11. Análisis proteico del fragmento N-terminal del represor CI. Durante la activación del ciclo lítico del fago se muestra como el dominio N-terminal del represor permanece escindido tanto en las cepas silvestre (carril 1) como en los mutantes (carril 2, 3 y 4). Como control se emplea el represor no degradable (carril 5).

Este resultado corrobora el obtenido durante las fusiones transcripcionales (Figura 8), en el cual se observa como en la cepa silvestre empleando el plásmido pJP1627 la activación de los genes líticos está activa cuando hay daño celular, al contrario de lo que ocurre en los mutantes, donde se observa como el fragmento N-terminal sigue bloqueando dicha activación, indicando que las proteínas Clp están implicadas en su degradación, tal y como ocurre con LexA (Cohn *et al.*, 2010)

En vista a los resultados obtenidos hasta ahora para el represor CI se puede concluir como el complejo Clp PX es esencial para la activación de los genes implicados en el ciclo lítico del fago, no solo para la mediación mediante RecA* en la escisión del represor, si no también para la eliminación del dominio N-terminal de dicho represor. Ambas proteínas intervienen en dos vías por tanto: escisión del represor ci y posteriormente en la degradación del fragmento N-terminal.

**III. El complejo Clp PX controla la respuesta SOS
en *Staphylococcus aureus*.**

La respuesta SOS es un mecanismo que pone en marcha la bacteria bajo condiciones de estrés, está controlada por el regulador transcripcional LexA y es frecuente en muchas especies bacterianas en respuesta a condiciones de daño en el ADN. La inducción de la respuesta SOS está mediada por la escisión del represor LexA, resultando en un dominio de dimerización C-terminal (CTD) y un dominio de unión N-terminal, el cual es todavía capaz de unirse a la región intergénica entre *lexA* y *sosA* bloqueando así la expresión de los genes implicados en la respuesta (Cheo *et al.*,1991). Estudios previos han demostrado la contribución de las proteasas Clp en la degradación del fragmento N-terminal, bloqueando la expresión de los genes implicados en la respuesta SOS (Cohn *et al.*,2010).

Considerando nuestros resultados previos sobre las proteínas Clp y el represor Cl (Resultados Capítulo 2) y teniendo en cuenta que ambos represores son homólogos, quisimos profundizar en el estudio de LexA. Se procedió a analizar los posibles mecanismos mediante los cuales dichas proteínas podrían influir en la respuesta SOS. Para ello inicialmente seguimos la misma estrategia que la llevada por el represor Cl y estudiamos a nivel transcripcional y proteico el represor de la respuesta SOS, LexA, en los mutantes para las proteínas Clp.

Estudio del represor LexA en los mutantes de las proteasas Clp

Siguiendo con la misma estrategia que la empleada para el represor Cl (Resultados Capítulo 2) se realizaron fusiones transcripcionales que nos permitieran cuantificar la expresión de los genes implicados en la respuesta SOS en los diferentes mutantes. Se empleó el plásmido pCN41 (Figura 8), se clonaron los genes *lexA* y *sosA* (represor y antirrepresor), en este caso el gen beta-lactamasa se sitúa detrás de los genes implicados en la respuesta SOS, *sosA*. Se transformaron las construcciones en *S. aureus* y se procedió a realizar el ensayo beta-lactamasa. Para ello se tomaron muestras a los 90' tras la adición de MC (mitomicina C) generando así la respuesta SOS.

Siguiendo con los mismos pasos que los realizados para el represor Cl, quisimos comprobar la funcionalidad de LexA. Para ello testamos primeramente los plásmidos (Figura12, pJP1687) en cepas silvestre y mutantes Clp. En la Figura 13 se observa mediante el ensayo beta-lactamasa como la activación de los genes implicados en respuesta SOS ocurría bajo condiciones de daño en la cepa silvestre, a diferencia de lo observado en las cepas mutantes *clpX* y *clpP*, donde permanecía bloqueada.

Diseñamos dos plásmidos más con el objetivo de estudiar LexA a nivel proteico y corroborar su funcionalidad por lo que añadimos un epítipo 3xflag en el extremo N-terminal y C-terminal (Figura 12). Al igual que lo ocurrido con el represor CI, la presencia del epítipo en el extremo N-terminal no afectaba a la expresión del mismo, por lo que continuamos con dicha construcción.

Para estos experimentos también usamos diferentes controles al igual que en los experimentos para el represor CI. En uno de ellos adicionamos un codón de parada en el represor justo después del sitio de corte promovido por RecA*, por lo que podremos estudiar la posible relación de las proteasas con el fragmento N-terminal y en el siguiente control se mutó la zona de corte para impedir la escisión, generándose un LexA no degradable, y por tanto nos permite estudiar LexA durante el bloqueo de la respuesta SOS (Figura 12).

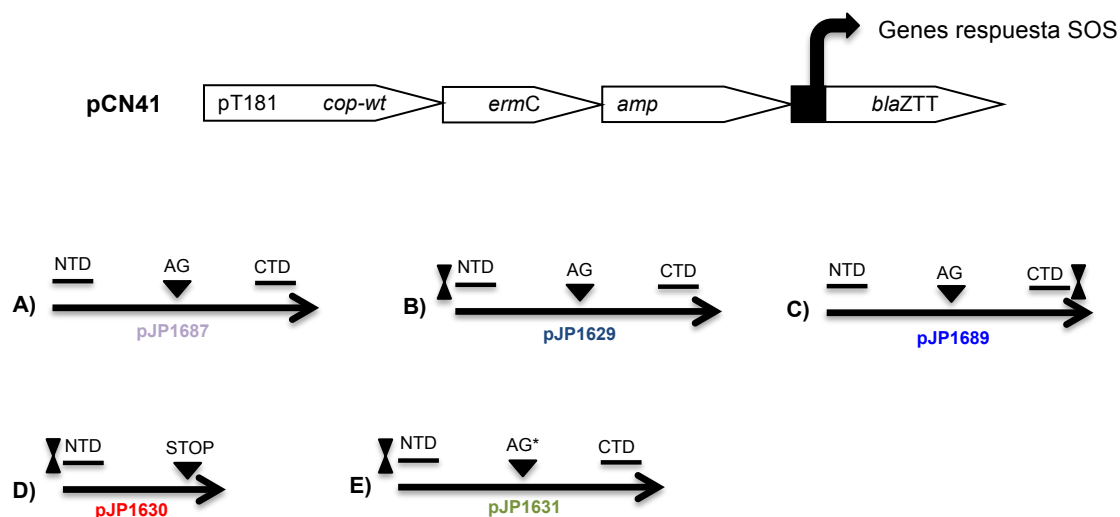


Figura 12. Fusiones transcripcionales para analizar la expresión de *lexA* durante la inducción de la respuesta SOS en los mutantes Clp. **A)** El plásmido pJP1687 expresa el represor LexA. **B)** El plásmido pJP1629 expresa el represor LexA con un epítipo 3xflag en el extremo N-terminal. **C)** El plásmido pJP1689 expresa el represor LexA con un epítipo 3xflag en el extremo C-terminal. **D)** El plásmido pJP1630 expresa LexA con un codon de parada en el sitio de corte AG, reconocido por RecA*. **E)** El plásmido pJP1631 expresa el represor LexA no degradable.

Como se observa en la Figura 13, en ausencia de las proteasas ClpP y ClpX la activación de genes implicados en respuesta SOS permanece bloqueada debido a la presencia de LexA, que permanece estable después de la activación de RecA*. En este caso, también se observa como el fragmento N-terminal en ausencia de las proteínas Clp sigue reprimiendo la expresión de genes bajo situaciones de daño celular.

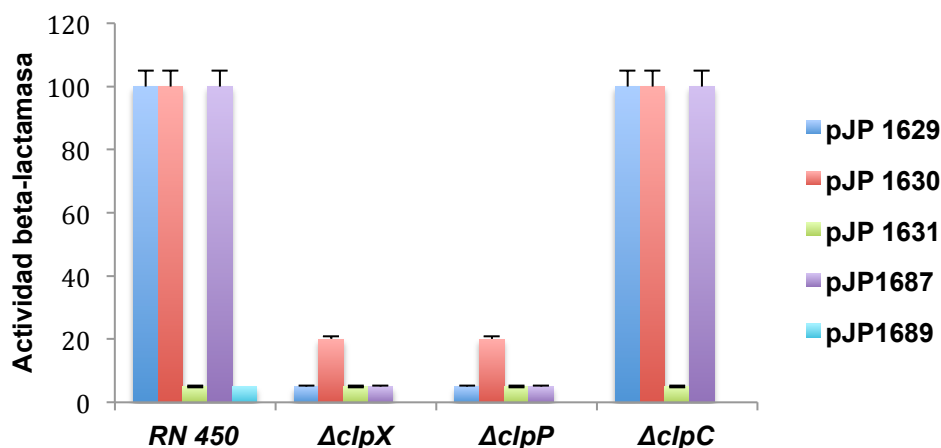


Figura 13. Actividad del promotor de *PlexA* y *PsosA* durante la inducción de la respuesta SOS en los diferentes mutantes Clp. Se procedió al ensayo beta-lactamasa mediante la adición al medio de MC induciendo así la respuesta SOS. **A)** En los mutantes en *clpX* y *clpP* se observa como la respuesta SOS está bloqueada. **B)** El fragmento N-terminal de LexA (pCN1630) bloquea la activación de genes involucrados en la respuesta SOS en ausencia de las proteasas ClpP y ClpX. **C)** La presencia de LexA no degradable bloquea la respuesta SOS. **D)** El epítipo 3xflag en el extremo N-terminal no altera al funcionamiento de la proteína.

En vista de los resultados obtenidos en la Figura 13, vemos como claramente la ausencia de proteasas impide la escisión de LexA, que sigue bloqueando los genes implicados en respuesta SOS. Estos resultados son similares a los obtenidos para el represor CI del fago (Figura 8). Se observa como la implicación de estas proteínas en la escisión de LexA difiere con los estudios anteriores (Cohn *et al.*, 2010) donde se muestra como las proteasas ClpX y ClpP no están involucradas en la escisión de LexA. Como segunda apreciación respecto a la Figura 13, se observa como el fragmento N-terminal de LexA es suficiente para la represión de los genes SOS en la cepa silvestre y en ausencia de las proteínas Clp LexA permanece estable, tal y como se ha demostrado en estudios anteriores (Cohn *et al.*, 2010).

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos con las fusiones transcripcionales se procedió a cuantificar la expresión proteica de LexA mediante Western blot, usando los plásmidos anteriores, los cuales llevan integrado un epítipo 3xflag en el extremo N-terminal. Las muestras fueron tomadas a los 90 minutos después de adicionar MC induciendo así la respuesta SOS tanto en la cepa silvestre como cepas mutantes (Figura 14).

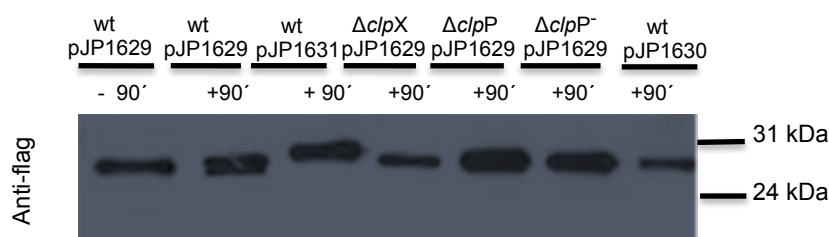


Figura 14. Análisis proteico del represor LexA durante la respuesta SOS. Se tomaron muestras a los 90 minutos tras adicionar MC. Se puede observar como LexA aparece parcialmente degradado durante la activación de la respuesta SOS (carril 2) como en condiciones normales (carril 1), en las cepas mutantes en proteasas Clp (carril 4, 5 y 6) presenta el mismo patrón que la cepa silvestre durante la respuesta SOS. Como controles se emplearon el represor degradado (carril 7) y el represor cl no degradable (carril 3).

Con los resultados obtenidos en la Figura 14 no obtuvimos un patrón claro con respecto a lo que ocurría a nivel proteico, al comportarse el represor de manera similar en todos los casos, a diferencia de lo analizado con las fusiones transcripcionales (Figura 9), donde se observa claramente como las proteínas ClpP y ClpX intervienen en la escisión de LexA y la respuesta SOS se encuentra bloqueada en condiciones de daño celular, al igual que están implicadas en la degradación del fragmento N-terminal, el cual sigue permaneciendo estable durante la respuesta.

Las proteasas ClpX y ClpP intervienen en la respuesta SOS

Durante el estudio de las proteasas y el represor LexA obtuvimos un resultado interesante con respecto al mutante *clpP*. En cuanto a los ensayos beta lactamasa empezamos a obtener activación de la respuesta SOS en ausencia de la proteasa ClpP, resultado que difería de los anteriores, donde obtuvimos bloqueo de la expresión de los genes de respuesta SOS. Para ello se realizó una segunda versión del mutante con el objetivo de averiguar si se mantenía el mismo comportamiento. Realizamos los ensayos beta-lactamasa empleando ambos mutantes y como controles la celda silvestre y el mutante *clpX*.

En la Figura 15 se puede observar como en comparación con el mutante *clpP I*, el mutante *clpP II* la activación de los genes no estaba bloqueada en presencia de daño celular. Este mismo mutante quisimos analizarlo con la construcción que expresaba el represor cl del fago $\phi 11$ con el objetivo de estudiar si había alguna alteración en la expresión de los genes líticos, aunque en ambos mutantes se obtuvo el mismo fenotipo.

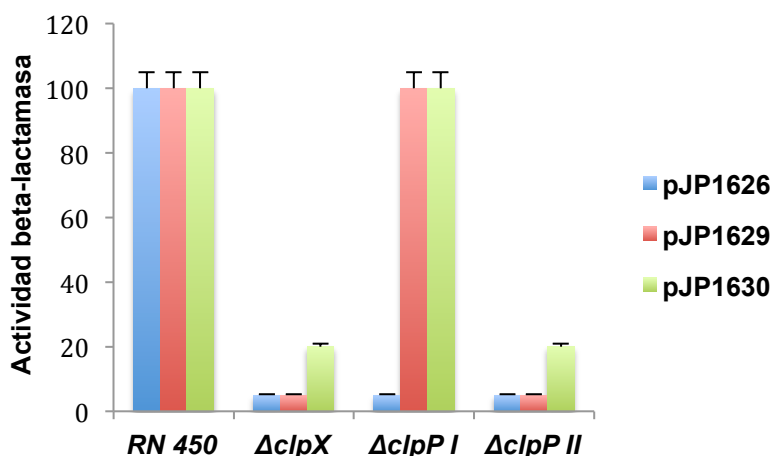


Figura 15. Actividad del promotor de *PlexA* y *Pcl* durante la inducción de la respuesta SOS en los diferentes mutantes *Clp*. Se procedió al ensayo beta-lactamasa mediante la adicción al medio de MC induciendo así la respuesta SOS. **A)** La expresión de los genes de respuesta SOS se encuentran activos en el mutante *clpP I*, a diferencia de lo que ocurre en el mutante *clpP II* (pJP1629) en condiciones de daño celular. **B)** El fragmento N-terminal de LexA (pCN1630) no bloquea la activación de genes involucrados en la respuesta SOS en el mutante *clpP I*. **C)** La expresión de los genes líticos (pJP1629) sigue estando bloqueada en el mutante *clpP I* y II.

En vista a los resultados obtenidos en la Figura 15 vemos como hay un doble comportamiento del mutante *clpP* con respecto a la respuesta SOS, en el primero se observa como la respuesta SOS siempre esta activa, posiblemente debido a una continua escisión de LexA, en cambio en el mutante II la respuesta permanece bloqueada, debido a una implicación de la proteasa en la escisión de LexA. Con este dilema planteado decidimos hacer un tercer mutante con el que se obtuvo el mismo fenotipo que el segundo mutante. Los datos obtenidos respecto a este mutante *clpP* nos hace plantearnos un posible doble papel de esta proteasa *ClpP* durante la respuesta SOS.

En relación a lo obtenido anteriormente nos centramos en estudiar los posibles mecanismos por los cuales las proteínas Clp podrían intervenir en más vías durante la respuesta SOS. Nos centramos para ello en la principal proteína reguladora de la respuesta, RecA y su relación con las proteasas Clp (Capítulo Introducción). Con el fin de estudiar una posible implicación en el metabolismo de RecA* complementamos las cepas mutantes con plásmidos que expresan RecA (Schröder *et al.*, 2013) con el objetivo de analizar si la respuesta SOS se restauraba en los mutantes donde se afectaba. Inducimos dichas cepas lisógenas del fago $\phi 11$ (Tabla 9). Se testaron los títulos del fago en las cepas mutantes y complementadas durante la inducción de los mismos, como control se emplea una cepa mutante en *recA* (Schröder *et al.*, 2013).

Tabla 9: Estudio en la inducción de lisógenos durante la respuesta SOS en cepas mutantes Clp complementadas con RecA*.

Cepa Donadora	Titulación $\phi 11$	Cepa Donadora	Titulación $\phi 11$
RN 451	4.5×10^9	RN 451	4.5×10^9
$\Delta recA$ JP 11083	1.3×10^3	$\Delta recA$ JP 11082	2.8×10^7
$\Delta clpX$ JP 8107	<10	$\Delta clpX$ JP 11123	<10
$\Delta clpP$ JP 8106	6.7×10^4	$\Delta clpP$ JP 11507	5.2×10^4

^a La tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^b N° de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN450 como cepa aceptora.

En los resultados obtenidos en la Tabla 9 se puede observar como las mutaciones en las proteínas Clp siguen afectando a la inducción del fago, incluso complementando con RecA*, por lo que dichas proteínas podrían estar implicadas en la activación de RecA mediante otras vías moleculares. En la cepa mutante en *recA*, se restaura el título de fago cuando se complementa la cepa con el plásmido que expresa RecA*.

La proteasa ClpP no interacta con LexA

Con el objetivo de profundizar en el estudio de ClpP y encontrar una respuesta al doble papel de la proteasa ClpP durante la respuesta SOS, empezamos a plantearnos posibles hipótesis que pudieran resolver el enigma. Una de ellas es la posible interacción proteica de la proteasa ClpP con LexA, esta unión podría explicar el fenotipo obtenido durante la ausencia de la proteasa durante la respuesta SOS. Para ello decidimos usar el plásmido pPROEX, el cual lleva integrado un epítipo de histidinas, necesarias para la purificación de proteínas mediante columna de resinas. Clonamos ambas proteínas juntas pero en este caso el represor LexA lleva el epítipo de histidinas. Empleamos la bacteria *E. coli* BL21 donde sobreexpresamos las proteínas y las pasamos por columnas de resinas. Se realizó una electroforesis de los productos obtenidos para poder analizar si hay una interacción entre ambas. Lo esperado en este caso si existe interacción entre ambas proteínas, es obtener como producto LexA y ClpP tras la purificación. En la Figura 16 se observa como la única proteína obtenida tras la purificación es la que lleva integrada el epítipo de histidinas, LexA. La proteasa ClpP no aparece cuando realizamos la electroforesis por lo que se asume que no hay una interacción proteica entre ambas.

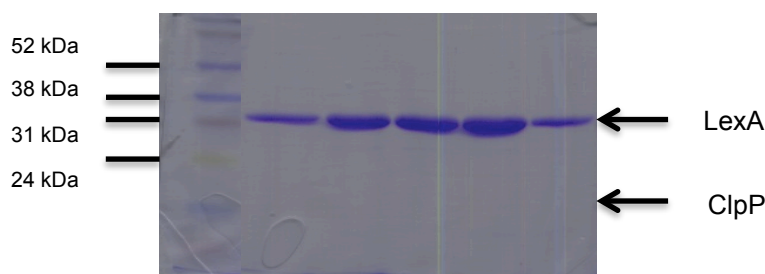


Figura 16. Purificación de las proteínas LexA y ClpP. Tras la purificación de ambas proteínas y pasarlas por las columnas de resinas se llevó a la electroforesis de los productos obtenidos. En este caso se aprecia cómo no hay interacción entre ambas proteínas al obtener únicamente la proteína que lleva integrada el epítipo de histidinas

Como resumen en este capítulo de resultados, podemos afirmar que las proteasas ClpX y ClpP influyen en el metabolismo del represor LexA, tanto en la escisión del mismo durante condiciones de estrés como en la eliminación del fragmento N-terminal que se genera tras la escisión de LexA (Cohn *et al.*, 2010). Con la particularidad que la proteasa ClpP parece poseer un doble papel en la respuesta SOS.

Sin embargo no hemos podido mostrar el mecanismo o reacción que involucran directamente las proteasas con el represor LexA o si estas proteasas están involucradas en más procesos durante la respuesta SOS, como por ejemplo con RecA.

Capítulo IV



Discusión

Las bacterias patógenas conllevan una serie de factores que contribuyen a la virulencia tanto directamente en interacciones con el huésped o indirectamente, como por ejemplo, promoviendo la replicación en el huésped. Similar al entorno externo, el huésped ofrece un ambiente adverso con ataques microbianos como radicales libres en los macrófagos, limitación de hierro o alteración en la temperatura. Generalmente las proteasas intervienen en estos procesos mediante dos vías : Primero, son parte de la maquinaria de control proteico requerida para restablecer los niveles proteicos debido a la presencia de proteínas no plegadas que se generan en ambientes adversos. Segundo, evidencias en el crecimiento apoyan la idea de un papel conservado en la proteólisis específica y controlada de proteínas reguladoras en respuesta al estímulo del ambiente. Particularmente en bacterias Gram positivas, donde los complejos Clp son centrales en el control de la producción de factores de virulencia, mientras en bacterias Gram negativas las proteasas en general contribuyen en la patogenia afectando procesos biológicos a través del desarrollo bacteriano (Frees *et al.*, 2014)

Las proteínas Clp están implicadas en procesos de virulencia

La patogenicidad de *Staphylococcus aureus* depende de un amplio sector de proteínas y factores de virulencia que son secretados, preparando a la bacteria para la destrucción de tejidos, unión a otras bacterias o evasión del sistema inmune. Uno de los mas significativos fenotipos en la delección de *clpP* en cepas de *S. aureus* derivadas es el efecto dramático en la transcripción de una gran parte de genes de virulencia (Frees *et al.*, 2003, 2005a,b; Michel *et al.*,2006; Feng *et al.*,2013; Farrand *et al.*,2013). Como ejemplo de ello, la transcripción de genes que codifican proteasas extracelulares como SspA, Aur o Spl se afecta , mientras que la transcripción del gen *hla*, el cual codifica para la proteína alpha hemolisina, se reduce durante la fase de crecimiento post exponencial. En consecuencia la cepa mutante en *clpP* era hemolíticamente negativa y no proteolíticamente negativa (Frees *et al.*, 2003; Feng *et al.*,2013). Las cepas derivadas de NCT8325 se caracterizan por una elevada expresión de hemolisinas y proteasas extracelulares en comparación con otras cepas de *S. aureus* , una característica que ha sido descrita por la baja actividad de un alternativo factor sigma, SigB, en esas cepas (Giachino *et al.*,2001; Horsburgh *et al.*,2002; Oscarsson *et al.*,2006).El descubrimiento de la inactivación de ClpP conllevaba perturbaciones en el funcionamiento celular respecto a los reguladores de virulencia indicaba que ClpXP controla la estabilidad de uno o más reguladores transcripcional en virulencia y por lo tanto impacta en la red de regulación. Sin

embargo, ninguno de los conocidos factores de virulencia fueron identificados como ClpP substratos (Michalik *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013).

En nuestros estudios se muestra como las proteasas ClpX y ClpP están implicados en virulencia, de los profagos de *Staphylococcus aureus*. En ausencia de ambas proteasas la virulencia de los profagos. Como se puede observar, las proteínas Clp intervienen en múltiples vías patogénicas que favorecen a la bacteria a seguir con su capacidad infectiva, la mutagénesis de estas proteasas podría suponer por tanto un importante paso en la erradicación de la virulencia de dichas bacterias.

La degradación del represor cl en *Staphylococcus aureus* esta controlada por las proteínas Clp

Estudios previos han demostrado como las proteínas Clp están involucradas en el metabolismo de otros represores de fagos. Un ejemplo de ello lo encontramos en el fago lambda, infectivo para *Escherichia coli*. La escisión dependiente de RecA del represor cl del fago lambda, el cual conlleva la inducción del mismo, fue uno de los primeros ejemplos reconocidos como evento específico proteolítico involucrado en la regulación de la expresión genética (Roberts *et al.*, 1975). Desde entonces, una variedad de proteasas dependientes de ATP en *E. coli* han sido mostradas por degradar proteínas reguladoras tanto del fago como de la bacteria. Ejemplos de ello se encuentran en la proteína SulA, el fago lambda N y el plásmido F que codifica para proteínas CcdA son substratos de la proteasa Lon (Mizusawa *et al.*, 1983, Van Melderen *et al.*, 1994). No solo la proteasa Lon ha sido estudiada en este género, en *E. coli* la proteasa dependiente de ATP ClpP fue identificada por intervenir en la degradación de substratos (Gottesman *et al.*, 1992) existiendo un equivalente procariótico en el proteosoma eucariótico (Peters *et al.*, 2012).

Otro ejemplo de represor que ha sido objeto de estudio es el del bacteriófago Mu, denominado Rep, es conocido por estabilizar y mantener la lisogenia mediante su unión a los segmentos de ADN (O1, O2 y O3) actuando como operador y potenciador de la transposición, llevando a cabo las funciones necesarias para la replicación de Mu. Bajo ciertas condiciones fisiológicas en la bacteria, como la entrada en fase estacionaria, se puede promover la degradación o inactivación del represor llevando a la desrepresión de las funciones de transposición. El dominio C-terminal (CTD) de Rep no solo contiene los motivos de reconocimiento para el inicio de la proteólisis si no que también modula la asociación del dominio N-terminal de unión al ADN (DBD) con el ADN (Lamrani *et al.*, 1999). Aunque el represor Rep es sustrato de la proteasa ClpXP

(Welty et al., 1997), aparece predominantemente como proteína resistente al complejo cuando se purifica.

Estudios previos demostraron que los últimos cinco residuos (VKKAV) del dominio CTD (CTD5) de Rep pueden funcionar como motivo de reconocimiento de ClpX, siendo capaz de promover la degradación del substrato heterólogo cuando es unido al extremo C-terminal. Sin embargo, aparentemente la degradación de la proteína depende de cómo es presentado este motivo. Rep puede rápidamente ser degradado por desnaturalización debido a altas temperaturas (Mukhopadhyay et al., 2003) o mediante la presencia de represores negativos Vir, los cuales tienen un C-terminal alterado y son altamente susceptibles de degradación por el complejo ClpXP (Geuskens et al., 1992). Experimentos mediante el espectro de emisión con una sonda fluorescente unida al extremo C-terminal de Rep indicaron que CTD5 se encuentra en ambiente hidrófobo (Marshall-Batty, K. R et al., 2003). Sin embargo, la presencia de Vir induce que la secuencia CTD5 en el represor Rep induce la entrada a un ambiente más polar, favoreciendo el acceso de ClpX para el reconocimiento de la señal.

Mientras que el represor silvestre Rep es estable *in vivo*, el represor codificado por mutantes virulentos de Mu es rápidamente degradado. Las mutaciones *vir* consisten en mutaciones fragmentadas que alteran el extremo carboxilo del represor (Geuskens et al., 1991), creando un nuevo segmento de seis hasta siete aminoácidos que promueven la rápida degradación *in vivo* (Laachouch et al., 1996). El mutante para el represor (Vir) es suficientemente estable en cepas mutantes *clpX* y *clpP* para mantener la lisogenia en el fago Mu (Geuskens et al., 1992; Mhammedi-Alaoul et al., 1994) indicando que es diana del complejo ClpXP. Mientras que el represor es estable en cepas *ClpX⁺* y *ClpP⁺*, la coexpresión de Vir promueve la rápida degradación de Rep (Geuskens et al., 1992). Así, el fago *vir* superinfectivo puede llevar a cabo el desarrollo lítico en una célula lisogénica, induciendo el profago residente a la multiplicación. El represor Rep es un substrato específico para el complejo ClpXP, concretamente ClpX reconoce con alta afinidad el represor.

En el caso del fago Mu, ClpX juega un papel importante no solo en el reconocimiento y translocación del represor Rep en el complejo proteolítico si no que también interviene como factor bacteriano involucrado en resolver la transición recombinación-replicación en el ciclo de Mu. Estudios bioquímicos en aislados de extractos celulares revelaron la implicación de ClpX en la desestabilización del complejo STC (Levchenko et al., 1995). ClpX está implicada en las funciones necesarias para liberar el bloqueo entre transposición y replicación de ADN, así ClpX emplea su actividad para desplegar proteínas cuando interacciona con las

subunidades de la transposasa, solo una subunidad o un conjunto de subunidades contacta con ClpX, los cuales son liberados del complejo generándose un complejo frágil accesible ahora para la unión al ADN, facilitando la replicación.

Estudios en el represor *ci* de los profagos para *Staphylococcus aureus* revelaron un comportamiento común con respecto a los estudios en *E. coli* en el hecho de que el complejo ClpXP interviene tanto en la degradación del represor. En el caso del represor Rep no se sabe actualmente cual es la señal por la que el complejo degrada el represor, se ha estudiado como ClpX reconoce una secuencia señal en el extremo C-terminal que promueve su degradación. En el caso del represor *ci* para *S. aureus* no se ha podido demostrar aún la señal o mecanismo por el cual las proteínas Clp influyen en la escisión del represor, pero si hemos podido mostrar, como en el caso de LexA, tras el corte del represor se genera una secuencia en la parte C-terminal del fragmento N-terminal que es reconocida por ClpX, promoviendo la translocación del fragmento en el complejo proteolítico. En el primer caso las proteasas interviene en la degradación completa del represor Rep, en el segundo vemos como las proteínas Clp intervienen en dos procesos respecto al represor, interviniendo en la escisión de *ci* y degradando el fragmento N-terminal generado.

Otro punto común del fago Mu y profagos de *S. aureus* con respecto a las proteínas Clp, a parte de los represores, es la implicación de ClpX sola en otras vías metabólicas. En el primer caso ClpX esta implicado en la desestabilización de la transposasa facilitando la replicación del ADN del fago. En *S. aureus* se ha demostrado en esta tesis como ClpX interviene en otra vía molecular, la escisión durante la replicación del fago.

No solo las proteínas Clp intervienen en la degradación del represor *ci*. Estudios previos han mostrado similitudes entre el sistema IrvR/IrvA de *S. mutans* y el sistema *ci*/CRO de *S. aureus* (Niu et al., 2008). Estas proteínas comparten secuencias homologas y una similar estructura en el cromosoma. En adición, IrvR y IrvA responden en situaciones de estrés. IrvR controla el estado de expresión de *irvA* de manera análoga a la expresión de proteínas LexA-like, que confieren la habilidad de llevar a cabo su propia escisión. Una vez ocurrido el corte, el fragmento N-terminal IrvR sigue teniendo capacidad de unión al ADN al permanecer estable y será producto de la degradación proteolítica mediante el complejo ClpXP, resultando en la desrepresión de *irvA*. El sitio de corte en IrvR está entre Ala191 y Gly192 conteniendo el mismo epítipo (VSA) que la mayoría de la secuencias de reconocimiento de las proteínas LexA-like necesarias para la escisión del represor y por tanto desrepresión de genes.

A diferencia con otras proteasas como FtsH que puede reconocer secuencias similares a las reconocidas por ClpXP en el extremo C-terminal (Herman et al., 1998), FtsH es incapaz de degradar estas proteínas con altos niveles de termoestabilidad intrínseca (Gottesman et al., 1998). Al igual que el caso de los anteriores represores, se ha visto como sustituciones en algunos de los aminoácidos que forman la secuencia de reconocimiento genera efectos negativos en la eficiencia de reconocimiento (Gao et al., 2009).

Mientras aumenta la evidencia que el mecanismo de proteólisis y escisión llevado a cabo por LexA es un mecanismo compartido por numerosos sistemas de regulación, vemos ejemplos en otros géneros bacterianos como *Pseudomonas aeruginosa* el sistema PrtR/PrtB, los cuales son reguladores transcripcionales que comparten similitudes genéticas con *cl* y *cro*. En adición comentar que las funciones de PrtR controlan la desrepresión de PrtB en respuesta al estrés (Wu et al., 2005).

La intervención de las proteínas Clp en la regulación de represores para profagos, tanto en bacterias Gram positivas como negativas, supone un importante mecanismo a tener en cuenta para la propagación de dichos fagos. La ausencia de dichas proteínas impiden la replicación de fagos, favoreciendo la no propagación de bacterias patógenas, conllevando por tanto menos riesgos de infecciones. Por lo que suponen una importante diana a tener en cuenta.

Las proteasas intervienen en la respuesta SOS mediante LexA

Una categoría de proteínas identificadas como diana de las proteínas Clp durante la proteólisis son las proteínas involucradas en daño celular (Feng et al., 2013). La respuesta ante daños en ADN ha sido caracterizada extensivamente en *Escherichia coli*. Daños en el ADN promueve la activación de la respuesta SOS controlada por el represor LexA (Butala et al., 2009).

El regulón SOS consta de proteínas reparadoras de ADN que actúan en presencia de daño celular, *lexA* y *sosA* aunque generalmente en ausencia de estrés se encuentra reprimido por el represor LexA (Kelley, 2006). Sin embargo, una vez provocado el daño, el represor LexA conlleva su propio corte generándose dos fragmentos, C-terminal y N-terminal, el cuál posee cierta actividad de unión al ADN (Neher et al., 2003). Recientemente se ha mostrado que en *Staphylococcus aureus*, el complejo ClpXP, contribuyen a la degradación de los fragmentos generados tras el corte de LexA, mostrándose que en ausencia tanto de ClpP como ClpX los dominios de LexA permanecen estabilizados (Cohn et al., 2011). Interesantemente, cuando se genera un alelo mutante en LexA, el dominio N-terminal se produce ectópicamente,

permaneciendo la expresión de *sosA* reprimida mientras LexA se expresa bajo condiciones de respuesta SOS (Cohn et al., 2011). Este resultado sugiere que el regulón consta de dos sets de genes, de los cuales concretamente algunos no se afectan por el dominio N-terminal de LexA y otros son reprimidos por su presencia. Es muy importante en este proceso la actividad del complejo proteolítico, cuya actividad es requerida para la inducción de los genes más tardíos.

El punto clave para una regulación correcta durante la inducción de la respuesta SOS es que las proteasas ClpXP no reconocen el represor LexA hasta que RecA* induce el corte entre el enlace Ala⁸⁴-Gly⁸⁵. ClpXP específicamente reconoce los fragmentos de LexA mediante la vía de reconocimiento generada o mediante la exposición de las secuencias en los motivos proteicos. La nueva secuencia que se genera en la parte C-terminal del fragmento N-terminal (VAA-coo-), es muy similar a la secuencia diana LAA-coo- en la proteína SsrA reconocida por el complejo ClpXP para su degradación (Neher et al., 2003). La secuencia diana en SsrA es una de las secuencias mejor caracterizadas, consta de once aminoácidos (AANDENYALAA-coo-), los residuos LAA en el final de la secuencia diana de SsrA son los residuos determinantes para el reconocimiento del complejo ClpXP (Flynn et al., 2001). Además, la carboxilación del extremos C-terminal contribuye a la interacción con ClpX, explicando por qué esta secuencia es específicamente reconocida (Kim et al., 2000). El remplazamiento de ambas alaninas con residuos de ácido aspártico en el fragmento de LexA de unión al ADN inhibe la degradación por ClpXP, y las células que expresaron esta variante fueron más sensibles a la radiación UV (Neher et al., 2003).

El fragmento C-terminal también es inestable en células silvestres y estabilizado en células defectivas de Lon (Little et al., 1980), y en células defectivas de *clpX*. Se ha propuesto como mecanismo que después de la ruptura del represor LexA se produce una alteración en el dominio C-terminal, estando expuesto como péptido señal, el cual es reconocido por ClpX (Neher et al., 2003). Las secuencias determinantes que son reconocidas por Lon aún no han sido investigadas.

Los estudios acerca de la terminación del fragmento N-terminal en *S. aureus* revelaron un motivo Val91-Thr92-Ala93-COOH, similar al motivo que reconoce el complejo ClpXP en *E. coli* (Flynn et al., 2001). La eliminación de cuatro residuos (90-93aa) en el dominio N-terminal conlleva la estabilización de dicho fragmento, lo cual indica que este motivo también en *Staphylococcus aureus* dirige la degradación. Cuando se compara la estabilidad de los dominios N-terminal y C-terminal en LexA, se observa como a diferencia de lo que ocurre en *Escherichia coli*, en *S. aureus* el

fragmento C-terminal es más estable que el dominio N-terminal y es completamente estabilizado en ausencia de las proteínas Clp.

La elevada estabilidad del fragmento C-terminal en *S. aureus* en células silvestres puede ser debida a la ausencia de la proteasa Lon, que es responsable del reemplazo en *E. coli* (Neher et al., 2003). Estudios previos demuestran que la degradación del fragmento por el complejo proteolítico juega un importante papel ayudando a la supervivencia de las células después del daño. Algún error en la degradación de éste fragmento podría resultar en la incompleta desrepresión de los genes de respuesta SOS que son necesarios para el óptimo reparo en el ADN.

En vista a nuestros resultados podemos confirmar como las proteasas ClpX como ClpP por separado, como formando el complejo ClpXP influye en la degradación del fragmento N-terminal. Los experimentos mediante el ensayo beta-lactamasa demuestran como permanece bloqueada la expresión de los genes involucrados en reparación de ADN en ausencia de dichas proteínas al clonar en nuestros mutantes una construcción que expresa el dominio N-terminal del represor LexA.

En nuestros resultados previamente mostrados no solo reafirmamos el papel importante del complejo ClpXP en la degradación de dicho fragmento, si no que proponemos ambas proteasas como papel crucial en la escisión de LexA en presencia de RecA*. En vista de los resultados obtenidos con respecto al represor, se puede observar como la ausencia de las proteasas ClpX y ClpP afectan a la inducción del corte por parte de LexA, que permanece estable tras la activación de RecA* y por tanto su capacidad de unión al ADN, bloqueando así la expresión de los genes involucrados en la respuesta SOS. Así pues el complejo ClpXP interviene en dos vías respecto a LexA durante la respuesta SOS, la primera durante la escisión del mismo durante la respuesta SOS y la segunda, en la degradación del fragmento N-terminal, necesario para la desrepresión de los genes involucrados en reparación de ADN.

A día de hoy no sabemos el mecanismo exacto por el cual estas proteasas intervienen en la escisión de LexA. Con respecto a la degradación del fragmento N-terminal se ha demostrado que la exposición de la secuencia VTA-coo en el fragmento N-terminal ayuda al reconocimiento por parte de ClpX para su unión y posterior degradación por la proteasa ClpP. En cuanto a la intervención de las proteasas en la escisión de LexA no se ha podido demostrar aún cual es la señal, secuencia o vía por la cual LexA necesita de estas proteasas para su propia escisión. Se planteó previamente una posible vía de interacción, vía RecA, por la cual estas proteasas podrían influir en este proceso. Se estudiaron las cepas mutantes de proteasas en

presencia de RecA para analizar si su complementación influía en el comportamiento de los mismos, aunque los resultados no mostraron ninguna alteración, indicando pues una posible relación de las proteasas con RecA.

Como futuros estudios deberíamos centrarnos en la ruta mediante la cual las proteasas intervienen en la escisión de LexA. El bloqueo de la respuesta SOS mediante las proteínas Clp supone una diana importante para evitar la propagación de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, al eliminar la capacidad de supervivencia de la bacteria mediante la puesta en marcha de la respuesta SOS.

Capítulo V



Material y métodos

BACTERIAS, PLÁSMIDOS Y MEDIOS UTILIZADOS EN ESTOS ESTUDIOS.

Las cepas y los plásmidos utilizados se recogen en las Tablas 10, 11 y 12. Las cepas de *S. aureus* se cultivaron rutinariamente a 32 °C, 37 °C o 43 °C en medio TSA agar o en TSB (Scharlau) y se guardaron como glicerizados a -75 °C. Cuando fue conveniente, se incorporaron los antibióticos eritromicina (20 µgr ml⁻¹ o 2,5 µgr ml⁻¹), tetraciclina (3 µgr ml⁻¹) o el producto Xgal (20 mg ml⁻¹) (Roche). Se utilizó caldo Luria-Bertani (LB) o placas de agar Luria-Bertani (Pronadisa) para cultivar cepas de *E. coli*. Para mantener las construcciones en *E. coli* se utilizó el antibiótico ampicilina (100 µgr ml⁻¹).

MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Manipulación del DNA:

-Purificación del DNA genómico.

Las manipulaciones rutinarias del DNA se realizaron utilizando procedimientos estándar (Ausubel *et al.*, 1990; Sambrook *et al.*, 1989).

El DNA cromosómico de los diferentes *Staphylococcus* fue extraído utilizando el kit “Genelute bacterial genomic DNA” (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante, a excepción de la lisis bacteriana, que fue llevada a cabo previamente con lisostafina (Sigma; 12,5 µgr ml⁻¹) a 37 °C durante 1 hora.

-Purificación del DNA plasmídico.

El DNA plasmídico fue extraído de *S. aureus* utilizando el kit “Genelute plasmid miniprep” (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante, excepto que las bacterias eran lisadas previamente con lisostafina (Sigma; 12,5 µgr ml⁻¹) a 37 °C durante 1 hora.

-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador modelo standard. Para la amplificación de fragmentos se utilizó el sistema DyNAzyme EXTTM (Finnzymes), consistente en una mezcla de una polimerasa más una enzima con actividad correctora. Este sistema tiene la ventaja de añadir adeninas extras en los extremos del producto de PCR, lo cual permitió clonar el producto de amplificación utilizando el sistema TOPO-PCR (Invitrogen). La optimización de las condiciones de amplificación se realizó siguiendo las directrices del fabricante.

-Clonación de fragmentos obtenidos por PCR.

En la mayoría de los casos, los fragmentos de PCR se clonaron utilizando los sitios de restricción incorporados en el extremos 5' de los cebadores durante su diseño. Cuando no fue posible, se clonaron los fragmentos aprovechando la existencia de adeninas extras añadidas por la DNA polimerasa en los extremos de la secuencia recién sintetizada. Para ello, se utilizó el sistema TOPO-PCR (Invitrogen), basado en la capacidad que posee la enzima DNA topoisomerasa I de religar fragmentos compatibles. Todas las enzimas necesarias para la manipulación del DNA fueron suministradas por MBI Fermentas, Roche o Amersham. Los cebadores se obtuvieron de Invitrogen (Tabla 5.3).

-Ligación.

Se utilizó la T4-DNA ligasa (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante (0,5 U de enzima en 25 μ l de volumen final). Las ligaciones se realizaron a 20 °C durante 1 h.

Transformación de *E. Coli* :**-Preparación de células competentes por el método del $CaCl_2$ Mn.**

A partir de una colonia de *E. coli* DH5 α aislada en una placa reciente, se inocularon 20 ml de medio Ty2x y se crecieron durante toda la noche a 30 °C. Al día siguiente, se usaron 4 ml de este cultivo para inocular 200 ml de Ty2x complementado con 0,2 % de glucosa a partir de un stock de glucosa al 20 % filtrada. Se crecieron en agitación a 30 °C hasta DO_{600} entre 0,45 - 0,5. Se enfriaron rápidamente en baño de agua-hielo y se centrifugaron 10 min a 3.500 rpm a 4 °C. El botón celular se resuspendió en 100 ml de solución salina fría y se mantuvo 45 min en hielo. Se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron las células en 10 ml de solución salina complementada con 2 ml de glicerol al 75 %, ambos medios previamente enfriados. Se repartieron en alícuotas de 200 μ l en tubos de microcentrífuga previamente enfriados, congelándolas inmediatamente en un baño de alcohol/hielo seco. Las alícuotas se guardaron a -70 °C hasta su uso.

Composición medios:

<u>Ty2x:</u>		<u>Solución salina:</u>	
Triptona	16 g	CaCl ₂	100 mM
Extracto de levadura	10 g	MnCl ₂	70 mM
NaCl	5 g	Acetato sódico	40 mM
	ajustar pH a 7,0		ajustar pH a 5,2
completar con H ₂ O hasta 1 litro			

- Transformación por choque térmico.

Se descongeló una alícuota de células competentes lentamente en hielo y se añadió el DNA (plásmido purificado o ligación) incubando durante 30 min en hielo. El choque consistió en pasar la muestra bruscamente a baño de 42 °C, incubar 90 seg y enfriar de nuevo rápidamente en el hielo. Se resuspendieron las células en 600 µl de medio SOC (Sambrook *et al.*, 1989), se incubaron 60 min a 37 °C en agitación y se sembraron en placas LB con el antibiótico apropiado.

Electroporación de *S. aureus*:

La transformación de especies Gram positivas con DNA foráneo presenta gran dificultad debido a las especiales características de su pared celular. Ello obliga a recurrir a la electroporación como método de transformación para *S. aureus*. Para la transformación nos basamos en el protocolo descrito por Schenk (Schenk and Laddaga, 1992) con algunas modificaciones.

- Preparación de *S. aureus* electrocompetentes.

Se realizó una dilución 1/50 a partir de un cultivo estacionario en 50 ml de medio LB y se incubó a 37 °C, a 250 rpm, hasta alcanzar una DO₅₄₀ de 0,2. Las bacterias se enfriaron 10 min en hielo y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente se lavaron 2 veces con 10 ml de sacarosa 0,5 M fría y finalmente se resuspendieron las células con 1 ml de sacarosa fría, dejándolas en hielo durante 20 min. Por último se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 0,5 ml de sacarosa 0,5 M fría.

-Condiciones de electroporación.

Se utilizaron cubetas de electroporación de 0,1 cm (Bio-Rad) en las que se mezclaron 50 μ l de bacterias competentes con 1 μ l de DNA concentrado, resuspendido en H₂O bidestilada para evitar el riesgo de arco eléctrico. Se utilizó un electroporador Bio-Rad (modelo Gene Pulser II) junto con la unidad Pulse Controller Plus, en el que se seleccionaron 2,5 Kv de voltaje, 25 μ F de capacitancia y la resistencia se fijó a 100 Ω .

Inmediatamente después del pulso se añadió 0,6 ml de TSB. Tras un tiempo de recuperación (1 h a 37 °C en agitación), el cultivo se sembró en placas de TSA conteniendo los antibióticos correspondientes

Southern blot :

Para la hibridación mediante Southern blot, se purificó DNA cromosómico, se digirió en su caso si fue necesario y se separó mediante gel de electroforesis de agarosa. Los geles se transfirieron a membranas de nylon (Hbond-N 0.45 mm de diámetro de poro; Amersham Life Science) utilizando métodos estándar (Ausubel *et al.*, 1990; Sambrook *et al.*, 1989). El marcado de la sonda y su hibridación con el DNA se realizó de acuerdo al protocolo aportado por el kit de marcado de DNA PCR-DIG y detección de quimioluminiscencia (Roche).

Secuenciación del DNA:

El DNA fue secuenciado por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP-UPV), mediante el método de la terminación de cadena por incorporación de dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos.

Análisis computacional:

Para las búsquedas de homología de las secuencias obtenidas se utilizó el programa BLAST del servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; (Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank.

Para las hibridaciones de secuencias homólogas se utilizaron los programas praliné del servidor <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/> y clustal <http://www.ebi.ac.uk>

Purificación de proteínas.

La clonación y purificación de las proteínas de fusión His₆-Ltr se realizó tal y como está descrito en el artículo de Chien y colaboradores (Chien *et al.*, 1999). La pureza de las proteínas purificadas se comprobó mediante electroforesis y tinción con Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma) de geles de poliacrilamida al 12% los cuales contenían SDS. La proteína se encontraba pura en un 98%. La concentración de la proteína purificada se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Calif.), utilizando como estándar albúmina de suero bovino.

METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE INDUCCIÓN DE FAGOS.

Inducción de profagos.

El ciclo lítico de los fagos que se encuentran en estado latente en la bacteria puede inducirse mediante la aplicación de sustancias que activen la respuesta SOS. Para obtener un lisado de una cepa lisogénica de *S. aureus*, se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció hasta alcanzar una $DO_{540} = 0.3-0.4$. Seguidamente se añadió mitomicina C (Sigma, $2 \mu\text{g ml}^{-1}$) sustancia que activa la respuesta SOS. Posteriormente los cultivos se crecieron en agitación lenta (80 rpm) a 32 °C. La lisis normalmente solía ocurrir sobre las 3 h. Antes de que ocurriera la lisis, en determinados experimentos, se tomaron muestras (1 ml) a distintos tiempos de los cultivos inducidos que contenían SaPIs y se extrajo su DNA (ver apartado de extracción de DNA).

Los lisados obtenidos se filtraron en filtros de 0,2 μm para eliminar aquellas bacterias que no hubieran sido lisadas. Posteriormente estos lisados se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Alternativamente también se obtuvieron lisados por infección de bacterias sensibles a fagos. Los fagos penetrarían en la bacteria, comenzarían su ciclo lítico, amplificándose considerablemente la población de fagos que acabarían lisando la bacteria. Para ello se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció el cultivo hasta alcanzar una $DO_{650} = 0.15$. Posteriormente el cultivo se centrifugó, se resuspendió en TSB-Phage buffer (1 mM NaCl, 0.05M Tris pH = 7.8, 1 mM MgSO₄, 4 mM CaCl₂) (1:1) y se infectó con el fago a una multiplicidad de fagos/bacterias 3:1 o 1:1. La lisis ocurría también sobre las 3 h después de la infección.

Titulación de fagos.

Para cuantificar el número de partículas fágicas que contiene un lisado se diluyó un cultivo estacionario de la cepa RN4220 (sensible a la mayoría de los fagos de *S. aureus*) 1/50 en TSB y se creció hasta alcanzar una $DO_{540} = 0.4$. Se infectaron 50 μl de este cultivo con 100 μl de diluciones seriadas, en "phage buffer", del lisado a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras los cuales, la mezcla de fagos y bacterias se plaqueó en placas de "phage base" (25 gr de Nutrient Broth N°2, Oxoid; 7gr de agar) suplementadas con CaCl_2 a una concentración final 10 mM. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se cuantificaron el número de calvas producidas por el fago y se multiplicó por el factor de dilución.

Transducción.

Para estudiar el proceso de transferencia de un elemento genético móvil (plásmido o SaPI) se utilizaron los lisados obtenidos mediante el método de inducción o infección que se han comentado anteriormente .

Se realizaron diluciones seriadas de estos lisados en phage buffer. 100 microlitros de estas diluciones se añadieron a 1 ml de bacteriasceptoras crecidas hasta $DO_{540} = 1.4$ a las que se añadió CaCl_2 a una concentración final 4.4 mM. La mezcla del lisado con las bacterias se incubó a 37 °C durante 20 minutos para dar tiempo suficiente a la isla a penetrar en la bacteria. Posteriormente se plaqueó la mezcla en placas de TSA con el antibiótico que corresponde. Estas placas contenían Citrato Sódico (17 mM) para impedir la infección de las bacteriasceptoras por los fagos del lisado. Generalmente se utilizó la cepa RN4220 como bacteria aceptora.

Extracción del DNA para el estudio de replicación de fagos .

Con el fin de analizar la replicación de los diferentes fagos, después de la infección o inducción de las diferentes cepas en estudio se tomaron muestras a distintos tiempos, que posteriormente se centrifugaron para precipitar las bacterias. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en TES-sacarosa (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5 M sacarosa a pH 6) y se lisaron mediante lisostafina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) en presencia de RNasa pancreática ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante 30 min. a 37 °C. El lisado obtenido se incubó con proteinasa K ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) en presencia de SDS (1%) durante 30 min. a 55 °C. Posteriormente se añadió tampón de carga y se vorteoó durante al menos 20 minutos. Seguidamente se introdujo la muestra en un baño de hielo seco hasta que el lisado se congeló y posteriormente se descongeló en un baño de agua a 65 °C. Esta operación se repitió dos veces más. Por último las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0.7 % y se dejaron correr durante toda la noche con un voltaje

de 20 V para poder separar mejor el DNA genómico de la banda de replicación del fago. Finalmente el gel se fotografió y en los casos en los que fue necesario se transfirió el gel a una membrana de nylon para la realización de un Southern blot.

METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA OBTENCIÓN DE MUTANTES.

Obtención de mutantes por delección.

Para la mutación de un determinado gen, se lleva a cabo la clonación de fragmentos flanqueantes a la secuencia a deleccionar en el plásmido pMAD (Arnaud *et al.*, 2004), el cual permite realizar deleciones sin introducir ningún marcador cromosómico. Para ello, se amplifican los fragmentos flanqueantes a la zona a deleccionar utilizando dos parejas de cebadores. Una pareja amplificaría la región 5' a la deleción (cebadores 1 y 2) y la otra pareja amplificaría la región 3' a la deleción (cebadores 3 y 4). La secuencia del cebador 3 (delimita el extremo 3' de la deleción) contiene una cola en su extremo 5' que es complementaria con la secuencia del cebador 2 (delimita el extremo 5' de la deleción). En una segunda PCR utilizamos como DNA molde 1 μ l de los amplificados obtenidos en la primera PCR y los cebadores 1 y 4 (cebadores externos). En los primeros ciclos de la PCR las secuencias complementarias de los cebadores 2 y 3 hibridan y permiten la obtención de un molde de DNA que contiene los dos amplificados. En los siguientes ciclos de la PCR los cebadores externos 1 y 4 permiten la amplificación del nuevo molde de DNA formado. De esta forma un solo amplificado contendría los dos fragmentos necesarios para realizar la deleción (Figura 17).

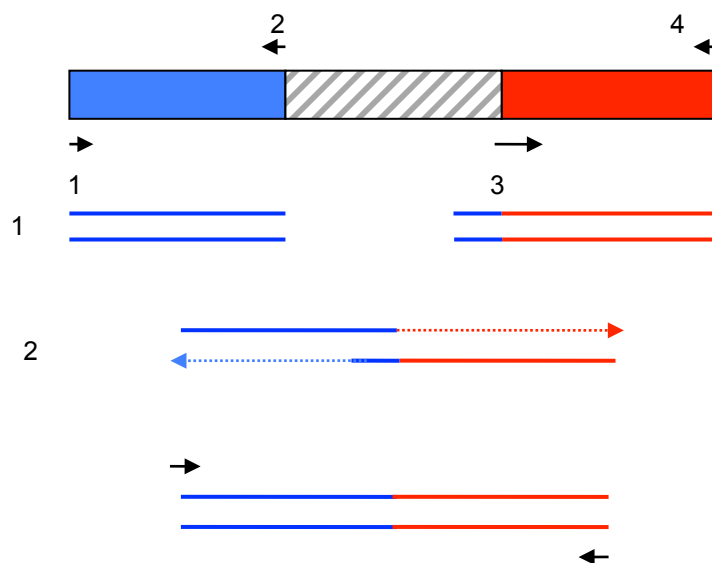


Figura 17. Representación esquemática de la doble PCR realizada para obtener los mutantes por delección. La caja rayada indica la zona a deleccionar. Las cajas verde y morada representan los fragmentos 5' y 3' flanqueantes a la delección amplificados en la PCR 1. Las flechas indican la posición donde hibridan los cebadores.

Los fragmentos amplificados pueden clonarse en los vectores pc-TOPO o pGEM-T (Promega), los cuales facilitan la ligación de los productos de PCR ya que no necesitan ser digeridos previamente. A continuación estos fragmentos fueron liberados de las construcciones generadas cortando con un par de enzimas de restricción, y fueron ligados en el plásmido pMAD que previamente había sido digerido con el mismo par de enzimas de restricción. El plásmido pMAD contiene un origen de replicación para Gram negativos y un origen de replicación termosensible para Gram positivos. También contiene un gen que confiere resistencia a eritromicina en *S. aureus* y un gen que codifica para la enzima β -galactosidasa que al metabolizar la sustancia X-gal produce un metabolito de color azul. De esta forma, las bacterias que presenten el plásmido serán resistentes a eritromicina y en presencia de X-gal, las colonias que produzcan serán azules.

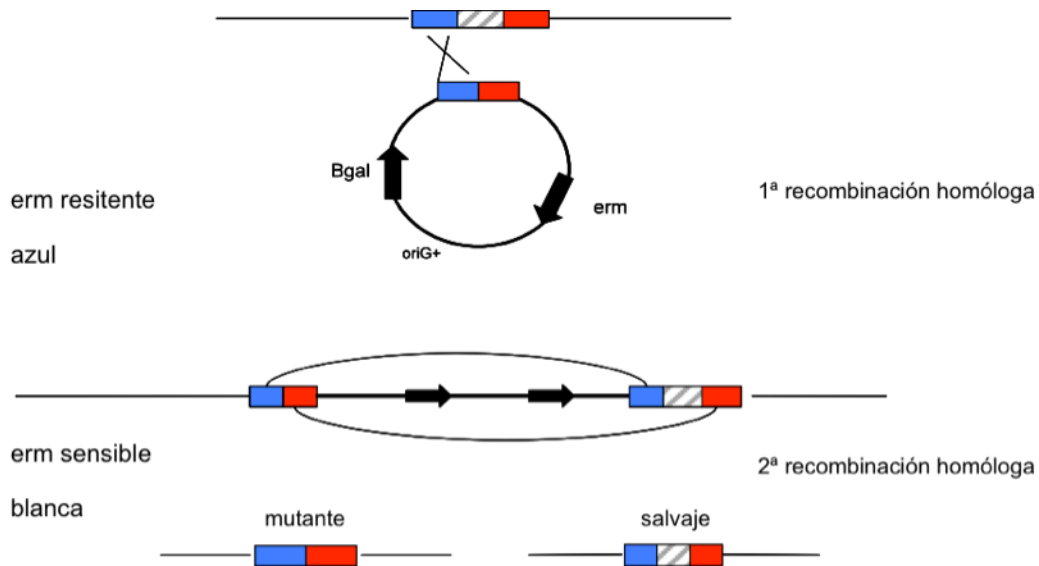


Figura 18. Esquema representativo de la mutagénesis por pMAD. En la 1ª recombinação homóloga (integración del plásmido) la bacteria es azul y es capaz de crecer en presencia de erm. En la 2ª recombinação homóloga (delección del plásmido) la bacteria es blanca y sensible a erm. En esta 2ª recombinação se pueden producir dos genotipos: mutante por delección ó restauración del genotipo salvaje.

Las construcciones generadas en pMAD se introducen a una cepa de *S. aureus*, en nuestro caso la RN4220 por ser fácilmente transformable. Se crecen las bacterias obtenidas a 30°C en TSB conteniendo eritromicina y se plaquean diluciones del cultivo en fase estacionaria en TSA conteniendo eritromicina y Xgal a 43 °C (temperatura restrictiva). El plásmido pMAD no puede replicar a 43 °C, por lo que las colonias que crezcan en eritromicina serán bacterias con el plásmido integrado en el cromosoma bacteriano por recombinación homóloga de alguno de los dos fragmentos flanqueantes al gen a deleccionar. A continuación, se pican de 1 a 5 colonias en TSB sin antibiótico, se plaquean diluciones del cultivo estacionario en TSA conteniendo Xgal a 43 °C y se seleccionan aquellas colonias de color blanco, que serán las que hayan perdido el plásmido en la segunda recombinación. Finalmente se comprueba que se había producido el genotipo deseado mediante secuenciación del amplificado obtenido mediante PCR con cebadores flanqueantes a la delección. La Figura x muestra un esquema de la técnica de mutagénesis por delección mediante pMAD.

MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

Ensayo enzimático para la cuantificación de la actividad β -lactamasa en los plásmidos de fusión transcripcional.

Para la realización de esta técnica se utilizó un cultivo de las cepas de interés crecido a 37 °C en agitación durante toda la noche. En primer lugar diluimos el cultivo 1:50 en TSB y crecimos hasta $DO_{540}=0.3-0.4$, momento en el recogemos una alícuota de 100 μ l de muestra que anotamos como t_0 y que será congelada para su posterior análisis. A continuación, en caso de ser necesario en función del experimento, se añade MC y se incuba en agitación lenta a 32 °C. Transcurridos 90 y 180 minutos de la inducción, se recogen alícuotas de 50 μ l de cada muestra para el análisis y a las que se les añade Azida Sódica (5 mM). Se transfiere a placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos y se procede a la lectura de la placa en el aparato THERMOmax (Molecular devices) a una longitud de onda de DO_{650} y DO_{490} . A continuación añadimos 50 μ l de la solución de nitrocefina (132 μ g/ml en una solución de fosfato sódico 0.1M a pH 5,8) y se introduce de nuevo la placa en el aparato THERMOmax para su lectura durante 20 minutos a intervalos de 20 segundos.

Para el cálculo de las unidades de actividad β -lactamasa, se utilizaron las siguientes fórmulas:

Unidad de actividad β -lactamasa = V_{max} . factor de dilución/DO650nm

$V_{max} = \Delta\epsilon \times 10^3 / \text{min}$

Un incremento de absorbancia de 0.001 DO₄₉₀ se define como 1 unidad de actividad β -lactamasa.

SDS-PAGE, Western blot y tinción de Coomassie.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se utilizaron las cubetas Mini-protean II de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de las muestras se realizó como se describe en (Ni Eidhin *et al.*, 1998).

Para el análisis por Western blot se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF (Immobilon P de Millipore) mediante transferencia en condiciones húmedas. Las membranas se bloquearon con leche al 5 % en PBS-tween 0.05 % y la incubación de los anticuerpos se realizó en el tampón de bloqueo. Se utilizó un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y se reveló por el sistema ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare).

Para la tinción de Coomassie de los geles SDS-PAGE una vez finalizada la carrera electroforética, el gel se incubó en la solución de tinción (2.5 g Azul Brillante Coomassie R-250, 45 % metanol, 10 % ácido acético glaciar, 45 % agua bidestilada) durante 1 hora en agitación lenta. Transcurrido este tiempo, se extrae el gel teñido y se introduce en la solución desteñidora (20 % metanol, 15 % ácido acético glaciar, 65 % de agua bidestilada) hasta que se observen el bandeo proteico teñido de azul y el fondo casi transparente.

Tabla 10. Cepas utilizadas en estos estudios.

Cepas utilizadas en el estudio del ciclo del fago		
Cepas	Descripción	Referencia
RN4220	Derivado defectivo en restricción RN450	(Kreiwirth <i>et al.</i> , 1983)
RN450	NTCT8325 curada de los ϕ 11, ϕ 12 and ϕ 13	(Novick, 1967)
RN5101	RN450 Δ Spa	
RN9640	JP9011 Δ Spa	
RN9641	JP9010 Δ Spa	
RN9642	JP9012 Δ Spa	
RN451	RN450 lisogénica para ϕ 11	(Novick, 1967)
RN10359	RN450 lisogénica para ϕ 80 α	(Ubeda, et al 2007)
JH2-2	Enterococcus faecalis	(Yasmin, et al., 2010)
JP10324	RN450 lisogénica para ϕ 85	
JP5011	RN4220 lisogénica para phiSLT pvl::tetM	
JP8704	JP8703 SaPI1 tst::tetM	
JP3602	RN10359 SaPI1 tst::tetM	(Ubeda, et al., 2008)
RN1701	Derivado de RN4220	
JP9010	RN450 Δ clpX	
JP9011	RN450 Δ clpP	
JP10787	RN450 Δ clpP con mutación puntual Ser x Ala 98	
JP9012	RN450 Δ clpC	
JP10044	RN450 Δ clpXP	
JP7084	RN450 Δ clpB :: erm	
JP7085	RN450 Δ clpL :: erm	
JP7086	RN450 Δ clpYQ :: erm	
JP11919	JP1701 Δ clpP	
JP11920	JP1701 Δ clpP con mutación puntual Ser x Ala 98	
JP8008	JP9010 lisogénica para ϕ 80 α	
JP8009	JP9011 lisogénica para ϕ 80 α	
JP8010	JP9012 lisogénica para ϕ 80 α	
JP8011	JP7084 lisogénica para ϕ 80 α	
JP8012	JP7085 lisogénica para ϕ 80 α	
JP8013	JP7086 lisogénica para ϕ 80 α	
JP11932	JP1701 lisogénica para ϕ 80 α	

Cepas	Descripción	Referencia
JP11938	JP11919 lisogénica para $\phi 80\alpha$	
JP11939	JP11920 lisogénica para $\phi 80\alpha$	
JP8106	JP9011 lisogénica para $\phi 11$	
JP8107	JP9010 lisogénica para $\phi 11$	
JP8108	JP9012 lisogénica para $\phi 11$	
JP11488	JP10044 lisogénica para $\phi 80\alpha$	
JP11490	JP10044 lisogénica para $\phi 11$	
JP8109	JP7084 lisogénica para $\phi 11$	
JP8110	JP7085 lisogénica para $\phi 11$	
JP8111	JP7086 lisogénica para $\phi 11$	
JP11936	JP1701 lisogénica para $\phi 11$	
JP11938	JP11919 lisogénica para $\phi 11$	
JP11939	JP11920 lisogénica para $\phi 11$	
JP12378	JP9011 lisogénica para $\phi 85$	
JP11079	JP9010 lisogénica para $\phi 85$	
JP12379	JP10787 lisogénica para $\phi 85$	
JP12622	JP10044 lisogénica para $\phi 85$	
JP12619	JP7084 lisogénica para $\phi 85$	
JP12620	JP7085 lisogénica para $\phi 85$	
JP12621	JP7086 lisogénica para $\phi 85$	
JP12376	JP11919 lisogénica para $\phi 85$	
JP12377	JP11920 lisogénica para $\phi 85$	
JP12372	JP9011 lisogénica para ϕ SLT	
JP12375	JP9010 lisogénica para ϕ SLT	
JP8980	JP9012 lisogénica para ϕ SLT	
JP12623	JP10044 lisogénica para ϕ SLT	
JP8021	JP7084 lisogénica para ϕ SLT	
JP8022	JP7085 lisogénica para ϕ SLT	
JP8023	JP7086 lisogénica para ϕ SLT	
JP10362	E.coli C600	
JP10363	E.coli MG1655	
JP10401	JP10364 lisogénica para ϕ lambda	
JP11089	MG1655 $\Delta c/pX$	
JP11090	MG1655 $\Delta c/pP$	

Cepas	Descripción	Referencia
JP10752	JP11090 lisogénica para ϕ lambda	
JP10767	JP11089 lisogénica para ϕ lambda	
JP11925	JP10363 lisogénica para ϕ HK544	
JP11087	JP11089 lisogénica para ϕ HK544	
JP11088	JP11090 lisogénica para ϕ HK544	
JP10931	JP10363 lisogénica para ϕ HK106	
JP10932	JP10756 lisogénica para ϕ HK106	
JP10933	JP10697 lisogénica para ϕ HK106	
JP9912	JP9010 (pJP1632)	
JP9913	JP9010 (pJP1682)	
JP9917	JP9011 (pJP1633)	
JP9918	JP9011 (pJP1683)	
JP3603	SaPIbov1 tst::tetM	
JP12513	JP1701 SaPIbov1 tst::tetM	
JP12514	JP9010 SaPIbov1 tst::tetM	
JP12516	JP9011 SaPIbov1 tst::tetM	
JP12517	JP11919 SaPIbov1 tst::tetM	
JP12518	JP11920 SaPIbov1 tst::tetM	
JP11467	RN5010 (pJP1626)	
JP11468	RN9641 (pJP1626)	
JP11952	RN9640 (pJP1626)	
JP11470	RN10787 (pJP1626)	
JP11471	RN10044 (pJP1626)	
JP11472	RN5010 (pJP1627)	
JP11473	RN9641 (pJP1627)	
JP11962	RN9640 (pJP1627)	
JP11475	RN10787 (pJP1627)	
JP11477	RN5010 (pJP1628)	
JP11478	RN9641 (pJP1628)	
JP11959	RN9640 (pJP1628)	
JP11480	RN10787 (pJP1628)	
JP10046	(pJP1626)	
JP10047	RN10042 (pJP1626)	
JP10048	RN10043 (pJP1626)	

Cepas	Descripción	Referencia
JP11207	RN11191 (pJP1685)	
JP11205	RN11190 (pJP1684)	
JP11940	RN5101 (pJP1629)	
JP11941	RN9640 (pJP1629)	
JP11445	RN10787 (pJP1629)	
JP11147	RN9641 (pJP1629)	
JP11439	RN5101 (pJP1630)	
JP11945	RN9640 (pJP1630)	
JP11440	RN10787 (pJP1630)	
JP11142	RN9641 (pJP1630)	
JP10975	RN5101 (pJP1631)	
JP11337	RN9641 (pJP1631)	
JP11338	RN9640 (pJP1631)	
JP11083	RN450 Δ RecA lisogénica para ϕ 11	(Wolf et al., 2012)
JP11082	JP11083 PCG254 lisogénica para ϕ 11	(Wolf et al., 2012)
JP11123	JP8107 PCG254	
JP12349	JP8106 PCG254	

Tabla 11. Oligos utilizados en estos estudios

Cebadores utilizados para obtener los mutantes Clp.	
Cebador	Secuencia (5'→3')
ClpX-3mB	CGCGGATCCGCAGAAGCAAATACAGTAGACG
ClpX-4c	GTCTTTTCCGCAGAAAGAGC
ClpX-5m	TCTTTCTGCGGAAAAGACGAACTATACGACGCAGAAGG
ClpX-6cS	ACGCGTCGACCTTTTGAACCTTACCTTTTGG
ClpP-5mS	ACGCGTCGACAGCTGGAAAGTTTAATGAAGG
ClpP-6c	TGAGTATATATCATATGCACG
ClpP-7m	GTGCATATGATATATACTCAGATCGTGATAACTTCTAA
Clp-8cB	CGCGGATCCACTGCACCTATACCTGAACG
ClpC-5mS	ACGCGTCGACGAACTAATAAAACAACCAGCAGC
ClpC- 6c	ACGAATTGCTTCTTCTTGG
ClpC- 7m	CAAGAAGAAGCAATTCGTAAAGAGTTTAAATATGACATT
ClpC- 8cB	CGCGGATCCATTAGGACATTTCCCATCC
ClpB-1mE	CCGGAATTCTCTAGAATTGATGGAAAAGTAGG
ClpB- 2c	TTGCTGACTCAGTTCAACTGG
ClpB- 3m	GTTGAACTGAGTCAGCAAAAAGAGGGATTCCCAGAAGG
ClpB- 4cB	CGCGGATCCGGGATTAGCAGAAATCAACC
ClpL-1mS	ACGCGTCGACACTACCTGTTGGCTTTAAAGG
ClpL- 2c	TCGAAAATTGAATCAAAGTCG
ClpL- 3m	ACTTTGATTCAATTTTTCGAGTTGAGGATAACGAATTA
ClpL- 4cB	CGCGGATCCGAAGTTATCGTAAGTTTCGATGG
ClpYQ-1mE	CCGGAATCCACCGTATTAGGAAAAGGGAGC
ClpYQ-2c	TTGTTGACCAAGCGTACTTGC
ClpYQ-3m	AAGTAACGCTTGGTCAACAAGCACCAAGTATGCCGAAT
ClpYQ-4cB	CGCGGATCCTGATGCGATTAATAGGCCTTCC
ClpP-13m	ATGGCTGCAGCCATGGGATCATTC
ClpP-14c	GAATGATCCCATGGCTGCAGCCAT
ClpPEC-1m	CGGTACAGCAGGTTTTTTCAATTTTATCCAGGAGACGGAA

Cebador	Secuencia (5'→3')
ClpPEC-2c	TCTCAGGCGCAAGCCGCTTACAGCGTTGTGCCGCCCTG
ClpXEC-1c	TCGTGTGCGGCACAAAGAACAAGAAGAGGTTTTGACC
ClpXEC-2c	ATCCCCCCTTTTTGGTAACTAATTGTATGGGAATGGTTA

Cebadores utilizados para obtener las complementaciones en pCN51	
Cebador	Secuencia (5'→3')
ClpX-11mB	CCGGAATTCTTCACACAGGAAACAGACCATGTTTAAATT
ClpX-12cS	ACGCGTCGAC ACATCAATGATTAAGCTGATGT
ClpXEF-1mB	CGCGGATCCCGATACCTTGGTGATAATTTG
ClpXEF-2cS	ACGCGTCGACAATTTTGTCTTCTTTAGTGC
ClpP-11mB	CGCGGATCCTATGTAAAATAATGAGTAACAG
ClpP-12cE	CCGGAATTCCATACAAAAAGAGCAGACAGC
ClpPEF-1mB	CGCGGATCCAATAAATAAATCATCGATGCT
ClpPEF-2cE	CCGGAATTGACTGTTTTATAATTATGCTTGC

Cebadores utilizados para obtener las construcciones en PROEX.	
Cebador	Secuencia (5'→3')
ClpP-19mE	CCGGAATTCTTCACACAGGAAACAGACCATGAATTTAATT
ClpP-20cS	ACGCGTCGACAATTATTTTGTTCAGGTACCAT
clphi11-6mB	CGCGGATCCGATGGATAAAAAAGAATTAGCG
clphi11-7cE	CCGGAATTGATATCAAGTTATCGTATGCTATAAT
LexA-26 mB	CGCGGATCCGATGAGAGAATTAACAAAACGACAA
LexA-27cE	CCGGAATTCCGGTTTTAAATATTACATTTTC

Cebadores utilizados para obtener las construcciones en pCN41.	
Cebador	Secuencia (5'→3')
orf6phi11-10cE	CCGGAATTCTTATGTCTCCTTTAAGATGTTTG
c1phi113xf-2c	CGATATCGTGATCTTTATAATCGCCATCGTGATCTTTATA
c1phi113xf-1m	CGATGGCGATTATAAAGATCACGATATCGATTATAAAGA
orf5phi11-4mB	CGCGGATCCGCCATATAGGCGCTATTAATC
c1phi113xf-4mS	ACGCGTCGACAATTGGGTTATACTATAGGTAAATTTAAG
clpCN41-1S	ACGCGTCGACTACTATAGGTAAATTTAAGGAGG
c1phi11-5mB	CGCGGATCCTATAATTCTTCTCCTATTTAAGCACCAGTT
LexA-21mE	CCGGAATTCTAACGTTGTGACAATGTATC
LexA3xf- 24c	TAATCGATATCGTGATCTTTATAATCGCCATCGTGATCTT
LexA3xf-23m	AAAGATCACGATATCGATTATAAAGATGATGATGATAAAA
LexA-20cE	CCGGAATTCCGATAATATATAACGGTTTAAAATA
LexA-32cB	CGCGGATCCTGCGGTAATAGGAACTTATGCTGTGAC

Tabla 12. Plásmidos usados en estos estudios.

Plásmidos utilizados		
Plásmidos	Descripción	Referencia
pMAD	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a <i>erm</i> y el gen <i>lacZ</i>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pCN51	Vector de expresión con origen de replicación para <i>S. aureus</i> , contiene el gen de resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pCN41	Utilizado en la fusión transcripcional de <i>Staphylococcus</i> , portador de β -lactamasa <i>blaZ</i> , contiene resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pCG235	Vector de expresión del gen <i>recA</i> , contiene resistencia a clor.	(Schröder <i>et al.</i> , 2013)
JP1626	pCN41 expresión cl con 3xflag en N-terminal, portador de β -lactamasa <i>blaZ</i> tras <i>cro</i>	
JP1688	pCN41 expresión cl con 3xflag en C-terminal, portador de β -lactamasa <i>blaZ</i> tras <i>cro</i>	
JP1627	pCN41 expresión cl con codón de parada y 3xflag, portador de β -lactamasa <i>blaZ</i> tras <i>cro</i>	

Plásmido	Descripción	Referencia
JP1628	pCN41 expresión cl no degradable y 3xflag, portador de β -lactamasa blaZ tras cro	
JP1629	pCN41 expresión lexA con 3xflag en N-terminal, portador de β -lactamasa blaZ tras sosA	
JP1689	pCN41 expresión lexA con 3xflag en C-terminal, portador de β -lactamasa blaZ tras sosA	
JP1630	pCN41 expresión lexA con codón de parada y 3xflag, portador de β -lactamasa blaZ tras sosA	
JP1631	pCN41 expresión lexA no degradable y 3xflag, portador de β -lactamasa blaZ tras sosA	
JP1686	pCN41 expresión cl ,portador de β -lactamasa blaZ tras cro	
JP1687	pCN41 expresión LexA portador de β -lactamasa blaZ tras sosA	
JP1632	pCN51 expresión clpX procedente de S. aureus para complementación	
JP1682	pCN51 expresión clpX procedente de E. faecalis para complementación	
JP1633	pCN51 expresión clpP procedente de S. aureus para complementación	
JP1634	pCN51 expresión clpP procedente de E. faecalis para complementación	
JP1680	PKD46 para la mutación de clpX en E. coli	
JP1681	PKD46 para la mutación de clpP en E. coli	
JP1636	pMAD para la mutación de clpX en S. aureus	
JP1675	pMAD para la mutación de clpP en S. aureus	
JP1684	PROEX expresión ClpP-LexA	
JP1685	PROEX expresión ClpP.Cl	

Capítulo VI



Conclusiones

En respuesta a los objetivos planteados en el inicio de este trabajo hemos obtenido las siguientes **conclusiones**:

1. Las proteínas Clp están implicados en el control de genes de virulencia en bacterias patógenas.
2. Las proteínas Clp son necesarias para la inducción de fagos lisogénicos en *Staphylococcus aureus*.
3. El efecto de las proteínas Clp en la inducción de fagos se centra en el género Gram positivo.
4. La chaperona ClpX interviene en la etapa de escisión de fagos durante su replicación, siendo esencial su presencia.
5. Las proteínas Clp no están implicadas en la movilización de islas de patogenicidad.
6. Las proteínas Clp son necesarias en la escisión del represor CI y en la degradación del fragmento N-terminal que se genera, por tanto necesarias para la desrepresión de genes del ciclo lítico.
7. Las proteínas Clp son necesarias en la escisión del represor LexA y en la degradación del fragmento N-terminal que se genera, por tanto necesarias para la desrepresión de genes implicados en la expresión de proteínas reparadoras de daño celular.
8. La proteasa ClpP posee un mecanismo doble de actuación en la respuesta SOS.

Capítulo VII



Bibliografía

- Aertsen, A. and C. W. Michiels (2004). "Stress and how bacteria cope with death and survival." *Critical reviews in microbiology* **30**(4): 263-273.
- Anstead, G. M., G. Quinones-Nazario and J. S. Lewis II (2007). Treatment of infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols*, Springer: 227-258.
- Barkema, H., Y. Schukken and R. Zadoks (2006). "Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis." *Journal of Dairy Science* **89**(6): 1877-1895.
- Bergonier, D. and X. Berthelot (2003). "New advances in epizootiology and control of ewe mastitis." *Livestock Production Science* **79**(1): 1-16.
- Biberstein, E. (1994). "Dermatófitos." *Tratado de microbiología veterinaria* (1ªed.). Editorial Acribia **38**: 309-316.
- Böttcher, T. and S. A. Sieber (2008). " β -lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of *Staphylococcus aureus*." *Journal of the American Chemical Society* **130**(44): 14400-14401.
- Butala, M., D. Žgur-Bertok and S. J. Busby (2009). "The bacterial LexA transcriptional repressor." *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**(1): 82-93.
- Cohn, M. T., P. Kjelgaard, D. Frees, J. R. Penadés and H. Ingmer (2011). "Clp-dependent proteolysis of the LexA N-terminal domain in *Staphylococcus aureus*." *Microbiology* **157**(3): 677-684.
- Conlon, B. P., E. S. Nakayasu, L. E. Fleck, M. D. LaFleur, V. M. Isabella, K. Coleman, S. N. Leonard, R. D. Smith, J. N. Adkins and K. Lewis (2013). "Activated ClpP kills persists and eradicates a chronic biofilm infection." *Nature* **503**(7476): 365-370.
- Corpa, J., K. Hermans and F. Haesebrouck (2010). "Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review." *World Rabbit Science* **17**(3): 115-125.
- Derré, I., G. Rapoport and T. Msadek (1999). "CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria." *Molecular microbiology* **31**(1): 117-131.
- Dinges, M. M., P. M. Orwin and P. M. Schlievert (2000). "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*." *Clinical microbiology reviews* **13**(1): 16-34.
- Dougan, D. A., A. Mogk, K. Zeth, K. Turgay and B. Bukau (2002). "AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime." *FEBS letters* **529**(1): 6-10.
- Farrand, A. J., M. L. Reniere, H. Ingmer, D. Frees and E. P. Skaar (2013). "Regulation of host hemoglobin binding by the *Staphylococcus aureus* Clp proteolytic system." *Journal of bacteriology* **195**(22): 5041-5050.
- Feil, E. J., J. E. Cooper, H. Grundmann, D. A. Robinson, M. C. Enright, T. Berendt, S. J. Peacock, J. M. Smith, M. Murphy and B. G. Spratt (2003). "How clonal is *Staphylococcus aureus*?" *Journal of bacteriology* **185**(11): 3307-3316.

- Feng, J., S. Michalik, A. N. Varming, J. H. Andersen, D. Albrecht, L. Jelsbak, S. Krieger, K. Ohlsen, M. Hecker and U. Gerth (2013). "Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in *Staphylococcus aureus*." *Journal of proteome research* **12**(2): 547-558.
- Flynn, J. M. (2004). *Substrate selection by the ClpXP protease: a tail of destruction*, Massachusetts Institute of Technology.
- Flynn, J. M., I. Levchenko, R. T. Sauer and T. A. Baker (2004). "Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation." *Genes & development* **18**(18): 2292-2301.
- Flynn, J. M., S. B. Neher, Y.-I. Kim, R. T. Sauer and T. A. Baker (2003). "Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals." *Molecular cell* **11**(3): 671-683.
- Frees, D., L. Brøndsted and H. Ingmer (2013). *Bacterial proteases and virulence. Regulated Proteolysis in Microorganisms*, Springer: 161-192.
- Frees, D., A. Chastanet, S. Qazi, K. Sørensen, P. Hill, T. Msadek and H. Ingmer (2004). "Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*." *Molecular microbiology* **54**(5): 1445-1462.
- Frees, D., U. Gerth and H. Ingmer (2014). "Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*." *International Journal of Medical Microbiology* **304**(2): 142-149.
- Frees, D., S. N. Qazi, P. J. Hill and H. Ingmer (2003). "Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence." *Molecular microbiology* **48**(6): 1565-1578.
- Frees, D., K. Sørensen and H. Ingmer (2005). "Global virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: pinpointing the roles of ClpP and ClpX in the sar/agr regulatory network." *Infection and immunity* **73**(12): 8100-8108.
- Frees, D., P. Varmanen and H. Ingmer (2001). "Inactivation of a gene that is highly conserved in Gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*." *Molecular microbiology* **41**(1): 93-103.
- Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair and P. Berche (2000). "The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*." *Molecular microbiology* **35**(6): 1286-1294.
- Ganguly, T., M. Das, A. Bandhu, P. K. Chanda, B. Jana, R. Mondal and S. Sau (2009). "Physicochemical properties and distinct DNA binding capacity of the repressor of temperate *Staphylococcus aureus* phage ϕ 11." *FEBS journal* **276**(7): 1975-1985.
- Gao, J. and G. C. Stewart (2004). "Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter." *Journal of bacteriology* **186**(12): 3738-3748.
- Gao, Y.-G., M. Selmer, C. M. Dunham, A. Weixlbaumer, A. C. Kelley and V. Ramakrishnan (2009). "The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state." *Science* **326**(5953): 694-699.

- Gerth, U., E. Krüger, I. Derré, T. Msadek and M. Hecker (1998). "Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance." *Molecular microbiology* **28**(4): 787-802.
- Ghisotti, D., F. Briani, F. Forti, F. Piazza, S. Polo, P. Sabbattini, T. Sturniolo, S. Terzano, S. Zangrossi and M. Zappone (1995). "Multiple regulatory mechanisms controlling phage-plasmid P4 propagation." *FEMS microbiology reviews* **17**(1-2): 127-134.
- Giachino, P., S. Engelmann and M. Bischoff (2001). "σB Activity Depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*." *Journal of Bacteriology* **183**(6): 1843-1852.
- Gottesman, S., S. Wickner, M. R. Maurizi, C. R. Beals, N. A. Clipstone, S. N. Ho, G. R. Crabtree, I. Zamir, J. Zhang and M. A. Lazar (1997). "Protein quality control: triage by chaperones and proteases 815." *Genes & Development*.
- Guo, F., M. R. Maurizi, L. Esser and D. Xia (2002). "Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease." *Journal of Biological Chemistry* **277**(48): 46743-46752.
- Herbert, S., A.-K. Ziebandt, K. Ohlsen, T. Schäfer, M. Hecker, D. Albrecht, R. Novick and F. Götz (2010). "Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates." *Infection and immunity* **78**(6): 2877-2889.
- Herman, C., D. Thévenet, P. Bouloc, G. C. Walker and R. D'Ari (1998). "Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH)." *Genes & development* **12**(9): 1348-1355.
- Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, L. Shaw, J. K. Lithgow and S. J. Foster (2002). "σB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4." *Journal of bacteriology* **184**(19): 5457-5467.
- Iandolo, J. J., V. Worrell, K. H. Groicher, Y. Qian, R. Tian, S. Kenton, A. Dorman, H. Ji, S. Lin and P. Loh (2002). "Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages φ11, φ12 and φ13 of *Staphylococcus aureus* 8325." *Gene* **289**(1): 109-118.
- Ingmer, H. and L. Brøndsted (2009). "Proteases in bacterial pathogenesis." *Research in microbiology* **160**(9): 704-710.
- Ingmer, H., F. K. Vogensen, K. Hammer and M. Kilstrup (1999). "Disruption and analysis of the clpB, clpC, and clpE genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria." *Journal of bacteriology* **181**(7): 2075-2083.
- Kim, Y.-I., R. E. Burton, B. M. Burton, R. T. Sauer and T. A. Baker (2000). "Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine." *Molecular cell* **5**(4): 639-648.
- Kirstein, J., N. Molière, D. A. Dougan and K. Turgay (2009). "Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases." *Nature Reviews Microbiology* **7**(8): 589-599.
- Lamrani, S., C. Ranquet, M. J. Gama, H. Nakai, J. A. Shapiro, A. Toussaint and G. Maenhaut-Michel (1999). "Starvation-induced Muets62-mediated coding sequence

- fusion: a role for ClpXP, Lon, RpoS and Crp." *Molecular microbiology* **32**(2): 327-343.
- Li, M., G. Y. Cheung, J. Hu, D. Wang, H.-S. Joo, F. R. DeLeo and M. Otto (2010). "Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains." *Journal of Infectious Diseases* **202**(12): 1866-1876.
- Lindqvist, B. H., G. Dehò and R. Calendar (1993). "Mechanisms of genome propagation and helper exploitation by satellite phage P4." *Microbiological reviews* **57**(3): 683-702.
- Lindsay, J. A., A. Ruzin, H. F. Ross, N. Kurepina and R. P. Novick (1998). "The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*." *Molecular microbiology* **29**(2): 527-543.
- Little, J. W., S. H. Edmiston, L. Z. Pacelli and D. W. Mount (1980). "Cleavage of the *Escherichia coli* *lexA* protein by the *recA* protease." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**(6): 3225-3229.
- Little, J. W. and M. Gellert (1983). "The SOS regulatory system: control of its state by the level of RecA protease." *Journal of molecular biology* **167**(4): 791-808.
- Luo, J., A. Y. Nikolaev, S.-i. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente and W. Gu (2001). "Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress." *Cell* **107**(2): 137-148.
- Maiques, E., C. Úbeda, S. Campoy, N. Salvador, Í. Lasa, R. P. Novick, J. Barbé and J. R. Penadés (2006). " β -Lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*." *Journal of bacteriology* **188**(7): 2726-2729.
- Maurizi, M., W. P. Clark, S.-H. Kim and S. Gottesman (1990). "Clp P represents a unique family of serine proteases." *Journal of Biological Chemistry* **265**(21): 12546-12552.
- McCullagh, J. J., P. T. McNamee, J. A. Smyth and H. J. Ball (1998). "The use of pulsed field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in commercial broiler flocks." *Veterinary microbiology* **63**(2): 275-281.
- Mei, J. M., F. Nourbakhsh, C. W. Ford and D. W. Holden (1997). "Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis." *Molecular microbiology* **26**(2): 399-407.
- Michalik, S., J. Bernhardt, A. Otto, M. Moche, D. Becher, H. Meyer, M. Lalk, C. Schurmann, R. Schlüter and H. Kock (2012). "Life and death of proteins: a case study of glucose-starved *Staphylococcus aureus*." *Molecular & Cellular Proteomics* **11**(9): 558-570.
- Michel, A., F. Agerer, C. R. Hauck, M. Herrmann, J. Ullrich, J. Hacker and K. Ohlsen (2006). "Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair." *Journal of bacteriology* **188**(16): 5783-5796.
- Mogk, A. and B. Bukau (2004). "Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase." *Current Biology* **14**(2): R78-R80.

- Mukhopadhyay, B., K. R. Marshall-Batty, B. D. Kim, D. O'Handley and H. Nakai (2003). "Modulation of phage Mu repressor DNA binding and degradation by distinct determinants in its C-terminal domain." *Molecular microbiology* **47**(1): 171-182.
- Nagashima, K., Y. Kubota, T. Shibata, C. Sakaguchi, H. Shinagawa and T. Hishida (2006). "Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance." *Journal of Biological Chemistry* **281**(41): 30941-30946.
- Nair, S., C. Frehel, L. Nguyen, V. Escuyer and P. Berche (1999). "ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*." *Molecular microbiology* **31**(1): 185-196.
- Neher, S. B., J. M. Flynn, R. T. Sauer and T. A. Baker (2003). "Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage." *Genes & development* **17**(9): 1084-1089.
- Neher, S. B., J. Villén, E. C. Oakes, C. E. Bakalarski, R. T. Sauer, S. P. Gygi and T. A. Baker (2006). "Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon." *Molecular cell* **22**(2): 193-204.
- Niu, G., T. Okinaga, L. Zhu, J. Banas, F. Qi and J. Merritt (2008). "Characterization of *irvR*, a novel regulator of the *irvA*-dependent pathway required for genetic competence and dextran-dependent aggregation in *Streptococcus mutans*." *Journal of bacteriology* **190**(21): 7268-7274.
- Novick, R. P. (2003). "Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence." *Molecular microbiology* **48**(6): 1429-1449.
- O'Mahony, R., Y. Abbott, F. Leonard, B. Markey, P. Quinn, P. Pollock, S. Fanning and A. Rossney (2005). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland." *Veterinary microbiology* **109**(3): 285-296.
- Oppenheim, A. B., O. Kobiler, J. Stavans, D. L. Court and S. Adhya (2005). "Switches in bacteriophage lambda development." *Annu. Rev. Genet.* **39**: 409-429.
- Oscarsson, J., A. Kanth, K. Tegmark-Wisell and S. Arvidson (2006). "SarA is a repressor of *hla* (α -hemolysin) transcription in *Staphylococcus aureus*: its apparent role as an activator of *hla* in the prototype strain NCTC 8325 depends on reduced expression of *sarS*." *Journal of bacteriology* **188**(24): 8526-8533.
- Peters, B. M., M. A. Jabra-Rizk, A. Graeme, J. W. Costerton and M. E. Shirtliff (2012). "Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease." *Clinical microbiology reviews* **25**(1): 193-213.
- Roberts, J. W. and C. W. Roberts (1975). "Proteolytic cleavage of bacteriophage lambda repressor in induction." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**(1): 147-151.
- Rouquette, C., M. T. Ripio, E. Pellegrini, J. M. Bolla, R. I. Tascon, J. A. Vázquez-Boland and P. Berche (1996). "Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*." *Molecular microbiology* **21**(5): 977-987.

- Sass, P., M. Josten, K. Famulla, G. Schiffer, H.-G. Sahl, L. Hamoen and H. Brötz-Oesterhelt (2011). "Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(42): 17474-17479.
- Sauer, R. T. and T. A. Baker (2011). "AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction." *Annual review of biochemistry* **80**: 587-612.
- Sauer, R. T., D. N. Bolon, B. M. Burton, R. E. Burton, J. M. Flynn, R. A. Grant, G. L. Hersch, S. A. Joshi, J. A. Kenniston and I. Levchenko (2004). "Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines." *Cell* **119**(1): 9-18.
- Schirmer, E. C., J. R. Glover, M. A. Singer and S. Lindquist (1996). "HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions." *Trends in biochemical sciences* **21**(8): 289-296.
- Schröder, W., C. Goerke and C. Wolz (2013). "Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**(3): 529-538.
- Shoji, M., L. Cui, R. Iizuka, A. Komoto, H.-m. Neoh, Y. Watanabe, T. Hishinuma and K. Hiramatsu (2011). "walk and clpP mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**(8): 3870-3881.
- Taddei, F., I. Matic and M. Radman (1995). "cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(25): 11736-11740.
- Úbeda, C., E. Maiques, E. Knecht, Í. Lasa, R. P. Novick and J. R. Penadés (2005). "Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci." *Molecular microbiology* **56**(3): 836-844.
- Úbeda, C., M. Tormo, C. Cucarella, P. Trotonda, T. J. Foster, Í. Lasa and J. R. Penadés (2003). "Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands." *Molecular microbiology* **49**(1): 193-210.
- Viana, D., J. Blanco, M. Á. Tormo-Más, L. Selva, C. M. Guinane, R. Baselga, J. M. Corpa, Í. Lasa, R. P. Novick and J. R. Fitzgerald (2010). "Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein." *Molecular microbiology* **77**(6): 1583-1594.
- Wang, C., J. Fan, C. Niu, C. Wang, A. E. Villaruz, M. Otto and Q. Gao (2010). "Role of spx in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **59**(2): 152-160.
- Wertheim, H. F., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh and J. L. Nouwen (2005). "The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections." *The Lancet infectious diseases* **5**(12): 751-762.
- Wickner, S., M. R. Maurizi and S. Gottesman (1999). "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins." *Science* **286**(5446): 1888-1893.

Wommack, K. E. and R. R. Colwell (2000). "Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(1): 69-114.

Wu, L., O. Estrada, O. Zaborina, M. Bains, L. Shen, J. E. Kohler, N. Patel, M. W. Musch, E. B. Chang and Y.-X. Fu (2005). "Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*." *Science* **309**(5735): 774-777.

Yu, V. L., A. Goetz, M. Wagener, P. B. Smith, J. D. Rihs, J. Hanchett and J. J. Zuravleff (1986). "Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in patients on hemodialysis." *New England Journal of Medicine* **315**(2): 91-96.