

Rocío González-Soltero¹
Ana García-Cañas²
Rosa B. Mohedano²
Belén Mendoza-Chamizo³
Emilia Botello³

El papel de la reparación de roturas de doble cadena de ADN en *Escherichia coli* en la sensibilidad a quinolonas: implicaciones terapéuticas

¹Departamento de Ciencias Biomédicas Básicas. Universidad Europea de Madrid. Villaviciosa de Odón, Madrid.

²Departamento de Especialidades Médicas. Universidad Europea de Madrid. Villaviciosa de Odón, Madrid.

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura, Badajoz.

RESUMEN

Introducción. Las quinolonas son uno de los tipos de antibióticos cuyas tasas de resistencia se han visto incrementadas en los últimos años. A nivel molecular, bloquean a las topoisomerasas tipo II generando cortes de doble cadena (double strand breaks, DSBs) en el ADN. Se ha propuesto que estos DSBs podrían tener un doble papel, como mediadores de su efecto bactericida y también como responsables de desencadenar los mecanismos de resistencia y tolerancia a las quinolonas.

Material y métodos. En el presente trabajo hemos estudiado la implicación de los mecanismos de reparación de DSBs en la sensibilidad a las quinolonas: reanudación de horquillas de replicación paradas dependiente de recombinación (RFR), inducción de la respuesta SOS, reparación por síntesis translesional (TLS) y escisión de nucleótidos (NER). Para ello, en los laboratorios de la Universidad Europea de Madrid, se han analizado las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de tres quinolonas diferentes en mutantes procedentes de varias colecciones de cultivos tipo de *Escherichia coli*.

Resultados. Mutantes en *recA*, *recBC*, *priA* y *lexA* mostraron una disminución significativa de la CMI a todas las quinolonas. No se observaron cambios significativos en estirpes mutantes en los mecanismos de reparación por TLS y NER.

Discusión. Estos datos indican que, en presencia de quinolonas, los mecanismos de RFR y la inducción de la respuesta SOS estarían implicados en la aparición de mecanismos de sensibilidad a quinolonas.

Palabras clave: reparación del genoma; dianas terapéuticas; quinolonas; resistencia a antibióticos; sinergias

Role of double strand DNA break repair for quinolone sensitivity in *Escherichia coli*: therapeutic implications

ABSTRACT

Introduction. Quinolones are one of the types of antibiotics with higher resistance rates in the last years. At molecular level, quinolones block type II topoisomerases producing double strand breaks (DSBs). These DSBs could play a double role, as inductors of the quinolone bactericidal effects but also as mediators of the resistance and tolerance mechanisms.

Material and methods. In this work we have studied the molecular pathways responsible for DSBs repair in the quinolone susceptibility: the stalled replication fork reversal (recombination-dependent) (RFR), the SOS response induction, the translesional DNA synthesis (TLS) and the nucleotide excision repair mechanisms (NER). For this reason, at the European University in Madrid, we analysed the minimal inhibitory concentration (MIC) to three different quinolones in *Escherichia coli* mutant strains coming from different type culture collections.

Results. *recA*, *recBC*, *priA* and *lexA* mutants showed a significant reduction on the MIC values for all quinolones tested. No significant changes were observed on mutant strains for TLS and NER.

Discussion. These data indicate that in the presence of quinolones, RFR mechanisms and the SOS response could be involved in the quinolone susceptibility.

Keywords: genome repair; therapeutic targets; quinolones; antibiotic resistance; synergies

INTRODUCCIÓN

Las quinolonas (QLs) son la tercera familia de antibióticos más consumida en España, tras los betalactámicos y los macrólidos. Su principal indicación es el tratamiento de las infecciones ocasionadas por gramnegativos. Las bacterias gramnegativas, en especial los bacilos gramnegativos, tienen capacidad para producir cuadros

Correspondencia:
Rocío González-Soltero.
Departamento de Ciencias Biomédicas Básicas. Universidad Europea de Madrid. C/Tajo s/n.
28670. Villaviciosa de Odón (Madrid).
Teléfono: 912115392.
E-mail: mariadelrocio.gonzalez@uem.es

patológicos graves, sobre todo en el entorno intrahospitalario, ocasionando infecciones nosocomiales de difícil manejo terapéutico. La resistencia a los antimicrobianos de los bacilos gramnegativos como *E. coli* es un problema creciente, que en las últimas décadas ha sobrepasado los límites nosocomiales para también afectar a pacientes no hospitalizados¹.

En los últimos años las tasas de resistencia a QLS se han incrementado considerablemente. En España, por ejemplo, la resistencia a ciprofloxacino (CIP) en aislados de *E. coli* en sangre alcanzó el 19% en 2002. Actualmente, se están describiendo cepas de enterobacterias con sensibilidad disminuida a ácido nalidixico (NAL) con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 16-32 mg/L, e incluso con resistencia de alto nivel (CMI > 32 mg/L)². A esto se suma que pequeños aumentos de la CMI de una quinolona pueden traducirse en un impacto muy desfavorable en la eficacia terapéutica de todo el grupo farmacológico³. A día de hoy se sabe muy poco sobre las causas moleculares que llevan a estos descensos en la sensibilidad a QLS. Algunos estudios han descrito que mutaciones en genes de fenotipo mutador, muchas de ellas en genes pertenecientes a la respuesta SOS, podrían disminuir la sensibilidad a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*⁴ y en *E. coli*^{5,6}.

Las QLS ejercen su acción bloqueando a la ADN girasa y la topoisomerasa IV, ambas topoisomerasas tipo II cuya función es relajar tensiones en el ADN. El resultado es la formación de un complejo ternario QL-ADN-topoisomerasa que bloquea la maquinaria de replicación generando DSBs⁵. Se ha descrito que estos DSBs actuarían como agentes inductores de varias respuestas que contribuirían a una mejora en la supervivencia de la bacteria⁷.

En la literatura encontramos pocos estudios que relacionen directamente la presencia de DSBs y las rutas moleculares de muerte o supervivencia celular que se ponen en marcha en su presencia. Por ejemplo, se ha descrito que en *E. coli* la presencia de DSBs daría lugar a horquillas de replicación paradas⁸. Estas horquillas paradas pueden ser reparadas mediante un mecanismo de reanudación denominado reversión de la horquilla de replicación. Si estas horquillas son reparadas, se produce también una restauración de la viabilidad bacteriana. La proteína RecA es la proteína central en el proceso de RFR, mediante un mecanismo similar al necesario para la recombinación homóloga bacteriana⁸.

Por otro lado, los DSBs son potentes inductores de la respuesta SOS. La respuesta SOS es generada por un conjunto de más de 30 genes controlados por el represor LexA y que están relacionados con un gran número de actividades como la reparación del ADN y los procesos de mutagénesis relacionados con los fenómenos de resistencia a antibióticos⁸⁻¹¹. Otra proteína clave en la inducción de la respuesta SOS es también RecA¹². En este caso RecA se une a roturas de cadena sencilla en el ADN (single strand DNA, ssDNA) e induce así la autoproteólisis de LexA, lo que lleva a la desrepresión de los genes de la respuesta SOS⁹. Por otro lado, estos ssDNA pueden ser citotóxicos y conducir a la muerte celular⁵, aunque a día de hoy no se tiene muy

claro el mecanismo de la muerte mediada por QLS¹³. Recientemente se ha observado *in vivo* la formación de ssDNA en células de *E. coli* previamente tratadas con NAL y que estos ssDNA podrían ser generados también a partir de DSBs. Se ha propuesto que el complejo proteico RecBCD, que presenta actividad ADN exonucleasa, sería el responsable de generar los ssDNA a partir de los DSBs producidos por las QLS, siendo probablemente los intermediarios que controlarían tanto la supervivencia como la muerte de la bacteria tras un tratamiento con QLS^{14,15}.

Por otro lado, la inducción de la respuesta SOS pone en marcha otros mecanismos celulares como TLS y NER^{14,15}. Se ha descrito que estos procesos podrían mediar también la reparación de los DSBs¹⁶.

Los mecanismos de resistencia bacteriana requieren normalmente la presencia de mecanismos mutagénicos, como la inducción de las polimerasas de reparación por TLS. Sin embargo, los mecanismos RFR y NER son independientes de los procesos de mutación y podrían relacionarse con los procesos de tolerancia fisiológica al antibiótico¹⁴⁻¹⁷.

El objetivo de este trabajo es determinar qué papel juegan estos mecanismos relacionados con la reparación de DSBs en los procesos de sensibilidad a QLS observables mediante el análisis de CMI. Para ello se ha analizado la CMI para tres QLS: NAL, CIP y norfloxacino (NOR), en mutantes de *E. coli* implicados en la reparación de DSBs.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio nueve estirpes derivadas de *Escherichia coli* K-12. El genotipo y la procedencia de estas estirpes pueden consultarse en la tabla 1. Para todas ellas se llevó a cabo un estudio de la sensibilidad a NAL, CIP y NOR mediante la determinación de la CMI utilizando el método E-test. Para el análisis y la interpretación de la prueba se siguieron las ins-

Tabla 1	Estirpes de <i>E. coli</i> K-12 utilizadas en este trabajo	
Estirpe	Genotipo	Procedencia/referencia
AB1157	<i>thr-1 araC14 leuB6(Am) Δ(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 glnX44(AS) galK2(Oc) hisG4(Oc) rfbC1 mgl-51 rpoS396(Am) rpsL31(strR) kdgK51 xylA5 mtl-1 argE3(Oc) thiE1 Rac-0 qsr'-0 F- λ-</i>	#Genética UEx/M Defais
MG1655	<i>rph-1 F- λ-</i>	#Genética UEx/J Zyskind
GY773	AB1157 <i>lexA3</i> (Ind-)	#Genética UEx
JC5519	AB1157 <i>recB21 recC22</i>	#Genética UEx/CGSC*
HRS2006	AB1157Δ(<i>srl-recA</i>)306::Tn10	#Genética UEx/18
RG729	MG1655 <i>priA::Kan</i>	#Genética UEx/B Michel
STL1336	AB1157 Δ(<i>araD-polB</i>):Ω	#Genética UEx/MF Goodman
555	BW25113 <i>uvrD::Kan5</i>	colección Keio
IC2076	AB1157 <i>gyrA904/pIUC90</i> (Ap ^R)	#Genética UEx

#Genética UEx: colección de estirpes del Área de Genética de la Universidad de Extremadura.

*CGSC: Coli Genetic Stock Center, Yale University (USA).

Estirpe	Función alterada	CMI media NAL (mg/L)*	CMI media CIP (mg/L)*	CMI media NOR (mg/L)*
AB1157	Silvestre	3 (2)	0,016 (2)	0,032 (2)
MG1655	Silvestre	2,5 (3)	0,012 (1)	0,032 (2)
JC5519		ND	<0,002 (1)	<0,016 (1)
RG729	REANUDACIÓN DE HORQUILLAS DE REPLICACIÓN (RFR)	0,094 (2)	<0,002(2)	<0,016(2)
HRS2006		0,75(2)	<0,002(2)	<0,016 (2)
GY773	INDUCCIÓN RESPUESTA SOS	1,5 (2)	0,003-0,004(2)	0,016 (2)
STL1336	REPARACIÓN POR TLS	2 (2)	0,016 (2)	0,032 (2)
555	REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER)	4 (1)	0,008 (2)	0,016 (2)

*entre paréntesis se indica el número de repeticiones realizadas.

ND: no determinada

trucciones del fabricante de las tiras E-test (Biomerieux). Los experimentos se llevaron a cabo entre febrero y septiembre de 2013 en los laboratorios de Ciencias Biomédicas de la Universidad Europea de Madrid.

A partir de aislados de placas de Mueller-Hinton incubadas 18 horas a 37°C, para cada estirpe se realizó una suspensión en suero salino ajustada con espectrofotómetro (Libra S4 Biochrom) a 530 nm para alcanzar una turbidez de 0,5 en escala McFarland. Con ayuda de una torunda estéril se sembró la suspensión bacteriana por toda la superficie de placas Mueller-Hinton depositando, a continuación, la tira de E-test utilizando unas pinzas estériles. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La CMI se interpretó tomando la concentración de la tira E-test donde se producía la intersección con el halo de inhibición del crecimiento. El perfil de sensibilidad de cada estirpe se determinó en relación a la mostrada por su estirpe silvestre isogénica que se incluyó como control del estudio. El número de determinaciones de CMI que se realizó a cada estirpe se indica en la tabla 2. Se incluyó también como control a la estirpe IC2076, mutante *gyrA* resistente a NAL (tablas 1 y 2).

RESULTADOS

La sensibilidad a QLS y los mecanismos RFR. Datos anteriores de nuestro grupo de investigación, haciendo uso de la estirpe mutante *JC5519* (*recB21 recC22*), indican que la generación de DSBs en presencia de NAL es dependiente de la actividad del complejo RecBCD⁸. La resolución de horquillas de replicación paradas (RFR) dependientes de RecBCD implican el establecimiento y la resolución de intermediarios de recombinación⁸. Este proceso requiere la proteína RecA para la formación inicial del intermediario de recombinación, así como la proteína PriA, responsable de la reanudación de la replicación una vez solucionado este intermediario⁸.

Para estudiar el papel que juega esta vía de reparación de DSBs en la sensibilidad a QLS se ha analizado la CMI a tres QLS

diferentes en las estirpes mutantes JC5519, HRS2006 y RG729, mutantes en RecBCD, RecA y PriA, respectivamente. Los resultados encontrados muestran que tanto JC5519, HRS2006 como RG729 muestran sensibilidad disminuida para las QLS empleadas (tabla 2). Estos datos indican que los procesos de RFR juegan un papel fundamental en los procesos de sensibilidad a QLS.

Relación entre la sensibilidad a QLS y la inducción de la respuesta SOS. Como se mencionó en la introducción, la presencia de DSBs es un agente inductor de la respuesta SOS, que a su vez pone en marcha otros mecanismos de reparación^{8,9,17}. Para determinar el papel de la respuesta SOS en los mecanismos de sensibilidad a QLS se estudió la CMI a las tres QLS utilizadas en el estudio (NAL, CIP y NOR) en la estirpe GY773, mutante *lexA3*. Este mutante presenta una expresión nula de la respuesta SOS aunque permite la reparación mediada por recombinación¹⁹. Como puede observarse en los resultados mostrados en la tabla 2, la CMI a NAL y NOR se reduce a la mitad en este mutante al ser comparados sus valores con los de la estirpe silvestre AB1157; en el caso del CIP, la CMI se reduce más de 4 veces. Por lo tanto, los mecanismos inducidos por la respuesta SOS parecen estar relacionados con la sensibilidad a QLS.

Dado que la proteína RecA es necesaria tanto para la reparación mediada por recombinación como para la inducción de la respuesta SOS, si comparamos los resultados obtenidos en el mutante *recA306*, en el apartado anterior, con los del mutante *lexA3* y su estirpe control, AB1157, el efecto de la ausencia de RecA sobre la CMI parece ser doble, por ausencia de respuesta SOS y de reparación por recombinación.

Entre los procesos que se inducen en la respuesta SOS y que reparan DSBs se encuentran los mecanismos de reparación TLS y de reparación por escisión de nucleótidos, NER¹⁴. Se ha analizado la relación entre algunos mutantes en estos mecanismos y el comportamiento de la CMI. En el caso de la reparación TLS, se analizó la CMI en la estirpe STL1336, mu-

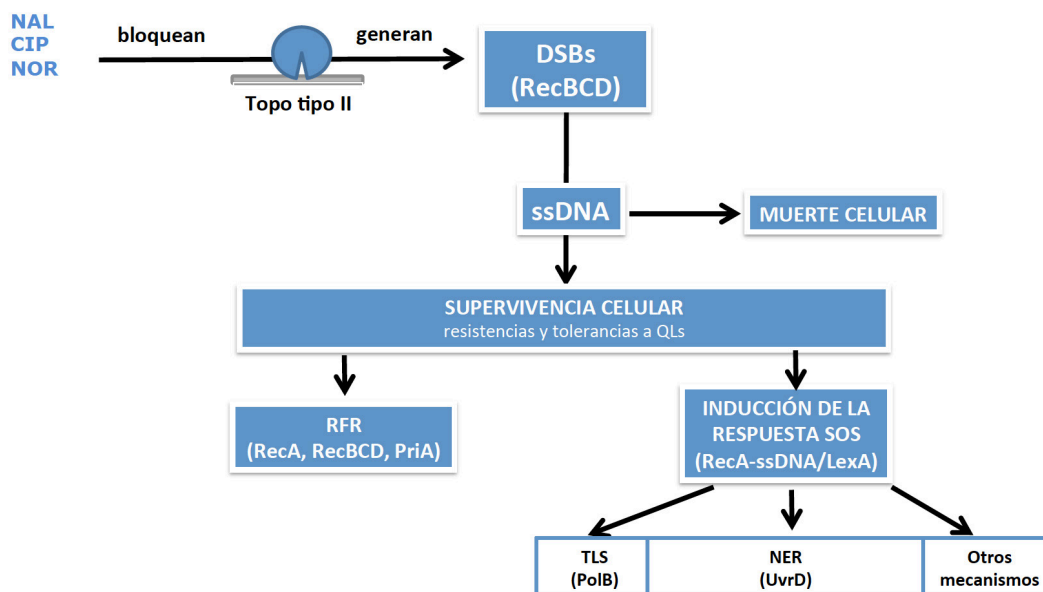


Figura 1 Mecanismos moleculares generados en presencia de QLs (NAL, CIP y NOR) derivados de la presencia de DSBs y que estarían implicados en los mecanismos de muerte y supervivencia a QLs.

tante en el gen *polB*, que codifica una de las tres ADN polimerasas translesionales que tiene *E. coli*. Los resultados obtenidos muestran valores de CMI similares a los de su estirpe silvestre, AB1157 (tabla 2). Similares resultados se obtuvieron cuando se analizó la estirpe 555, mutante en el gen *uvrD* implicado en el mecanismo NER (tabla 2). Los datos encontrados indican que la presencia de estas mutaciones no estaría relacionada con los mecanismos de sensibilidad a QLs.

DISCUSIÓN

Debido al incremento en el número de bacterias gramnegativas resistentes a QLs detectado en los últimos años en muestras clínicas de pacientes hospitalizados y comunitarios, resulta imprescindible la búsqueda de métodos que logren inhibir la capacidad de desarrollar resistencias para intentar disminuir la viabilidad de estos organismos. Para ello, urge indagar qué cambios fisiológicos sufre la bacteria cuando se expone al agente farmacológico que ayudan a sobrevivir en esas condiciones. A día de hoy, existe gran desconocimiento de los mecanismos moleculares que determinan las resistencias a antibióticos. Un mejor conocimiento de estos mecanismos probablemente mejoraría la terapéutica y evitaría algunos fenómenos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Además, en nuestra experiencia de equipo multidisciplinar, hemos observado que con frecuencia las técnicas y el manejo de estirpes difieren entre los protocolos de investigación básica y la realidad de la práctica clínica. Por lo tanto, resulta necesaria una estandarización de métodos y protocolos para que los resultados de la investigación básica sean más fáciles de transferir a un contexto clínico. Por esta razón, en este estudio se ha plan-

teado una aproximación experimental clínica en un contexto de investigación básica.

Muchos de los fenómenos de resistencia a QLs se deben a mutaciones en los genes que codifican las enzimas del sistema SOS, alteraciones en la permeabilidad de las membranas bacterianas y del flujo activo del antibiótico desde las células bacterianas al exterior². También se han descrito casos donde la viabilidad de la bacteria se ve alterada sin verse necesariamente acompañada de un cambio genotípico (como es el caso de la tolerancia fisiológica a antibióticos)²⁰. Sin embargo, aún no están completamente dilucidados los mecanismos moleculares desencadenados tras la exposición a QLs.

En nuestro caso, hemos analizado el papel que juega la presencia de DSBs en la sensibilidad a QLs, considerando mecanismos de reparación que participan en la reparación de estas roturas. En la figura 1 hemos intentado simplificar estos pasos y explicar cómo conducirían al aumento de la supervivencia celular. Los DSBs generados por acción de las QLs serían convertidos en ssDNA. Estos ssDNA, facilitarían tanto los mecanismos encaminados a mantener la supervivencia bacteriana como los mecanismos de muerte celular^{11,12,21}.

En presencia de la proteína RecA, su unión a los ssDNA pondría en marcha mecanismos de reparación del ADN. En nuestras condiciones experimentales hemos detectado que serían reparados preferiblemente por la vía RecBCD, siendo también necesaria la proteína PriA (tabla 2, estirpes JC5519, HRS2006 y RG729).

Por otro lado, la unión de RecA a ssDNA también resulta en la inducción de la respuesta SOS. La importancia de estudiar el papel de mecanismos de reparación inducidos por la

respuesta SOS, como la TLS, radica en que son mecanismos inductores de mutación que podrían desencadenar la aparición de estirpes resistentes. En referencia al papel de la reparación por TLS en la respuesta a Qs en *E. coli*, podemos decir que la ADN polimerasa II (PolB) no interviene en este mecanismo (tabla 2, estirpe STL1336). Se desconoce si otras proteínas como la ADN polimerasa IV (DinB) o la ADN polimerasa V (UmuCD₂), también implicadas en mecanismos de TLS, pudieran estar implicadas en un descenso de la sensibilidad a Qs.

Respecto al papel de la helicasa UvrD, nuestros datos sugieren que mutaciones en el gen *uvrD* no conducen a un descenso significativo de las CMI (tabla 2, estirpe 555). Existen controversias en la literatura sobre si la ausencia de UvrD, implicada en la reparación NER, conduce a una pérdida de viabilidad frente a Qs. Nuestros datos coinciden con los reportados por Khodursky et al, quienes no detectan cambios significativos en la viabilidad de *E. coli* en presencia de NOR²², aunque difieren de los presentados recientemente por Theodore et al⁷. Una idea que apoya nuestro resultado es que mutaciones en *uvrD* no afectan a la reversibilidad de horquillas de replicación paradas en presencia de Qs y, en nuestro caso, esas horquillas y los DSBs resultantes serían preferiblemente reparados vía PriA. Dada la controversia en los resultados es necesaria una estandarización de los protocolos de determinación de las CMI con el fin de facilitar, en un futuro, la transferencia de estos datos a la práctica clínica.

Los resultados obtenidos en éste y otros estudios de investigación básica mencionados en este texto convierten a las proteínas RecBCD, PriA y LexA y, sobre todo, a RecA en buenas dianas terapéuticas para diseñar estrategias sinérgicas con Qs. Actualmente hay en marcha diferentes ensayos para la búsqueda de moléculas inhibitoras de RecBCD y RecA. En referencia a RecBCD, hay ensayos con la molécula ML328, inhibidor dual de RecBCD y AddAB (homólogo de RecBCD en grampositivos). ML328 constituye un nuevo tipo de moléculas que, probada su eficacia, constituiría un nuevo tipo de antibióticos de amplio espectro²³. Recientemente se ha descubierto también un inhibidor de RecA que atenúa la respuesta SOS en *E. coli*²⁴ y la suramina, un potente y selectivo inhibidor de RecA en *Mycobacterium tuberculosis*²⁵. Otras estrategias van dirigidas al silenciamiento de RecA mediante ARN de interferencia²⁶.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras del estudio agradecen a Gema González-Pardo la ayuda técnica prestada. La estirpe 555, de la colección Keio, ha sido generosamente donada por el Dr. Enrique Viguera, de la Universidad de Málaga. El resto de estirpes corresponden a la colección bacteriana del Área de Genética de la Universidad de Extremadura.

FINANCIACION

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda 12UEM2012

proporcionada por la Escuela de Doctorado e Investigación de la Universidad Europea de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

1. Soriano F. Selection of antibiotic-resistant bacteria: microbiological and pharmacological factors. *Med Clin (Barc)* 2001; 117:632-6.
2. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2ª ed. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2003.
3. Wolfson JS, Hooper DC, Shih DJ, McHugh GL, Swartz MN. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* strain exhibiting partial tolerance to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:705-9.
4. Wiegand I, Marr AK, Breidenstein EB, Schurek KN, Taylor P, Hancock RE. Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:3810-3.
5. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:385-92.
6. Horst JP, Wu TH, Marinus MG. *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol* 1999; 7:29-36.
7. Theodore A, Lewis K, Vulic M. Tolerance of *Escherichia coli* to fluoroquinolone antibiotics depends on specific components of the SOS response pathway. *Genetics* 2013; 195(4):1265-76.
8. Michel B, Boubakri H, Baharoglu Z, LeMasson M, Lestini R. Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6:967-80.
9. Kelley WL. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Mol Microbiol* 2006; 62:1228-38.
10. Malik M, Hoatam G, Chavda K, Kerns RJ, Drlica K. Novel approach for comparing the abilities of quinolones to restrict the emergence of resistant mutants during quinolone exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:149-56.
11. Newmark KG, O'Reilly EK, Pohlhaus JR, Kreuzer KN. Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene* 2005; 356:69-76.
12. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. *American Society for Microbiology (ASM)*; 1995.
13. Erental A, Kalderon Z, Saada A, Smith Y, Engelberg-Kulka H. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. *MBio* 2014; 5:e01426-14.
14. Kohiyama M, Contremoulins V, Baudin X. Trashing of single-stranded DNA generated during processing of arrested replication fork in *E. coli*. *J Mol Biol* 2013; 425:4837-44.
15. Boubakri H, de Septenville AL, Viguera E, Michel B. The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units in vivo. *EMBO J* 2010; 29: 145-57.
16. Wolfson JS, Hooper DC, McHugh GL, Bozza MA, Swartz MN. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both

- quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1938-43.
17. Dörr T, Lewis K, Vulić M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics* 2009; 5:e1000760.
 18. González-Soltero MR. Replicación inducida por estrés térmico en cromosoma y plásmidos de *Escherichia coli*. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura. 2007. Dirección URL: <<http://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/1264.pdf>>
 19. Mount DW, Low KB, Edmiston SJ. Dominant mutations (*lex*) in *Escherichia coli* K-12 which affect radiation sensitivity and frequency of ultraviolet light-induced mutations. *J Bacteriol* 1972; 112:886-93.
 20. Hansen S, Lewis K, Vulić M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2718-26.
 21. Grompone G, Ehrlich SD, Michel B. Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. *Mol Microbiol* 2003; 48:845-54.
 22. Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem* 1998; 273:27668-77.
 23. Bannister TD, Nair R, Spicer T, et al. ML328: A Novel Dual Inhibitor of Bacterial AddAB and RecBCD Helicase-nuclease DNA Repair Enzymes. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). 2010-2012.
 24. Sengupta S, Bandyopadhyay S. De novo design of potential RecA inhibitors using multi objective optimization. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2012; 9:1139-54.
 25. Nautiyal A, Patil KN, Muniyappa K. Suramin is a potent and selective inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response: RecA as a potential target for antibacterial drug discovery. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1834-43.
 26. Sharma V, Sakai Y, Smythe KA, Yokobayashi Y. Knockdown of *recA* gene expression by artificial small RNAs in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 430:256-9.