

REVISIÓN

Las proteasas de serina bacterianas y su implicación en la fisiopatología de la infección



Gerardo García-González, Gloria María González y José P. Palma-Nicolás*

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Departamento de Microbiología, Monterrey, Nuevo León, México

Recibido el 28 de noviembre de 2018; aceptado el 3 de febrero de 2019

Disponible en Internet el 9 de marzo de 2019

PALABRAS CLAVE

Proteasas de serina;
Virulencia;
Infección bacteriana

Resumen Las proteasas de serina son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, responsables de múltiples e importantes procesos biológicos. Durante las infecciones bacterianas los patógenos secretan y usan sus proteasas de serina como factores de virulencia para combatir contra el huésped, a través de diversos efectos como la desorganización de tejidos, la proteólisis de efectores inmunológicos o la inactivación de componentes relevantes para la fisiología del huésped; sin embargo, desde hace algunos años se ha observado que las proteasas de serina podían modular procesos fisiológicos por un mecanismo altamente específico, a través de la activación de los receptores activados por proteasas. En este artículo resumimos el conocimiento reciente sobre las proteasas de serina bacteriana y su relevancia en la fisiopatología de la infección, y destacamos la oportunidad de nuevas intervenciones antimicrobianas basadas en la inhibición de la interacción receptores activados por proteasas-proteasa.

© 2019 AEBM-ML, AEFA y SEQC-ML. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Serine proteases;
Virulence;
Bacterial infection

Implication of bacterial serine proteases in the physiopathology of the infection

Abstract Serine proteases are enzymes widely distributed in nature, and are responsible for multiple and important biological processes. During bacterial infection, pathogens secrete and use their serine proteases as virulent factors to combat against the host, through diverse mechanisms, such as tissue disruption, proteolysis of immunological effectors or inactivation of relevant components for the host physiology. However, some years ago it was observed that serine proteases could modulate physiological processes by a highly specific mechanism, through

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: jose.palman@uanl.mx, bq_jprisco@yahoo.com (J.P. Palma-Nicolás).

the activation of protease activated receptors (PARs). In this paper, we review recent knowledge about bacterial serine proteases and their relevance in the pathophysiology of infection. The opportunity for new antimicrobial interventions based on the inhibition of PAR-protease interaction, is also highlighted.

© 2019 AEBM-ML, AEFA y SEQC-ML. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las proteasas son enzimas que hidrolizan el enlace peptídico, con una vasta diversidad de implicaciones biológicas, desde la simple degradación de proteínas hasta la regulación de finos procesos fisiológicos¹. Dentro de las enzimas proteolíticas las proteasas de serina comprenden más de un tercio de todas las enzimas proteolíticas conocidas, siendo el grupo más extenso². Las proteasas de serina son enzimas que reciben su nombre basándose en el aminoácido nucleofílico serina (Ser) localizado en su sitio activo, responsable de llevar a cabo la escisión del enlace peptídico, y el cual está acompañado típicamente por los aminoácidos aspartato e histidina (His)².

Las proteasas de serina tienen efectos directos e indirectos en la patogénesis del proceso infeccioso³. Lantz et al. en 1997 mencionan que las proteasas son consideradas factores de virulencia cuando estas actúan sobre el tejido del huésped al dañar las células y proteínas del mismo; al inducir la activación de proteasas endógenas del huésped que tienen como repercusión daño al propio organismo, al inactivar distintos mediadores del sistema inmune importantes para la defensa del huésped, y finalmente, por ser proteínas necesarias para la producción de otros factores de virulencia del microorganismo⁴. En la [tabla 1](#) se resumen las proteasas de serina producidas por algunos microorganismos patógenos de importancia clínica, y en la cual se observa cómo algunas de ellas son conservadas entre diferentes especies, con la particularidad de presentar efectos específicos asociados a su patogénesis.

Aunque en el pasado se ha planteado la importancia que representan las proteasas de serina en la virulencia de las infecciones bacterianas, desafortunadamente la investigación en este sentido sigue siendo limitada⁴, por lo que esta revisión tiene como objetivo revisar la actividad de las proteasas de serina bacterianas conocidas y las implicaciones fisiopatológicas que estas representan para el huésped, y a su vez destacar que el conocimiento básico ha servido para idear nuevas estrategias terapéuticas, de manera que se aliente la investigación en este campo.

Clasificación de las proteasas

Las enzimas con actividad proteolítica se clasifican en 2 grandes grupos de acuerdo con la posición donde se lleva a cabo la hidrólisis del enlace peptídico en el sustrato, siendo las endoproteasas aquellas que rompen la estructura de las proteínas en los enlaces internos de la secuencia

de aminoácidos, mientras que las exoproteasas realizan la hidrólisis en alguno de los extremos de la proteína blanco¹.

Otra forma en la que se han catalogado las proteasas se fundamenta en el mecanismo de acción con el que llevan a cabo la escisión del enlace peptídico, distinguiéndose 7 tipos de proteasas, según el residuo de aminoácido catalítico en el sitio de acción, agrupados en 2 tipos de mecanismos: las que activan una molécula de agua responsable de hacer un ataque nucleofílico y poder hidrolizar el enlace peptídico (metalo-, aspartil-, glutamil- y asparagin- proteasa), y en las que el residuo aminoacídico realiza el ataque nucleofílico para unir de manera covalente a la enzima con la proteína sustrato, liberando a su vez la primera fracción de la proteína, y activando por acción del intermediario a una molécula de agua que hidrolice la unión proteasa-sustrato, liberando la segunda fracción (serin-, cisteín y treonin- proteasas).

En 1993 Barrett y Rawlings organizaron y clasificaron todas las proteasas de serina conocidas en una base de datos llamada MEROPS: la base de datos de enzimas proteolíticas, sus sustratos e inhibidores⁵, en la que estas enzimas se agrupan en clanes de acuerdo con su mecanismo de catálisis y la similitud de su estructura terciaria, y posteriormente en familias, basándose en la similitud de su secuencia primaria. Actualmente en la base de datos MEROPS se encuentran 334.149 secuencias relacionadas con proteasas de serina, de las que existen identificadas 1.703, las cuales son agrupadas en 15 clanes y 53 familias⁵.

Hablando exclusivamente de proteasas de serina, estas son reconocidas por poseer un residuo de Ser en su sitio activo, además de un aspartato y una His². De acuerdo con la base de datos MEROPS los clanes PA, SB, SC y SK son las 4 agrupaciones que se categorizan como proteasas de serina al poseer esta tríada catalítica², sin embargo, esta tríada de aminoácidos puede variar en el sitio activo dependiendo del clan de proteasas de serina del que se trate: los residuos Ser-Lis (lisina) en el clan SE y SM, Ser-Lis/His en SF, His-Ser-His en SH o Ser-His-Glu (glutamina) en SN⁶. Los clanes SC, PA y SE son los que ocupan los primeros 3 lugares respectivamente en cuanto a la cantidad de secuencias relacionadas, sin embargo son los clanes PA, SC y SB donde existe la mayor cantidad de proteasas de serina identificadas⁵.

De acuerdo con la base de datos MEROPS en las bacterias existen 194.093 secuencias de proteasas de serina pertenecientes a casi todos los clanes, con ausencia en algunas familias⁵. Los clanes de proteasas de serina que ocupan los primeros 6 lugares en cuanto a la cantidad de secuencias conocidas de estas enzimas son los clanes SC, SE, SK, SF, PA

Tabla 1 Proteasas de serina bacterianas con implicaciones en la virulencia

Efecto biológico		Bacteria	Proteasa	Clan	MEROPS ID
Daño tisular	Daño al citoesqueleto	ECEA	Pet	PA	S06.002
		ECEH	EspP	PA	S06.002
		<i>Shigella flexneri</i>	SigA	PA	S06.004
		ECUP	Sat	PA	S06.004
		ECUP	PicU	PA	S06.005
		ECEP	EspC	PA	S06.010
	Actividad citotóxica	<i>Vibrio cholerae</i>	VesC	PA	S01.516
		<i>Shigella flexneri</i>	SepA	PA	S06.013
		<i>Proteus mirabilis</i>	Pta	SB	—
	Degradación de uniones estrechas	<i>Proteus mirabilis</i>	DegQ	PA	S01.274
		<i>Helicobacter pylori</i>	HtrA	PA	S01.500
		<i>Campylobacter jejuni</i>	HtrA	PA	S01.500
		ECUP	Sat	PA	S06.004
	Muerte celular	ECUP	Vat	PA	S06.003
		ECUP	Sat	PA	S06.004
		ECEP	EspC	PA	S06.010
Evasión del sistema inmune	Alteraciones en la quimiotaxis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MucD	PA	S01.453
		<i>Helicobacter pylori</i>	HtrA	PA	S01.500
		<i>Vibrio cholerae</i>	VesC	PA	S01.516
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	SpyCEP	SB	S08.027
		<i>Streptococcus agalactiae</i>	CspA	—	—
	Degradación de receptores de leucocitos	ECUP	Sat	PA	S06.004
		ECEA	Pic	PA	S06.005
	Degradación de factores del complemento	<i>Shigella flexneri</i>	Pic	PA	S06.005
		ECEH	EspP	PA	S06.002
	Degradación de péptidos antimicrobianos	<i>Aeromonas sobria</i>	AspA	SB	S08.125
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PrtA	SB	S08.064
	Degradación de inmunoglobulinas	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Proteasa de IgA1	PA	S06.001
		<i>Neisseria meningitidis</i>	Proteasa de IgA1	PA	S06.001
		<i>Haemophilus influenzae</i>	Proteasa de IgA1	PA	S06.001
Degradación de metabolitos	Degradación del factor v de la coagulación	ECEH	EspP	PA	S06.002
		ECUP	Sat	PA	S06.004
		ECUP	PicU	PA	S06.005
		ECEA	Pic	PA	S06.005
		<i>Shigella flexneri</i>	Pic	PA	S06.005
		ECEP	EspC	PA	S06.010
	Degradación de mucina	<i>Staphylococcus aureus</i>	SplA	PA	S01.503
		ECEA	Pic	PA	S06.005
		<i>Shigella flexneri</i>	Pic	PA	S06.005
	Degradación de	ECEA	Pet	PA	S06.002
		ECEP	EspC	PA	S06.010
	Degradación de pepsina	ECEA	Pet	PA	S06.002
		ECEH	EspP	PA	S06.002
		ECEP	EspC	PA	S06.010
Regulación de virulencia	Replicación intracelular	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MarP	PA	S01.513
		<i>Salmonella entérica</i>	ClpXP	SK	S14.001
		<i>Listeria monocytogenes</i>	ClpP	SK	S14.001
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ClpP	SK	S14.001
		<i>Escherichia coli</i>	DegP	PA	S01.273
		<i>Listeria monocytogenes</i>	HtrA	PA	S01.364
	Adaptación al huésped	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	HtrA	PA	S01.447
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	HtrA	PA	S01.447
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PepD	PA	S01.494
		<i>Campylobacter jejuni</i>	HtrA	PA	S01.500
		<i>Burkholderia cepacia</i>	HtrA	PA	—

y SJ respectivamente⁵, encontrando en estos a algunas de las subfamilias de proteasas de serina, con una alta relevancia en cuanto a su implicación en la patogénesis bacteriana, como las proteasas HtrA (PA), Clp (SK) y Lon (SJ), por mencionar algunas³.

Las proteasas de serina como factores de virulencia

Los microorganismos patógenos tienen la capacidad de generar daño en el huésped de diferentes formas, ya sea alterando la arquitectura del tejido o la fisiología normal del organismo. Dentro de las proteasas de serina de origen bacteriano se ha demostrado cómo algunos patógenos tienen la capacidad de alterar el epitelio, producto de la citotoxicidad dependiente de la acción de sus proteasas (fig. 1 A). Las proteasas SepA de *Shigella flexneri*, VesC de *Vibrio cholerae* y Pta de *Proteus mirabilis* son ejemplos de proteasas de serina que han mostrado actividad citotóxica en células epiteliales, en los que si bien se observa un desprendimiento celular, se desconoce el mecanismo de acción o el blanco específico sobre el cual actúan estas proteasas^{7,8}. Por su parte, en *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) se describió cómo la proteasa EspP ocasiona daños al citoesqueleto de actina, mientras que las proteasas Pet, EspC y SigA de los enteropatógenos *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA), *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) y *S. flexneri*, respectivamente, también demostraron la capacidad de alterar el epitelio, evidenciando en estos casos particulares que su blanco se encuentra en la proteína fodrina, la cual mantiene la integridad del citoesqueleto, lo que sugiere la acción de estas enzimas como uno de los mecanismos involucrados en las alteraciones intestinales que se observan en los cuadros diarreicos causados por estos microorganismos, aunque su actividad en modelos *in vivo* no ha sido demostrada^{9,10}. Este tipo de alteraciones celulares también se ha observado en el epitelio urinario a causa de *Escherichia coli* uropatógena (ECUP) con la producción de las proteasas Sat y PicU, las cuales comparten la fodrina como sustrato, generando un efecto citotóxico en el epitelio¹¹ (fig. 1 B).

Las proteasas de serina también tienen la capacidad de inducir la muerte celular (fig. 1 c) o la rotura de las uniones intercelulares en el epitelio (fig. 1 D). Diferentes eventos de muerte celular han sido observados en modelos de infección, siendo la muerte celular por necrosis y apoptosis la relacionada con la proteasa EspC de ECEP en células HEP-2 y HT-29¹², y la autofagia en el caso de las enzimas Sat y Vat de ECUP en células de epitelio humano de vejiga (CRL-1749) y riñón (CRL-1573)^{8,13}. En ambos casos la evidencia fue producto de ensayos *in vitro*, por lo que su confirmación en modelos *in vivo* son necesarios para determinar la relevancia de estas enzimas en el contexto de la infección¹⁴. Por su parte, la rotura de las uniones intercelulares es un efecto que se ha evidenciado en distintas líneas celulares por acción de proteasas de serina del tipo HtrA en algunos microorganismos como *Helicobacter pylori* (MKN-28), *Campylobacter jejuni* (T84) y *P. mirabilis* (MKN-28/NCI-N87) al degradar la E-cadherina, mientras que UPEC rompe las uniones estrechas zonula occludens 1 (ZO-1), zonula occludens 3 (ZO-3) y ocludina en monocapas de células Caco-2/TC7. En ambos casos, logrando la invasión

del tejido, estableciéndose en el espacio intercelular y permitiendo la replicación de los microorganismos^{13,15-17}.

La degradación de múltiples sustratos por la actividad proteolítica de estas enzimas es una posible implicación en la virulencia de los microorganismos productores de proteasas. Uno de los ejemplos de mayor relevancia en este sentido, es la actividad que desempeñan las proteasas EspP de ECEH y Pic de *S. flexneri* en la alteración de la cascada de la coagulación al degradar al factor V de la misma, lo que se asocia a la presencia de hemorragia en los cuadros diarreicos ocasionados por estos enteropatógenos, sin embargo estas evaluaciones no han sido demostradas en ensayos *in vivo*^{8,18}. Este efecto de interrumpir el proceso de coagulación dependiente de la actividad de proteasas de serina se ha visto replicado en otros microorganismos como ECEA, ECEP y ECUP gracias a las proteasas Pic, EspC y Sat/PicU, respectivamente (fig. 2 A)^{19,20}. Por otro lado, están aquellos microorganismos con la capacidad de establecerse en las mucosas en función de la degradación de la mucina, como hacen ECEA y *S. flexneri* en la mucosa intestinal por acción de la proteasa Pic o *Staphylococcus aureus* en el epitelio pulmonar gracias a SplA, como se mostró en un cultivo celular con células CalU-3^{21,22} (fig. 2 B).

Entre otros procesos menos estudiados que alteran la fisiología del organismo y que dependen de proteasas de serina están la degradación de la hemoglobina (fig. 2 C) y de la pepsina (fig. 2 D) por diferentes proteasas de algunos patotipos de *E. coli*, entre las que resaltan Pet (ECEA), EspC (ECEP) y EspP (ECEH), sin embargo, estas implicaciones fisiopatológicas son meramente teóricas, dado que no existe evidencia de su relevancia en modelos *in vivo*^{8,19,23}.

Proteasas de serina en la evasión de la respuesta inmune

Las proteasas de serina son enzimas que contribuyen a la virulencia de algunos patógenos al favorecer la evasión de la respuesta inmune, interfiriendo tanto a niveles de la inmunidad innata, como de la inmunidad adaptativa. Estas alteraciones van desde la degradación de compuestos antimicrobianos, como en el caso de *Streptococcus pneumoniae*, quien degrada la apolactoferrina por acción de la enzima PrtA²⁴ (fig. 3 A), hasta eventos de defensa más sofisticados como la inactivación de la cascada del complemento, en la que la destrucción de las proteínas C3, C3b y C5 por EspP de ECEH, o las alteraciones en C5 por la proteasa ASP de *Aeromonas sobria* favorecen la sobrevivencia^{25,26} (fig. 3 B).

Por otro lado, dentro la inmunidad celular se ha descrito cómo las proteasas de serina de algunos patógenos pueden degradar algunas moléculas de superficie (fig. 3 C) o interferir en el reclutamiento de células efectoras (fig. 3 D). En el primer caso ECEA y *S. flexneri* comparten la función de la proteasa Pic en la degradación de los receptores CD43, CD93 y CD162 expresados en linfocitos, neutrófilos, monocitos y otras células del linaje mieloide²⁷, mientras que la proteasa Sat de ECUP degrada la proteína de adhesión celular LFA-1 en linfocitos^{11,19}; en ambos casos esto provoca alteraciones en el proceso de adhesión celular, trans migración a los tejidos o comunicación celular. Por otra parte, la quimiotaxis es un fenómeno que se ha demostrado que puede ser regulado por la actividad de proteasas de serina de algunos

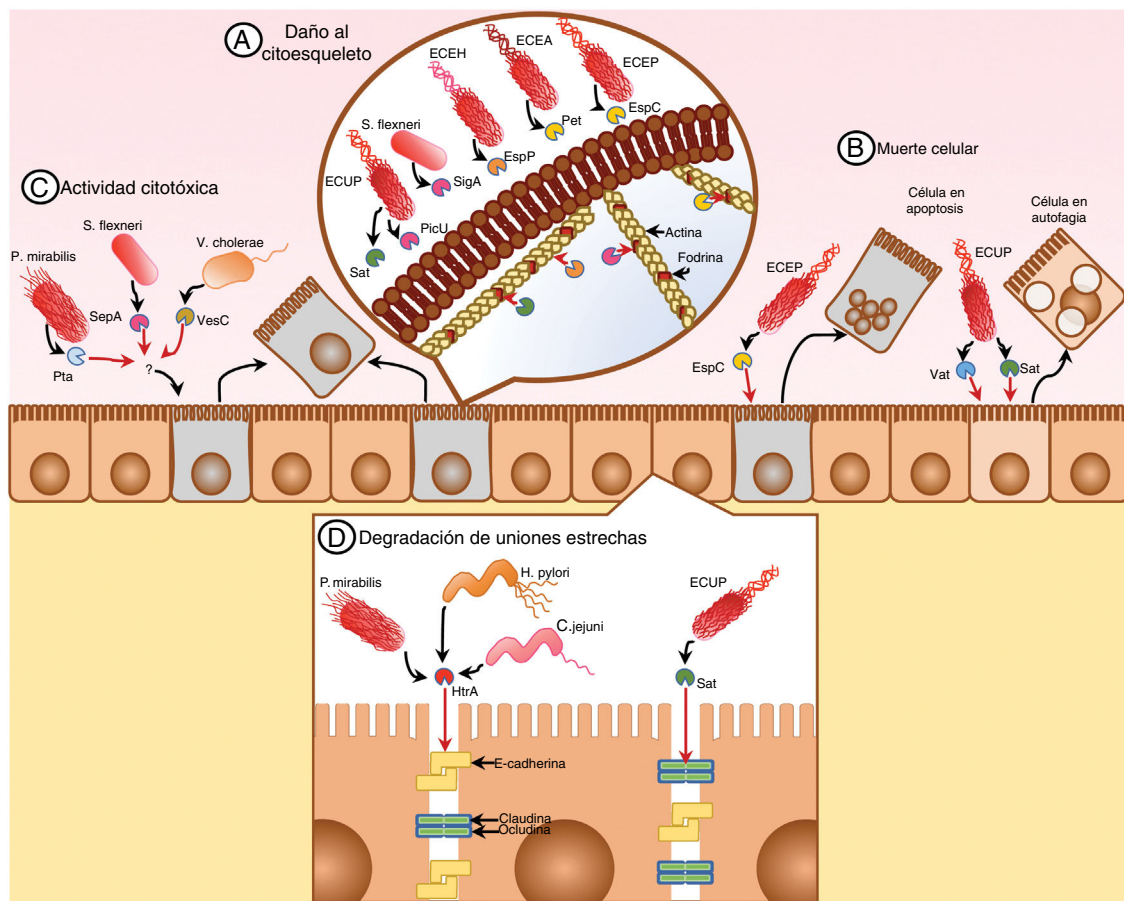


Figura 1 Efecto de las proteasas de serina sobre la arquitectura del tejido. Los daños al tejido causados por las proteasas de serina de diferentes patógenos tienen diferentes mecanismos de acción, como los que degradan miembros esenciales del citoesqueleto desregulando la morfología celular como en el caso de ECEP, ECEA, ECEH, ECUP y *S. flexneri* (A), o inducen muerte celular, tal es el caso de ECEP y ECUP (B). Por otro lado, se encuentran aquellos microorganismos que también inducen un efecto citotóxico en células epiteliales, como en *P. mirabilis*, *S. flexneri* y *V. cholerae* (C). Finalmente, en un grupo de microorganismos se ha encontrado la capacidad de generar desarreglos en el epitelio al degradar las uniones estrechas intercelulares; estos microorganismos son *H. pylori*, *C. jejuni*, *P. mirabilis* y ECUP (D).

microorganismos, induciendo el reclutamiento como lo hacen las proteasas HtrA de *H. pylori* y VesC de *V. cholerae* al inducir la producción de interleucina 8 (IL-8)^{28,29}, sin embargo, existen proteasas de serina como SpyCEP de *Streptococcus pyogenes*, CspA de *Streptococcus agalactiae* y MucD de *Pseudomonas aeruginosa* cuya función es la degradación de quimiocinas como CXCL1, CXCL3, CXCL6, CXCL7 y CXCL8 (IL-8) evitando el reclutamiento celular y favoreciendo su sobrevivencia en el tejido³⁰⁻³².

Los efectos sobre la inmunidad humoral, en los que se ha involucrado a las proteasas de serina de algunos patógenos, incluyen la degradación de los anticuerpos, en los que *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* son reconocidos por su actividad proteolítica contra la inmunoglobulina A (IgA) secretora³³ (fig. 3 E). Algunas de las observaciones que sugieren esta función son el hecho de que los patógenos productores de esta enzima tienen una gran especificidad por colonizar tejidos mucosos, la presencia de esta proteasa en el tejido de individuos infectados o el porqué en el suero existen inhibidores para esta proteasa³⁴, además de saber que los fragmentos de unión

al antígeno (Fab) obtenidos de la degradación de IgA puede enmascarar algunos epítopes de microorganismos patógenos, evitando su reconocimiento por el sistema inmune³⁵.

Reconocimiento específico de las proteasas de serina por los receptores activados por proteasas

Las proteasas de serina cumplen con funciones de regulación específica más allá de la degradación proteolítica generalizada de algunas proteínas, actuando como iniciadores de vías de señalización al activar proteolíticamente receptores celulares específicos, denominados receptores activados por proteasas (PAR)³⁶.

Los PAR son una subfamilia de 4 miembros de receptores acoplados a proteínas G (RAPG), los cuales se constituyen de 7 dominios transmembranales, unidos por 3 crestas intra y extracelulares, con un dominio carboxilo terminal intracelular y una secuencia amino terminal extracelular³⁷. Estos receptores son diferencialmente expresados en las células

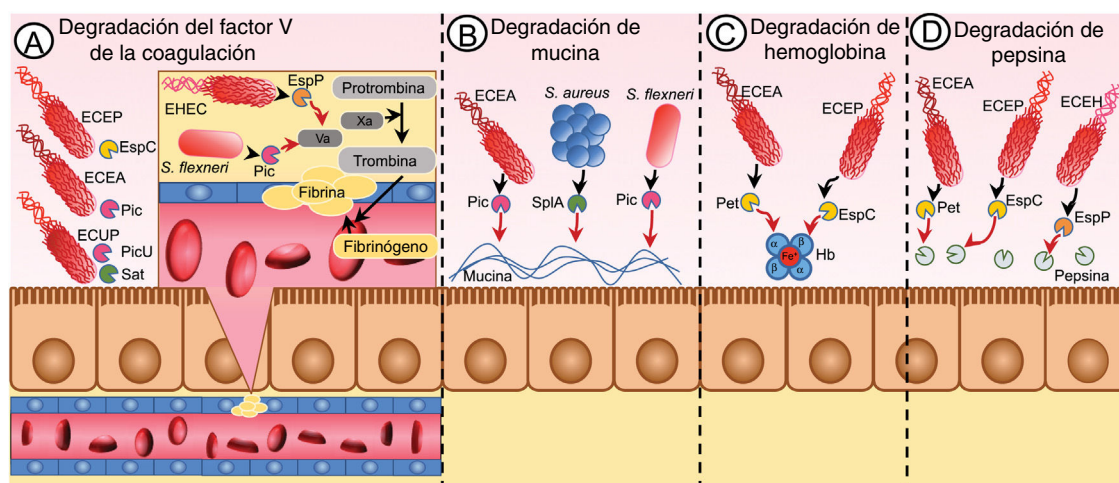


Figura 2 Las proteasas de serina bacterianas alteran la fisiología normal del organismo degradando sustratos esenciales. Algunos patógenos cuentan con sustratos blanco de sus proteasas de serina, cuya relevancia en el organismo es tan alta que su reducción repercute en el correcto funcionamiento del organismo. Algunos patógenos como ECEH, *S. flexneri*, ECEP, ECEA y ECUP son conocidos por degradar el factor v de la coagulación, lo cual influye en el cuadro clínico de las infecciones causadas por estos patógenos (A). ECEA, *S. flexneri* y *S. aureus* degradan la mucina secretada por el epitelio para favorecer su colonización en el mismo (B). Otras bacterias hacen uso de sus proteasas de serina para obtener nutrientes como en el caso de ECEA y ECEP al degradar la hemoglobina para liberar el hierro y utilizarlo en su metabolismo (C). Finalmente, existen sustratos que son conocidos por ser degradados por las proteasas de serina de algunos microorganismos, pero cuya eliminación no se ha correlacionado con un mecanismo de patogenicidad; sin embargo, su eliminación no debe ser irrelevante; ejemplo de ello es la degradación de la pepsina por ECEA, ECEP y ECEH (D).

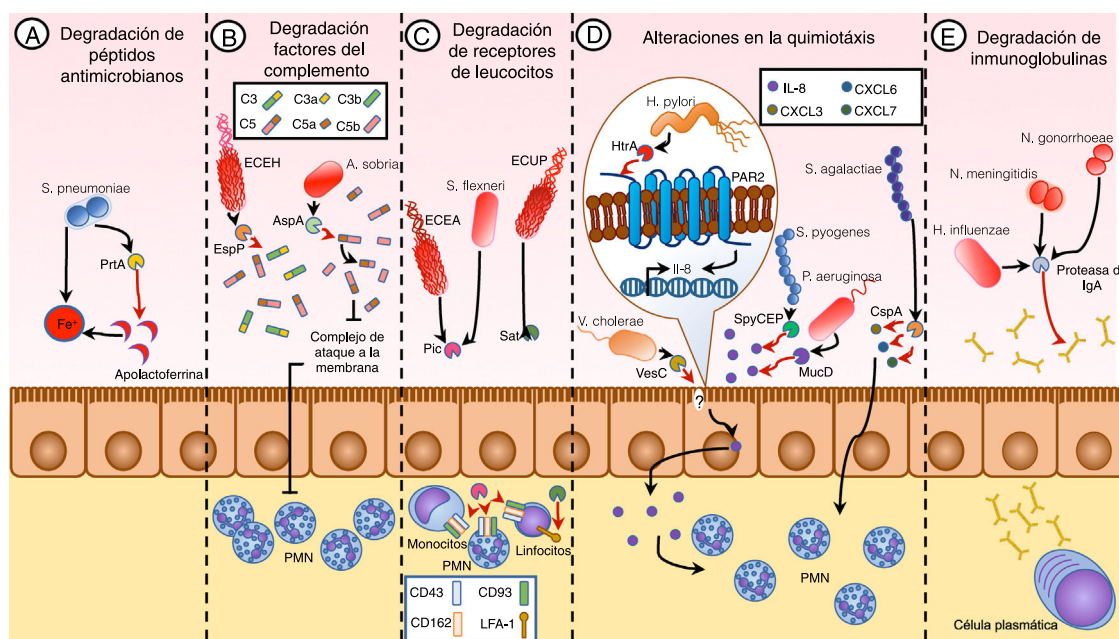


Figura 3 Las proteasas de serina como mecanismos de evasión inmunológica. Los mecanismos de evasión asociados a las proteasas de serina de patógenos comprenden diferentes vías, como la inhibición de la inmunidad innata al degradar péptidos antimicrobianos, como en el caso de *S. pneumoniae* (A). Además, se ha visto que la evasión del sistema de complemento puede ser desregulada por las proteasas de serina de algunos patógenos como ECEH y *A. sobria* (B). Otros patógenos como *S. flexneri*, ECEA y ECUP alteran la funcionalidad de las células del sistema inmune al degradar algunos receptores de membrana que median su interacción con otras células (C). La alteración de la quimiotaxis de células del sistema inmune, como en el caso de las proteasas de los patógenos *H. pylori*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* y *S. agalactiae*, puede ser estimulada para ser inducida o, por el contrario, la puede inhibir al degradar algunas quimiocinas (D). En el caso de la inmunidad humoral existen reportes que evidencian que *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* poseen una serín proteasa capaz de degradar los efectos de la IgA secretora (E).

del organismo humano, presentando una diversidad de funciones dependientes del receptor, de la célula en la que se expresen o del tipo de estímulo que los active³⁸. Clásicamente se reconoce la trombina como el activador del receptor PAR1, aunque ahora se sabe que junto con el receptor PAR3 y PAR4 también pueden ser activados por la tripsina o la catepsina G, mientras que la proteasa modelo en la activación del PAR2 es la tripsina, aunque también la tripsina y el factor Xa de la coagulación presentan el mismo efecto³⁹.

El mecanismo por el cual ocurre la activación de estos receptores consiste en el reconocimiento de una secuencia específica, localizada en el dominio amino terminal extracelular, la cual una vez ubicada es escindida y expone un nuevo dominio aminoterminal, el cual es reconocido por la segunda cresta extracelular del receptor, iniciando su activación³⁷. Los 4 miembros de la familia PAR cuentan con distintas secuencias de reconocimiento, lo que las hace selectivas para ser activados por ciertos tipos de proteasas de serina. El PAR1, el cual es activado por la trombina, cuenta con la secuencia de reconocimiento R⁴¹↓S⁴²FLLRN, la cual al ser hidrolizada expone la secuencia de activación SFLLRN. Por su parte, el PAR2 que es activado por la tripsina cuenta con la secuencia R³⁴↓S³⁵LIGKV. En el caso del PAR3 la trombina realiza el corte proteolítico en la posición K³⁸↓T³⁹FRGAP, y en el PAR4, tanto la trombina como la tripsina entre la R⁴⁷↓G⁴⁸YPGQV⁴⁰.

Actualmente se sabe que algunos microorganismos patógenos emplean sus proteasas de serina para la activación de los receptores PAR, generando con ello una serie de eventos con repercusión en el proceso de infección (fig. 4). Dentro de los estudios realizados en bacterias se observa una tendencia en el favorecimiento de la quimiotaxis, al observar por ejemplo a *H. pylori* cómo induce la expresión de IL-8 en células de la línea MKN45⁴¹, cómo *Serratia marcescens* emplea la serralisina para la expresión de IL-6 e IL-8 en células EBC-1⁴² y finalmente cómo la proteasa de *P. aeruginosa* LepA también favorece la expresión de la IL-8 en células COS-7⁴³. Aunque la activación de estos efectos se observó en 3 distintas líneas celulares, hay que destacar que el PAR2 es el receptor que tienen en común estas 3 proteasas, y que en los 3 casos la inflamación es un común denominador. Sin embargo, no todas las proteasas de patógenos tienen por objetivo la activación de estos receptores, sino todo lo contrario; en *P. aeruginosa* también se observó cómo una elastasa tenía la capacidad de «desarmar» al receptor PAR2 en células de epitelio pulmonar (A549 y 16HBE), impidiendo su activación, lo que sugiere un mecanismo de evasión a la inmunidad innata en este órgano³⁷.

Oportunidades terapéuticas

El empleo de inhibidores de proteasas como tratamiento es una estrategia que ha resultado bastante eficiente en múltiples enfermedades, al evitar un desbalance en la actividad proteolítica de estas enzimas, o simplemente evitando la alteración dependiente de la degradación de un sustrato específico⁴⁴. Entre los padecimientos que han evidenciado una regulación dependiente de la inhibición de las proteasas involucradas en el proceso están la hipertensión, con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina⁴⁵, o

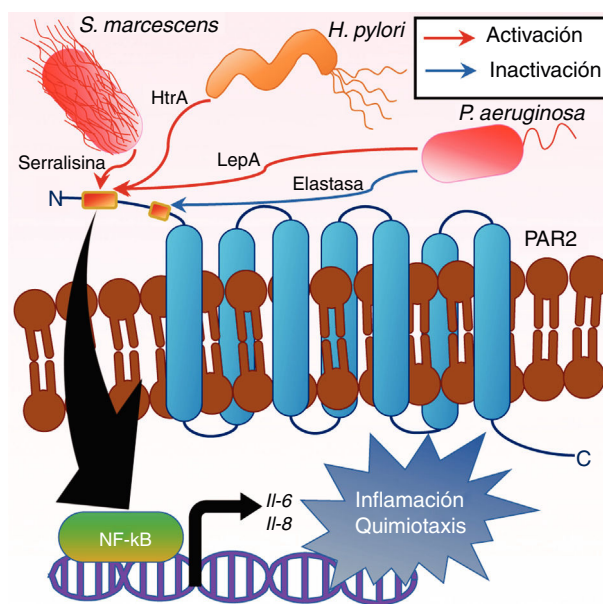


Figura 4 Proteasas de serina bacterianas activadoras de receptores PAR. Los microorganismos *S. marcescens*, *H. pylori* y *P. aeruginosa*, por acción de las proteasas serralisina, HtrA y LepA, respectivamente, han mostrado la capacidad de activar al receptor PAR2, y con ello inducir la producción de citocinas inflamatorias y quimiotácticas como son la IL-6 y la IL-8. En el caso *S. marcescens* y *P. aeruginosa* se sabe que tales eventos tras la activación del receptor PAR2 involucran la activación del factor de transcripción NF-κB, y que en el caso de *P. aeruginosa* este efecto puede ser dependiente también de la activación de PAR1 y PAR4. Así mismo, en *P. aeruginosa* la proteasa de serina elastasa es reconocida por «desarmar» al receptor PAR2, realizando un corte proteolítico río abajo de su sitio de activación impidiendo la activación de este.

la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, al inhibir a la proteasa responsable en la activación del virión y, por ende, evitar la formación de nuevas partículas infectivas⁴⁶.

De entre las proteasas producidas por microorganismos patógenos no todas desempeñan un papel de virulencia en el huésped, sino que algunas actúan al nivel del propio microorganismo para regular la expresión de otros factores de virulencia. Estos mecanismos de regulación, necesarios para permitir las condiciones de adaptación a su huésped, hace que estas proteasas sean consideradas también como factores de virulencia y probables blancos terapéuticos.

Las proteasas HtrA son enzimas del clan PA, que poseen un dominio tipo tripsina y uno o 2 dominios PDZ, asociadas con la sobrevivencia de algunos microorganismos cuando se desarrollan en ambientes hostiles, como temperaturas elevadas y en condiciones de estrés oxidativo⁴⁷. *E. coli* es el modelo de estudio de las proteasas HtrA, en donde se ha descrito que los ortólogos periplásmicos DegP, DegQ y DegS⁴⁸ tienen la función de degradar proteínas mal plegadas que sufrieron daño estructural, producto de las condiciones de estrés celular a las que se halla sometida la bacteria⁴⁹. Tanto en bacterias gram negativas como en gram positivas se ha demostrado que las proteínas HtrA son importantes factores

de virulencia, al encontrar que en ausencia de esta proteasa de serina la sobrevivencia de estos patógenos disminuye, y aunque el mecanismo que esta enzima desempeña en la fisiopatología de la infección a nivel de regulación no está del todo demostrado, se sugiere que emplea un mecanismo homólogo al observado en la enzima DegP de *E. coli*⁴⁷. Entre los microorganismos en los que se ha observado una participación importante de esta proteasa en modelos de infección se encuentran *C. jejuni*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Burkholderia cepacia*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*⁴⁷. Por otro lado, en *H. pylori* y *C. jejuni* las proteasas HtrA han demostrado un efecto fisiopatológico más contundente en el que se observa la capacidad de interrumpir la arquitectura normal del epitelio, desorganizando las uniones estrechas, lo que permite su migración al espacio intercelular y favorece el establecimiento del nicho de infección^{17,50}. Otros microorganismos patógenos en donde también se ha observado la capacidad de degradar las uniones estrechas dependientes de sus proteasas HtrA son ECEP, *Salmonella enterica*, *S. flexneri*, *P. mirabilis* y *Yersinia enterocolitica*¹⁵.

Estas proteasas tipo HtrA han sido consideradas por muchos autores como fuertes candidatos para realizar estrategias terapéuticas alternativas debido a la fuerte asociación que existe entre estas proteasas y la alta virulencia que presentan algunos de estos patógenos⁴⁷. Hasta la fecha son pocos los reportes en los que se haya empleado el uso de inhibidores de las proteasas HtrA para mitigar la capacidad patogénica de algún microorganismo, siendo algunos de ellos el compuesto HHI (inhibidor de HtrA de *Helicobacter*) en el que se mostró cómo el bloqueo de la proteasa impedía la degradación de la molécula E-cadherina en un modelo de cultivo celular de epitelio gástrico MKN-28¹⁷. Otros compuestos son la clorometil cetona sintetizada para la inhibición de HtrA en *E. coli*⁵¹ o el tripéptido Val-Pro-Val (valina-prolina-valina) que bloquea el sitio activo en la HtrA de *Chlamydia pneumoniae*, impidiendo que esta última complete su ciclo de vida⁵².

Otra familia de proteasas vinculadas a la virulencia de bacterias patógenas durante el periodo de infección son las proteasas de serina Clp. Estas proteasas son igualmente reguladoras de estrés, degradando proteínas que han sido mal plegadas en consecuencia al choque térmico, estrés oxidativo o privación de nutrientes⁵³. La actividad de proteasa de las enzimas Clp funciona en forma de complejo por la subunidad ClpP, la cual cuenta con la actividad de serín peptidasa, y con una ATPasa Clp la cual cuenta con la función de reconocer las proteínas destinadas a su degradación y transferirlas al dominio ClpP para su degradación⁵⁴. En microorganismos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Salmonella enterica* se ha descrito cómo las proteasas de serina Clp desempeñan un importante papel en su virulencia³. En *L. monocytogenes* y *S. pneumoniae* se mostró que al inhibir la acción de las proteasas ClpXP estos microorganismos presentaban una mayor susceptibilidad a la fagocitosis por macrófagos murinos derivados de médula ósea y de la línea celular RAW264.7, respectivamente, probablemente debido a su incapacidad de tolerar las condiciones intracelulares^{55,56}. Por su parte, en *S. aureus* la implicación de las proteasas ClpXP está relacionada con la regulación en la expresión de otros factores de virulencia como hemolisinas, adhesinas de superficie y

otras proteasas⁵⁷, mientras que en *B. anthracis* la ATPasa ClpX está vinculada con la esporulación, la germinación y la resistencia al estrés⁵⁸.

Al igual que las proteasas HtrA, la interrupción de la actividad de las proteasas de la familia Clp también ha mostrado resultados favorables como una estrategia para la eliminación de microorganismos patógenos⁵⁹. El inhibidor de proteasas de serina F2 mostró tener un efecto inhibitorio sobre las proteasas ClpXP de *S. aureus* y *B. anthracis*, mejorando además la susceptibilidad a antibióticos y al péptido antimicrobiano LL-37, con lo que se propone que este inhibidor usado complementariamente con el tratamiento adecuado puede funcionar sinérgicamente en una terapia antimicrobiana⁵³. Por otra parte, están aquellos compuestos que tienen *per se* un efecto antimicrobiano, pero en los cuales su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las proteasas de la familia Clp. Entre estos compuestos se encuentran los acil-depsipéptidos, los cuales fueron aislados de *Streptomyces hawaiiensis* y se sabe que actúan específicamente al inhibir la subunidad de peptidasa ClpP; estos compuestos mostraron un efecto bactericida en contra de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* y *S. pneumoniae* con una elevada tasa de sobrevivencia en modelos animales⁶⁰.

En conjunto, esta información sugiere que la inhibición de la actividad de las proteasas de serina, la cual representa una participación vital en la fisiología y la fisiopatología de diferentes microorganismos patógenos, representa una serie de fuertes candidatos para la elaboración de nuevas terapias antimicrobianas.

Conclusión

Las proteasas de serina son reconocidas como el grupo de enzimas con actividad proteolítica más extendido en la naturaleza, al igual que en las bacterias¹. Estas proteasas han representado una estrategia para las bacterias patógenas, permitiéndoles realizar procesos de colonización, invasión, adaptación a su nicho de colonización, favoreciendo la producción de otros factores de virulencia e inclusive lograr la evasión del sistema inmune, siendo todo esto lo que actualmente las cataloga como factores de virulencia en la patogénesis bacteriana³, sin embargo, el entendimiento sobre cómo estos determinantes en la virulencia llevan a cabo sus mecanismos a un nivel más específico, como en la activación de los PAR, es algo que permanece sin descripción actualmente para la mayoría de estas enzimas⁴.

El empleo de inhibidores específicos de proteasas como tratamiento es una estrategia que ha resultado bastante eficiente en múltiples enfermedades, al evitar un desbalance en la actividad proteolítica de estas enzimas o simplemente evitando la alteración dependiente de la degradación de un sustrato específico. Aunque la propuesta de emplear inhibidores de proteasas es una estrategia que se ha venido proponiendo desde hace algunos años, el utilizar a las proteasas de serina como blanco terapéutico en las enfermedades infecciosas es un campo que empieza a investigarse; sin embargo, para poder hacer de esta estrategia terapéutica una herramienta efectiva se necesita enriquecer el entendimiento sobre qué proteasas de origen bacteriano ejercen un papel determinante en la virulencia y cuáles son

los mecanismos de acción que estas enzimas emplean en la patogénesis.

Financiación

El presente trabajo forma parte de un Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y la Secretaría de Educación Pública (SEP), a través del Proyecto aprobado a JPPN (No. 238125). Gerardo García González es beneficiario del Programa de Becas Nacionales CONACyT (CVU 708895).

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses que señalar.

Bibliografía

- Page MJ, Cera ED. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:1220–36.
- Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*. 2002;102:4501–24.
- Ingmer H, Brøndsted L. Proteases in bacterial pathogenesis. *Res Microbiol*. 2009;160:704–10.
- Lantz MS. Are bacterial proteases important virulence factors? *J Periodontol Res*. 1997;32:126–32.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D624–32.
- Ekici ÖD, Paetzel M, Dalbey RE. Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 2008;17:2023–37.
- Alamuri P, Mobley HLT. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Mol Microbiol*. 2008;68:997–1017.
- Ruiz-Perez F, Nataro JP. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: Classification, specificity and role in virulence. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2014;71:745–70.
- Al-Hasani K, Navarro-García F, Huerta J, Sakellaris H, Adler B. The Immunogenic SigA Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a Binds to HEp-2 Cells and Induces Fodrin Redistribution in Intoxicated Epithelial Cells. *PLOS ONE*. 2009;4:e8223.
- Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Sui BQ, Nataro JP, Azamar Y. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. *Infect Immun*. 2004;72:3609–21.
- Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes FE, Mobley HLT. Protease activity, secretion, cell entry cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2006;74:6124–34.
- Serapio-Palacios A, Navarro-García F. EspC, an autotransporter protein secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli* causes apoptosis and necrosis through caspase and calpain activation, including direct procaspase-3 cleavage. *mBio*. 2016;7:e00479–516.
- Moal VL-L, Comenge Y, Ruby V, Amsellem R, Nicolas V, Servin AL. Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. *Cell Microbiol*. 2011;13:992–1013.
- Heimer SR, Rasko DA, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HLT. Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2004;72:593–7.
- Abfalter CM, Schubert M, Götz C, Schmidt TP, Posselt G, Wessler S. HtrA-mediated E-cadherin cleavage is limited to DegP and DegQ homologs expressed by gram-negative pathogens. *Cell Commun Signal*. 2016;14:30.
- Elmi A, Nasher F, Jagatia H, Gundogdu O, Bajaj-Elliott M, Wren B, et al. *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle-associated proteolytic activity promotes bacterial invasion by mediating cleavage of intestinal epithelial cell E-cadherin and occludin. *Cell Microbiol*. 2016;18:561–72.
- Hoy B, Löwer M, Weydig C, Carra G, Tegtmeyer N, Geppert T, et al. *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO*. 2010;11:798–804.
- Brunner W, Schmidt H, Karch H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol*. 1997;24:767–78.
- Dutta PR, Cappello R, Navarro-García F, Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun*. 2002;70:7105–13.
- Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;230:73–83.
- Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun*. 2009;77:2465–73.
- Paharik AE, Salgado-Pabon W, Meyerholz DK, White MJ, Schlievert PM, Horswill AR. The Spl serine proteases modulate *Staphylococcus aureus* protein production and virulence in a rabbit model of pneumonia. *mSphere*. 2016;1:e00208–216.
- Drago-Serrano ME, Parra SG, Manjarrez-Hernández HA. EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;265:35–40.
- Mirza S, Wilson L, Benjamin WH, Novak J, Barnes S, Hollingshead SK, et al. Serine Protease PrtA from *Streptococcus pneumoniae* plays a role in the killing of *S. pneumoniae* by apolactoferrin. *Infect Immun*. 2011;79:2440–50.
- Nitta H, Imamura T, Wada Y, Irie A, Kobayashi H, Okamoto K, et al. Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. *J Immunol*. 2008;181:3602–8.
- Orth D, Ehrlenbach S, Brockmeyer J, Khan AB, Huber G, Karch H, et al. EspP, a serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infect Immun*. 2010;78:4294–301.
- Ruiz-Perez F, Wahid R, Faherty CS, Kolappaswamy K, Rodriguez L, Santiago A, et al. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:12881–6.
- Kandulski A, Kuester D, Mönkemüller K, Fry L, Malfetheriner P, Wex T. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in human gastric mucosa as mediator of proinflammatory effects in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2011;16:452–8.
- Mondal A, Tapader R, Chatterjee NS, Ghosh A, Sinha R, Koley H, et al. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 2016;84:1478–90.
- Bryan JD, Shelper DW. *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines. *J Bacteriol*. 2009;191:1847–54.

31. Fritzer A, Noiges B, Schweiger D, Rek A, Kungl AJ, von Gabain A, et al. Chemokine degradation by the Group A streptococcal serine proteinase ScpC can be reconstituted in vitro and requires two separate domains. *Biochem J.* 2009;422:533–42.
32. Okuda J, Hayashi N, Minagawa S, Gotoh N, Tanabe S. Degradation of interleukin 8 by the serine protease MucD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother.* 2011;17:782–92.
33. Vidarsson G, Overbeeke N, Stemmerding AM, van den Dobbelsteen G, van Ulsen P, van der Ley P, et al. Working mechanism of immunoglobulin A1 (IgA1) protease: Cleavage of IgA1 antibody to *Neisseria meningitidis* PorA requires de novo synthesis of IgA1 protease. *Infect Immun.* 2005;73:6721–6.
34. Kornfeld SJ, Plaut AG. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. *Rev Infect Dis.* 1981;3:521–34.
35. Mistry D, Stockley RA. IgA1 protease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1244–8.
36. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:579–621.
37. Dulon S, Leduc D, Cottrell GS, D'Alayer J, Hansen KK, Bunnett NW, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:411–9.
38. Shpacovitch V, Feld M, Bunnett NW, Steinhoff M. Protease-activated receptors: Novel PARTners in innate immunity. *Trends Immunol.* 2007;28:541–50.
39. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, et al. Proteinase-activated receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev.* 2005;26:1–43.
40. Saito T, Bunnett NW. Protease-activated receptors. *NeuroMolecular Med.* 2005;7:79–99.
41. Kajikawa H, Yoshida N, Katada K, Hirayama F, Handa O, Kokura S, et al. *Helicobacter pylori* activates gastric epithelial cells to produce interleukin-8 via protease-activated receptor 2. *Digestion.* 2007;76:248–55.
42. Kida Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. *Serratia marcescens* serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2. *Infect Immun.* 2007;75:164–74.
43. Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- κ B through protease-activated receptors. *Cell Microbiol.* 2008;10:1491–504.
44. Scott CJ, Taggart CC. Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie.* 2010;92:1681–8.
45. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 1977;196:441–4.
46. Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, Bassett RL, Timpone J, Baruch A, et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med.* 1996;334:1011–7.
47. Wessler S, Schneider G, Backert S. Bacterial serine protease HtrA as a promising new target for antimicrobial therapy? *Cell Commun Signal.* 2017;15:4.
48. Skorko-Glonek J, Sobiecka-Szkatula A, Narkiewicz J, Lipinska B. The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. *Microbiology.* 2008;154:3649–58.
49. Clausen T, Southan C, Ehrmann M. The HtrA family of proteases: Implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell.* 2002;10:443–55.
50. Boehm M, Hoy B, Rohde M, Tegtmeyer N, Bæk KT, Oyarzabal OA, et al. Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: Role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. *Gut Pathog.* 2012;4:3.
51. Hauske P, Meltzer M, Ottmann C, Krojer T, Clausen T, Ehrmann M, et al. Selectivity profiling of DegP substrates and inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2009;17:2920–4.
52. Gloeckl S, Ong VA, Patel P, Tyndall JDA, Timms P, Beagley KW, et al. Identification of a serine protease inhibitor which causes inclusion vacuole reduction and is lethal to *Chlamydia trachomatis*. *Mol Microbiol.* 2013;89:676–89.
53. McGillivray SM, Tran DN, Ramadoss NS, Alumasa JN, Okumura CY, Sakoulas G, et al. Pharmacological inhibition of the ClpXP protease increases bacterial susceptibility to host cathelicidin antimicrobial peptides and cell envelope-active antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1854–61.
54. Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 2007;63:1285–95.
55. Gaillot O, Pellegrini E, Bregenholt S, Nair S, Berche P. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 2000;35:1286–94.
56. Park CY, Kim EH, Choi SY, Tran TDH, Kim IH, Kim SN, et al. Virulence attenuation of *Streptococcus pneumoniae* mutant by sensitivity to oxidative stress in macrophages via an NO-mediated pathway. *J Microbiol.* 2010;48:229–35.
57. Frees D, Sørensen K, Ingmer H. Global virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: Pinpointing the roles of ClpP and ClpX in the sar/agr regulatory network. *Infect Immun.* 2005;73:8100–8.
58. Krüger E, Witt E, Ohlmeier S, Hanschke R, Hecker M. The Clp proteases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. *J Bacteriol.* 2000;182:3259–65.
59. Cheng L, Naumann TA, Horswill AR, Hong SJ, Venters BJ, Tomsho JW, et al. Discovery of antibacterial cyclic peptides that inhibit the ClpXP protease. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2007;16:1535–42.
60. Brötz-Oesterhelt H, Beyer D, Kroll HP, Endermann R, Ladel C, Schroeder W, et al. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat Med.* 2005;11:1082–7.