

# Ruolo e formazione dei persisters nelle popolazioni batteriche

## REVIEWS

### Persistent bacterial infections and persister cells

Robert A. Fisher, Bridget Gollan and Sophie Helaine

**Abstract** | Many bacteria can infect and persist inside their hosts for long periods of time. This can be due to immunosuppression of the host, immune evasion by the pathogen and/or ineffective killing by antibiotics. Bacteria can survive antibiotic treatment if they are resistant or tolerant to a drug. Persisters are a subpopulation of transiently antibiotic-tolerant bacterial cells that are often slow-growing or growth-arrested, and are able to resume growth after a lethal stress. The formation of persister cells establishes phenotypic heterogeneity within a bacterial population and has been hypothesized to be important for increasing the chances of successfully adapting to environmental change. The presence of persister cells can result in the recalcitrance and relapse of persistent bacterial infections, and it has been linked to an increase in the risk of the emergence of antibiotic resistance during treatment. If the mechanisms of the formation and regrowth of these antibiotic-tolerant cells were better understood, it could lead to the development of new approaches for the eradication of persistent bacterial infections. In this Review, we discuss recent developments in our understanding of bacterial persisters and their potential implications for the treatment of persistent infections.

#### RESEARCH

### REVIEW SUMMARY

#### ANTIBIOTIC RESISTANCE

## Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure

Alexander Harms, Etienne Maisonneuve, Kenn Gerdes\*

**BACKGROUND:** The escalating crisis of multidrug resistance is raising fears of untreatable infections caused by bacterial "superbugs." However, many patients already suffer from infections that are effectively untreatable due to innate bacterial mechanisms for persistence. This phenomenon is caused by the formation

of pathways, such as the general stress response or the SOS response, in conjunction with the second messenger (p)ppGpp that is almost always involved in persister formation. Consequently, persister formation is stimulated under conditions that favor the activation of these signaling pathways. Such conditions

are attained. Most prominently, the central role of toxin-antitoxin (TA) modules has been explained in considerable detail. In the model organism *Escherichia coli* K-12, two major pathways of persister formation via TA modules are both controlled by (p)ppGpp and involve toxin HokB and a panel of mRNA endonuclease toxins, respectively. Whereas activation of the membrane-associated toxin HokB depends on the enigmatic

#### ON OUR WEBSITE

Read the full article at <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf4268>

guanosine triphosphatase (GTPase) Olg and causes persister formation by abolishing the proton-motive force, mRNA endonuclease toxins are activated through antitoxin degradation by protease Lon and globally inhibit translation. In addition to these two pathways, toxin TisB is activated in response to DNA damage by the

## Infezioni croniche e ricorrenti

Molte infezioni croniche o intermittenti sono causate da diversi microrganismi quali *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *E. coli* patogeni, *Staphylococcus* and *Streptococcus*. La insensibilità di queste infezioni al trattamento antibiotico è dovuta almeno in parte alla presenza di persisters che sono tolleranti a diversi antibiotici

I persisters non hanno acquisito mutazioni che conferiscono resistenza ma effettuano un cambiamento fenotipico transiente e in questo stato di non crescita non sono colpite dagli antibiotici.

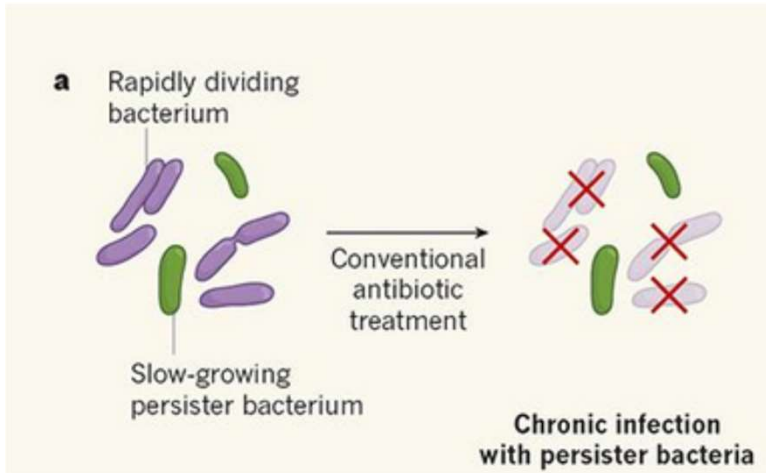
Per esempio, 10% of individui che hanno un'infezione *M. tuberculosis* dopo una fase acuta iniziale possono avere episodi ricorrenti durante la loro vita. Anche nel caso della febbre tifoide causata da *Salmonella typhi* nel 15% dei pazienti dopo trattamento antibiotico possono riavere infezioni mentre in infezioni urinarie (UTI) nelle donne provocate da ceppi di *E. coli* uropathogenic (UPEC), 27% of women va incontro ad infezioni ricorrenti. Altri batteri. Quali *Streptococcus* che provoca tonsilliti può dar luogo ad episodi ricorrenti dopo trattamento antibiotico including streptococcal tonsillitis<sup>26</sup>, tend to recur after antibiotic treatment and are likely to have a period of latency in the host.

## Come le cellule “persistenti” possono sconfiggere i trattamenti con antibiotici

Le cellule persistenti sono varianti fenotipiche di cellule batteriche che crescono regolarmente e sono in grado di sopravvivere ai trattamenti antibiotici in quanto entrano in uno stato dormiente (corrispondente allo stato di letargo per gli animali).

Al termine del trattamento , la ripresa della crescita ( resurrezione) delle cellule dormienti ripopola la popolazione batterica.

Le cellule si differenziano in persistere in modo casuale ad una frequenza basale ma questa conversione può essere indotta da segnali ambientali che segnalano al batterio un pericolo imminente



Che cos'è la persistenza??

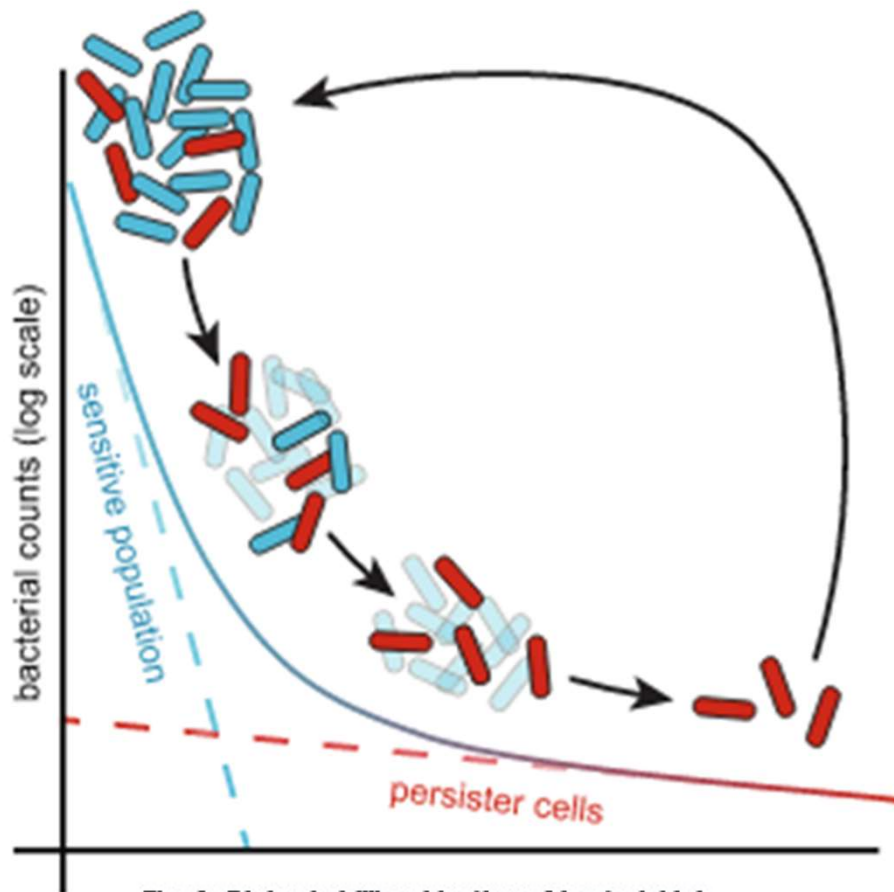
La persistenza è

- un fenomeno che contribuisce fortemente all'antibiotico resistenza.
- caratterizzato dalla formazione di cellule definite persistenti che sono in grado di resistere all'attacco degli antibiotici o di altri stress letali

Come?

semplicemente entrando in uno stato di "letargo", indipendentemente dal fatto che posseggano o meno geni di antibiotico resistenza.

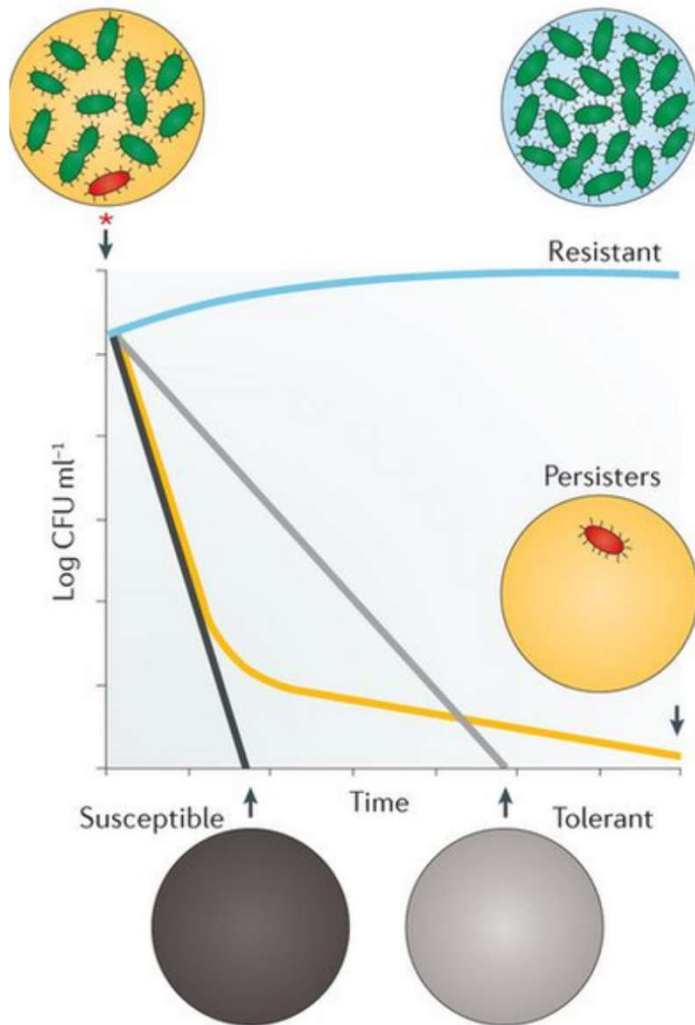
Il ritorno allo stato di crescita normale delle cellule persistenti può determinare completo fallimento della terapia antibiotica.



**Fig. 1. Biphasic killing kinetics of bactericidal antibiotic treatment.** A lethal dose of bactericidal antibiotic added at time zero rapidly eradicates the sensitive bulk of the population (blue) until only non-growing persister cells (red) that are killed at a slower rate remain. The slower killing has been interpreted to reflect the persister resuscitation rate, but this remains to be substantiated experimentally. The termination of antibiotic treatment enables the population to be replenished by resuscitation of surviving persisters.

Se al T0 viene aggiunta una dose letale di antibiotico che elimina le cellule sensibili fintanto che soltanto i persister rimarranno e saranno eliminati più lentamente.  
 Se al termine del trattamento antibiotico una o più cellule di persister sopravvivono quest'epotranno «resistere riprovocando l'infezione.

## La tolleranza



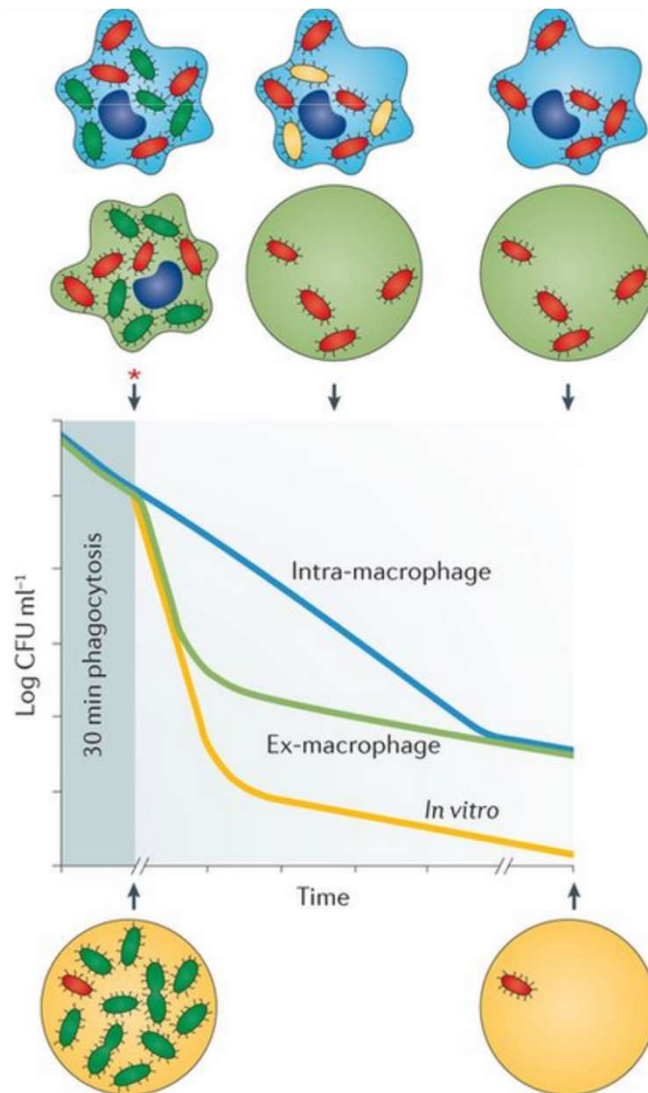
Analisi dell'effetto di un antibiotico sulle diverse popolazioni batteriche  
Se viene aggiunto ad una popolazione di batteri resistenti questi continueranno a crescere. (blu)

Una popolazione tollerante (grigio) invece impiega più tempo ad essere uccisa rispetto ad una popolazione sensibile (nero)  
Nel caso di una popolazione sensibile si assiste ad una curva bifasica caratterizzata da periodo di rapido killing seguito da una diminuzione molto più rallentata dovuta alla presenza di persister.

Come definiamo la TOLLERANZA : è considerata come il risultato di un cambiamento fenotipico non ereditabile.

In ogni caso possono comparire all'interno di una popolazione di batteri tolleranti mutazioni genetiche che rallentano la crescita batterica, il metabolismo cellulare o la cattura di antibiotici. Per esempio tutte le mutazioni che portano ad un incremento della fase di lag aumentano la tolleranza

Durante la vita intracellulare dei batteri all'interno delle cellule ospiti si osserva un incremento nel numero di persister della popolazione batterica.

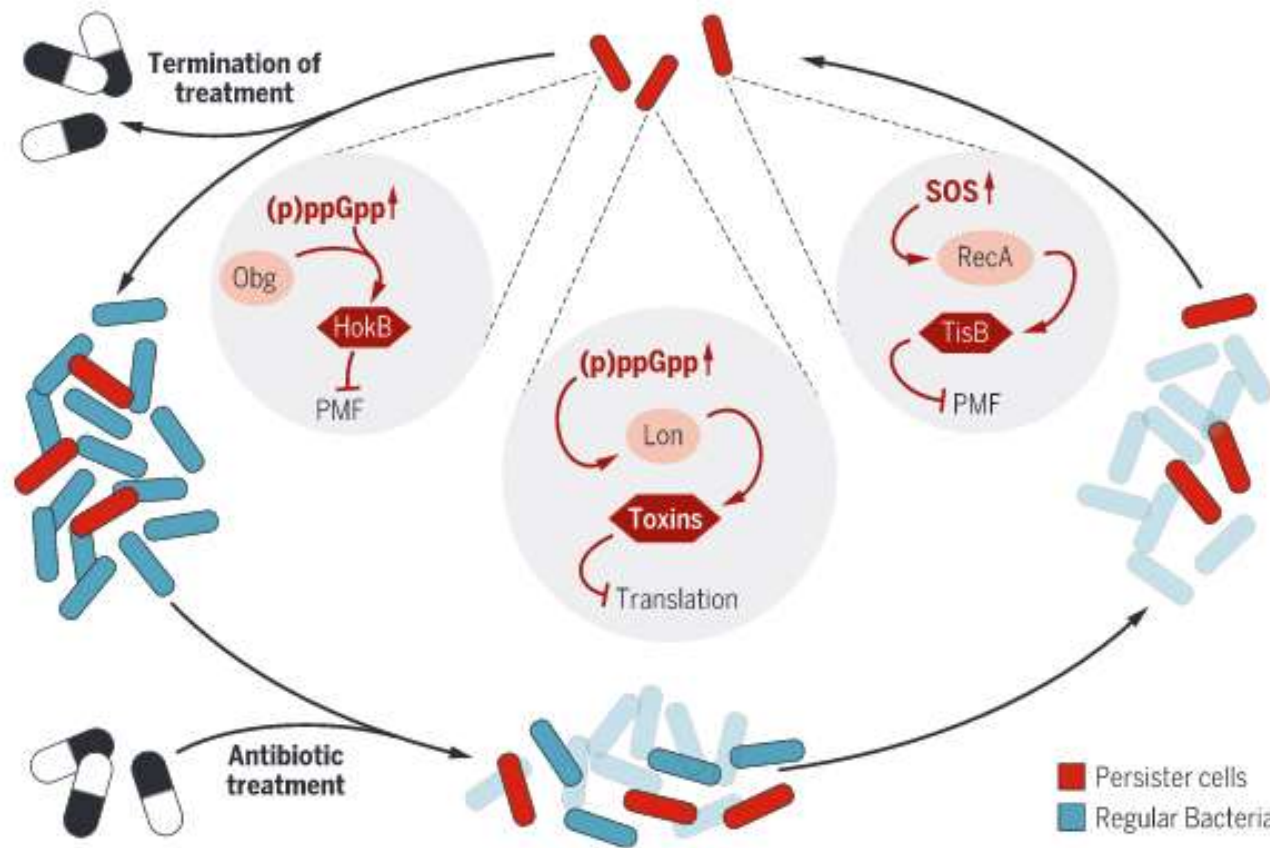


Se invece seguiamo che cosa succede quando cellule batteriche di *Salmonella* cresciute in LB vengono utilizzate per infettare i macrofagi si osserva che se l'antibiotico viene aggiunto dopo 30 minuti dalla fagocitosi, le cellule batteriche recuperate dai macrofagi presentano delle curve di crescita diverse dalle precedenti. In particolare si nota che crescendo in LB più antibiotico le cellule recuperate (ex macrophage) la frazione di persister è maggiore. Il numero di batteri che sopravvivono all'interno del macrofago tendono a diminuire ma la diminuzione rallenta anche in questo caso per l'insorgenza di persister

Cefotaxime survival kinetics of *Salmonella* grown in LB medium (grey), LB medium after 30-min internalisation (orange) and intra-macrophage *Salmonella* (blue). Red asterisk indicates cefotaxime addition. The *Salmonella* treated only in LB medium (grey) are mostly made up of cells that are susceptible to killing by antibiotics, represented by the sharp decrease in CFU, with a small persister fraction that can be observed in the subsequent slower decrease in CFU. After 30-min phagocytosis in macrophages followed by release of the *Salmonella* into LB medium + antibiotics (orange), the curve is similar to that of *Salmonella* treated *in vitro* but with a larger persister fraction. The intra-macrophage *Salmonella* also have a large persister fraction, as seen by the slow decrease in CFU near the end of the curve. However the tolerant growing bacteria present display much slower killing kinetics than the highly susceptible fast-growing *Salmonella* in LB. Adapted from Helaine *et al.* (2014)<sup>47</sup>.

Come e quando e perché si differenziano in persister cellule batteriche in crescita normale??

Le dimensioni e la composizione della sottopopolazione di persister nelle comunità batteriche è ampiamente controllata da sistemi di segnalazione quali la risposta allo stress, il sistema SOS. L' allarmone (p)ppGpp è generalmente coinvolto nella formazione dei persister.



La formazione di persister è quindi stimolata da tutte quelle condizioni che favoriscono l'attivazione di questi sistemi di regolazione incluse la formazione di biofilm, la risposta allo stress causato da condizioni subletali di antibiotico.



Qual 'è la rilevanza clinica dei persister?

Ancora oggi molti pazienti soffrono di infezioni batteriche che sono in grado di resistere a lunghi e ripetuti trattamenti antibiotici indipendentemente dall'acquisizione di resistenze.

Queste infezioni sono frequentemente di tipo cronico e non sono quasi mai eliminate dal trattamento antibiotico perchè i batteri possono persistere all'interno di biofilm o in altre nicchie portette.

Quali sono le infezioni che presentano più frequentemente i persister??

Le infezioni del tratto urinario causate da *Escherichia coli*

Le infezioni da *Mycobacterium tuberculosis*

Le infezioni opportunistiche nelle protesi o nelle ferite aperte provocate da biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*

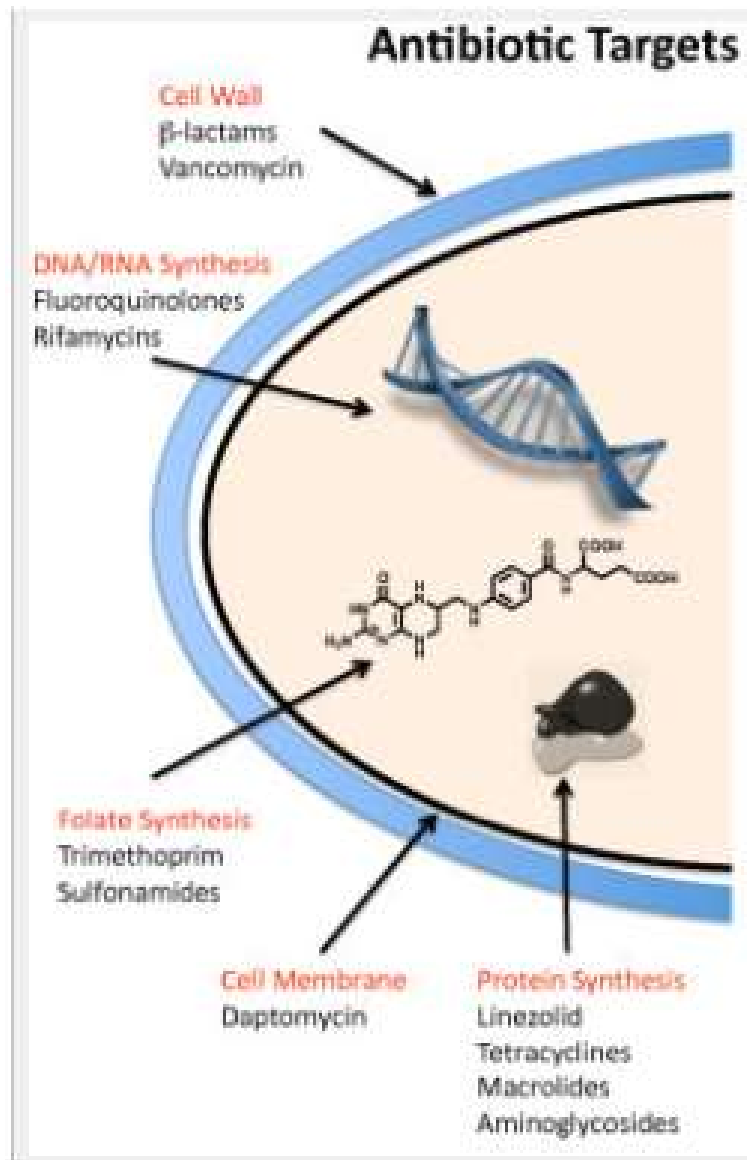
In modelli animali si è dimostrato la comparsa di persister che presentano resistenza agli antibiotici, crescita rallentata e la capacità di riprendere un ciclo di crescita normale alla fine del trattamento antibiotico .

Purtroppo il trattamento standard delle infezioni croniche che è basato su cicli ripetuti di alte dosi di antibiotico è legato ad un incremento dei livelli di persister negli isolati clinici e alla selezione di mutanti che presentano un' alta frequenza di selezione di persisters.

Persisters e antibiotico resistenza.

I persisters, oltre ad essere tolleranti agli antibiotici, sembrano catalizzare l'insorgenza di antibiotico resistenza perché diversi pathways di segnalazione importanti per la formazione dei persisters sono anche coinvolti nell'incremento delle mutazioni ( tipo il sistema SOS) e nell'attivazione degli elementi genetici mobili.

## La Dormienza



Gli antibiotici uccidono i batteri in quanto causano danni a processi cellulari essenziali per la vita della cellula.

La sopravvivenza dei persisters si basa sulla transizione ad uno stato **DORMIENTE** con una sostanziale riduzione della crescita e del metabolismo in modo da proteggere tutti quei processi che sarebbero “avvelenati” dagli antibiotici.

Tutte le comunità batteriche in tutti gli ecosistemi generano cellule dormienti come “*Banca del seme*” in grado di ripopolare l’habitat dopo un evento catastrofico.

Quindi i PERSISTERS sono una strategia dei batteri per sopravvivere in ambienti dinamici e potenzialmente ostili

## Controllo della persistenza

Persisters non sono semplicemente cellule che non crescono in quanto la loro formazione coinvolge una serie di cambiamenti qualitativi a livello fisiologico che permettono sia la sopravvivenza che la cosiddetta resurrezione.

I meccanismi di segnalazione che controllano la persistenza e la diretta formazione dei persister sono codificati geneticamente.

Il trattamento antibiotico ed in particolare trattamenti ricorrenti di antibiotici sono legati ad una aumentata insorgenza di persisters facilitandone la selezione.

In natura assenza di pressione selettiva ( antibiotico) i livelli di persisters variano enormemente tra specie e ceppi diversi.

## Ma come si formano i persisters??

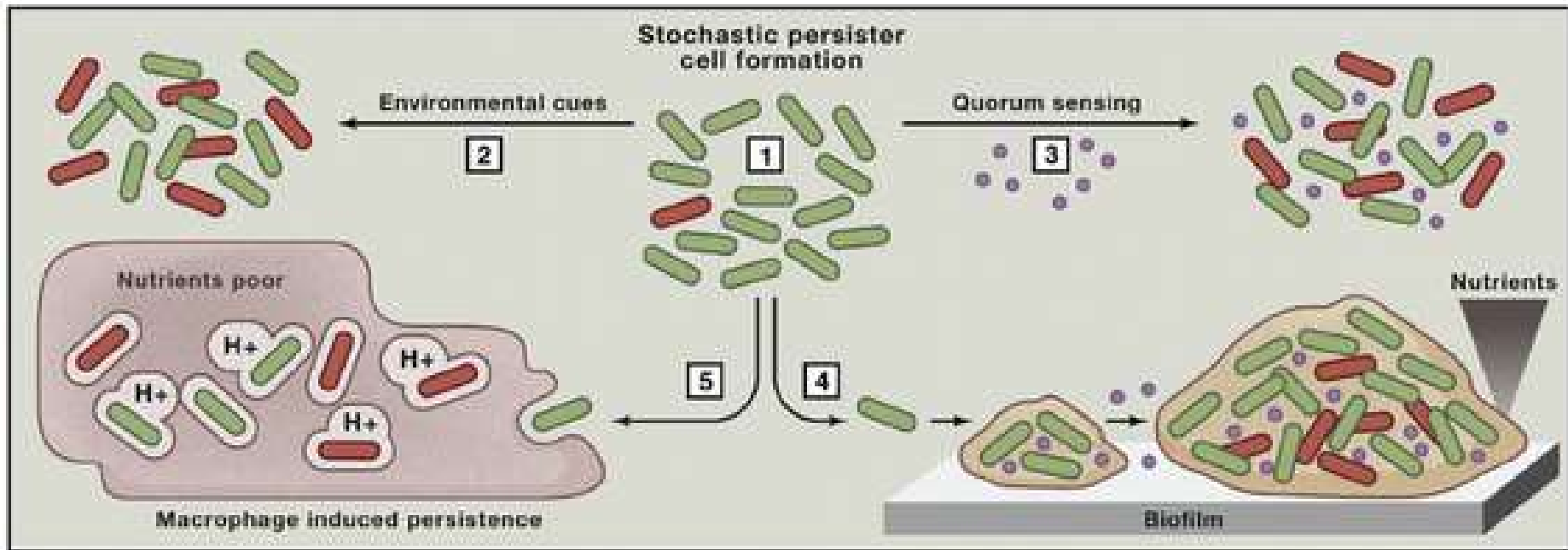
La formazione dei persisters è dovuta ad una combinazione tra meccanismi stocastici e di risposta che permettono ad un microrganismo di rispondere quando condizioni “pericolose” sono precedute da un segnale di stress.

La formazione casuale di persisters viene interpretata come una SCOMMESSA ovvero come una particolare strategia per massimizzare la fitness di una popolazione in un ambiente dinamico. Questo concetto implica che alcuni persisters siano presenti nella popolazione prima per esempio del trattamento letale con un antibiotico.

Dati sperimentali di citometria di flusso o analisi a livello di singola cellula evidenziano come le cellule che sopravvivono ad un trattamento antibiotico sono parte di una sottopopolazione di cellule dormienti preesistenti.

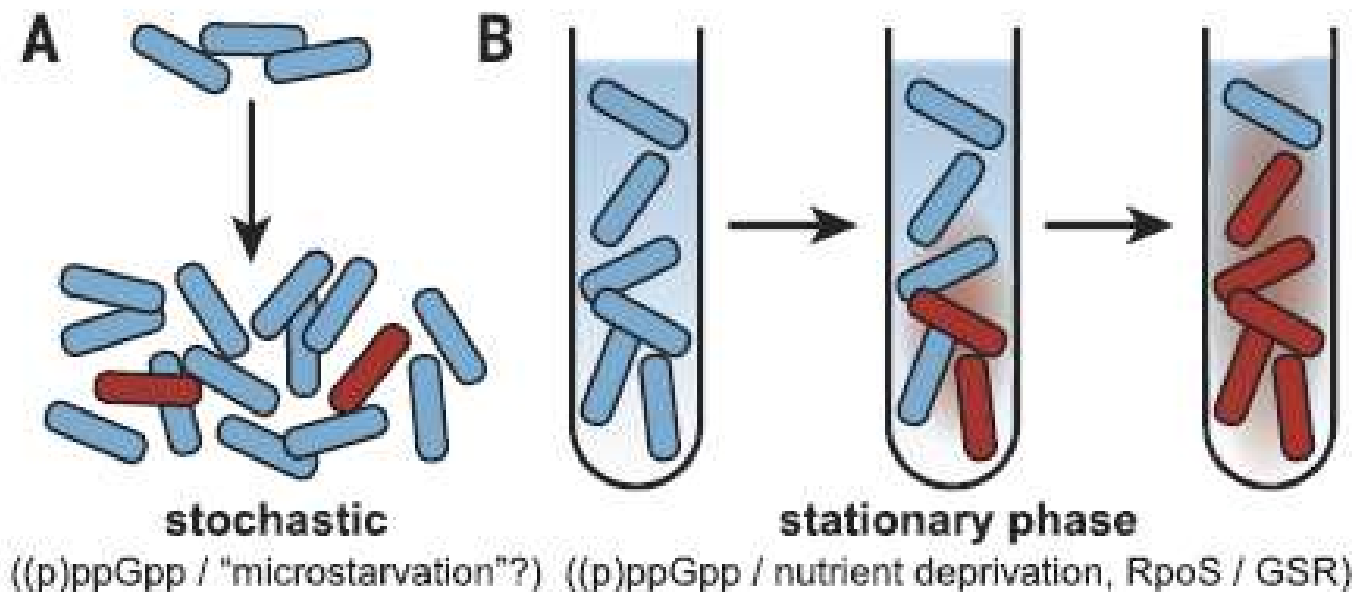
I batteri possono rispondere a cambiamenti ambientali modulando in modo qualitativo e quantitativo la percentuale di conversione in persisters.

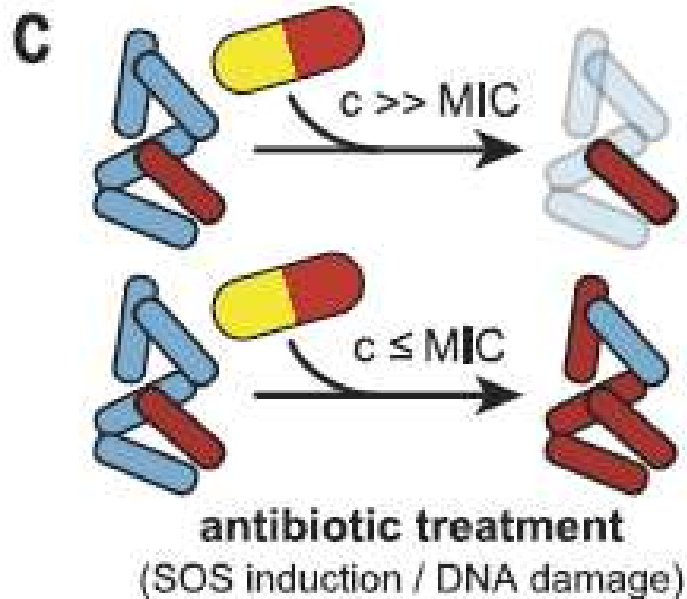
Quali possono essere le condizioni fisiologiche o ambientali che stimolano la formazione di persister?



1. I persister possono insorgere in una popolazione in modo stocastico in culture non sottoposte a stress come strategia bet hedging ( scommessa)  
Oppure possono stimolare la formazione di persister
2. Fattori ambientali quali mancanza di nutrienti (starvation), stress acido od ossidativo, heat shock.
3. Comportamenti sociali attraverso il quorum sensing
4. Alcuni microambienti all'interno dei biofilm
5. l'internalizzazione nei macrofagi (pH ,stress acido) .

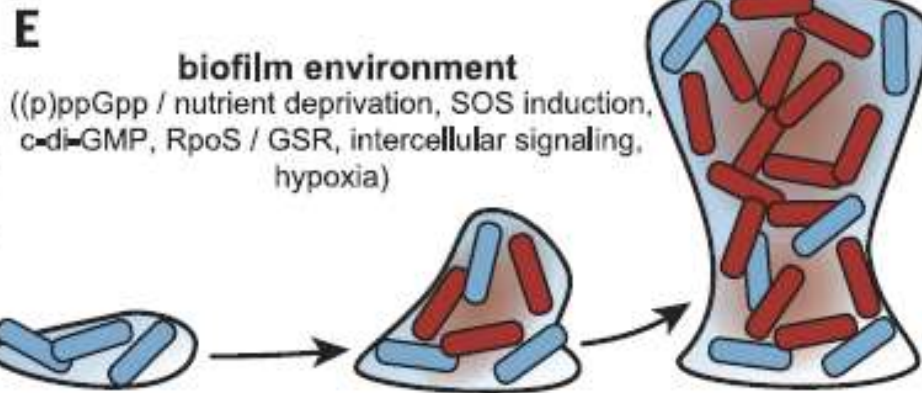
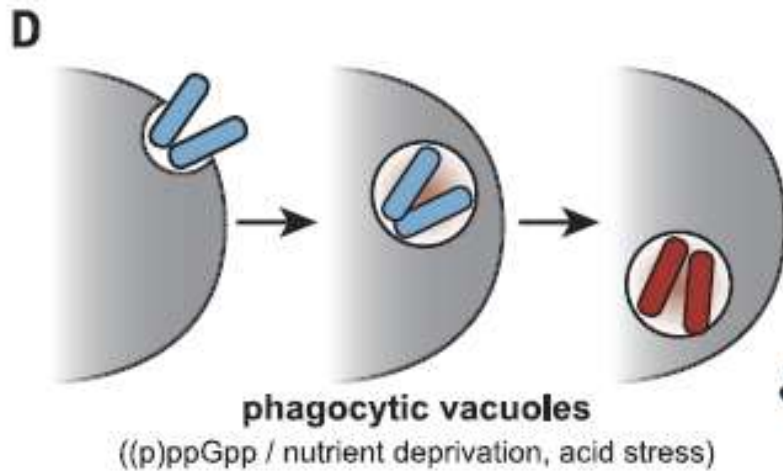
Sia la formazione di persister in modo casuale che stimolato sono controllati dallo stesso tipo di segnali. Questi includono componenti come la segnalazione da **ppGpp** che è in comune a tutti i pathway mentre altri pathway come la risposta SOS o l'ipossia hanno un ruolo modulatorio.





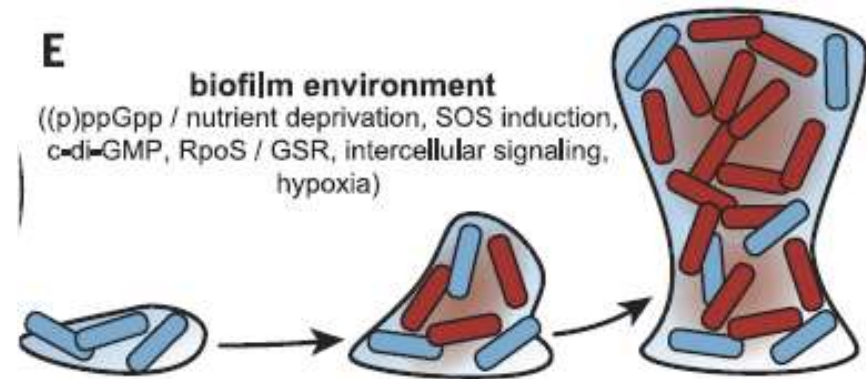
La formazione di persister è fortemente indotta da

- fase stazionaria
- trattamenti con dosi subletali di antibiotici
- da condizioni presenti nel vacuolo di fagocitosi
- durante la formazione di biofilm
- da GSR ( General Stress Response)





La formazione di persisters è stimolata da attivazione del pathway del (p)ppGpp che può avvenire occasionalmente a frequenza molto bassa o a frequenza maggiore durante la fase stazionaria o la formazione di biofilm.

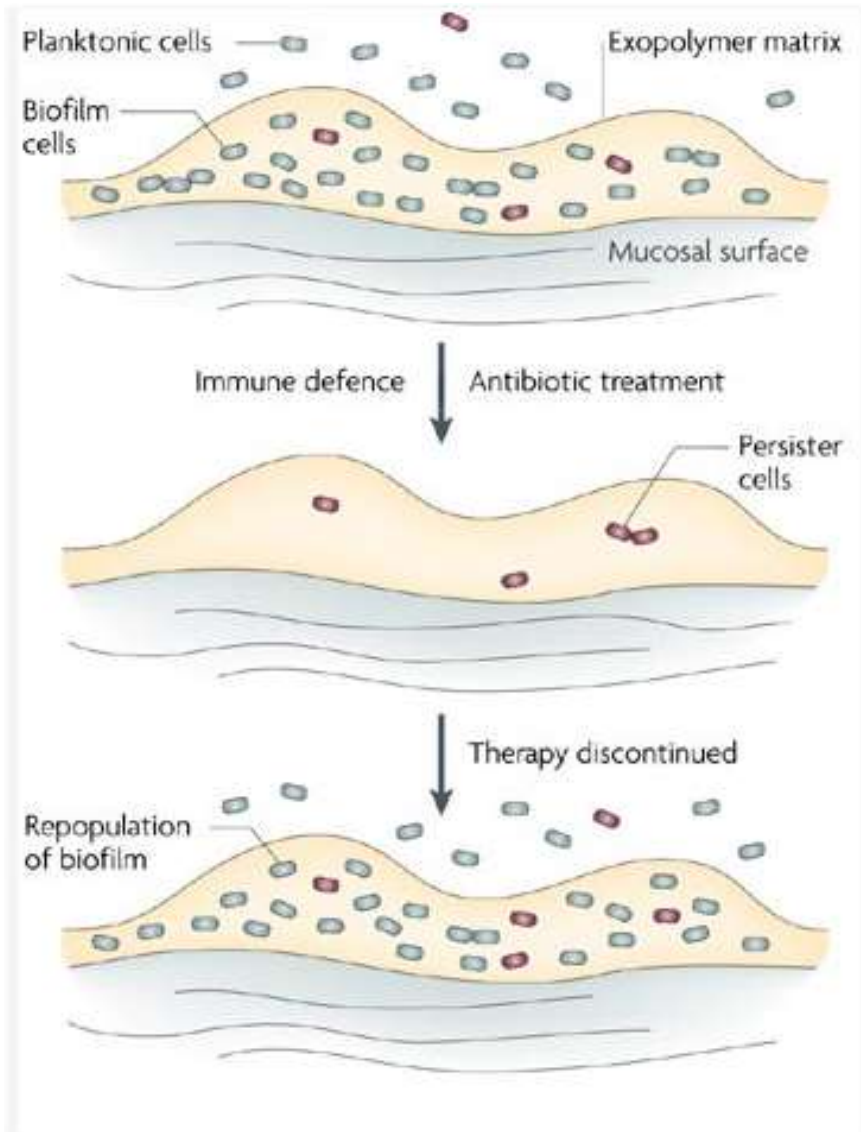


La nota resistenza dei biofilm ai trattamenti antibiotici e la propensione a recidive può essere attribuita all' elevata quantità di persisters che si formano all'interno di un biofilm. Da 100 a 1000 volte più persisters che in a cultura planctonica.

L'elevata quantità di persisters in un biofilm dipende dal  
- ppGpp

da segnali di risposta allo stress quali  
Induzione del sistema SOS  
Ipossia  
cyclic -di-GMP

## Ruolo dei biofilm nella persistenza



Modello di resistenza dei biofilm basato sull'insorgenza dei persisters.

Il trattamento iniziale con antibiotici provoca la morte delle cellule normali sia allo stato di biofilm che planktoniche. Il sistema immunitario riesce poi ad eliminare i persisters (in rosso) che si trovano allo stato planktonico mentre quelli inglobati dentro i biofilm sono protetti dalle difese dell'ospite dalla matrice di esopolissaccaridi. Una volta ridotta la concentrazione di antibiotico i persisters risuscitano e ripopolano il biofilm e l'infezione continua

# Quali sono le molecole cruciali per la formazione dei persister?

1. Allarmone (p)ppGpp

Il fattore Sigma RpoS

La risposta SOS

Il sistema di Quorum Sensing

## ppGpp è responsabile della risposta stringente

È un fenomeno geneticamente programmato

In condizioni di improvvisa carenza di aminoacidi si ha

- un blocco di alcuni processi fondamentali della cellula quali inizio della replicazione, trascrizione degli RNA ribosomiali, tRNA e di molti operoni
- attivazione di operoni catabolici e biosintetici.
- induzione molto elevata del ppGpp guanosina 3'5' bispirofosfato definito *MAGIC SPOT*

## 1 pppGpp

**ppGpp** è una molecola segnale detta come allarmone

- Segnala uno stato fisiologico della cellula
- Come cAMP, controlla numerosi operoni
- permette la sopravvivenza in condizioni difficili.

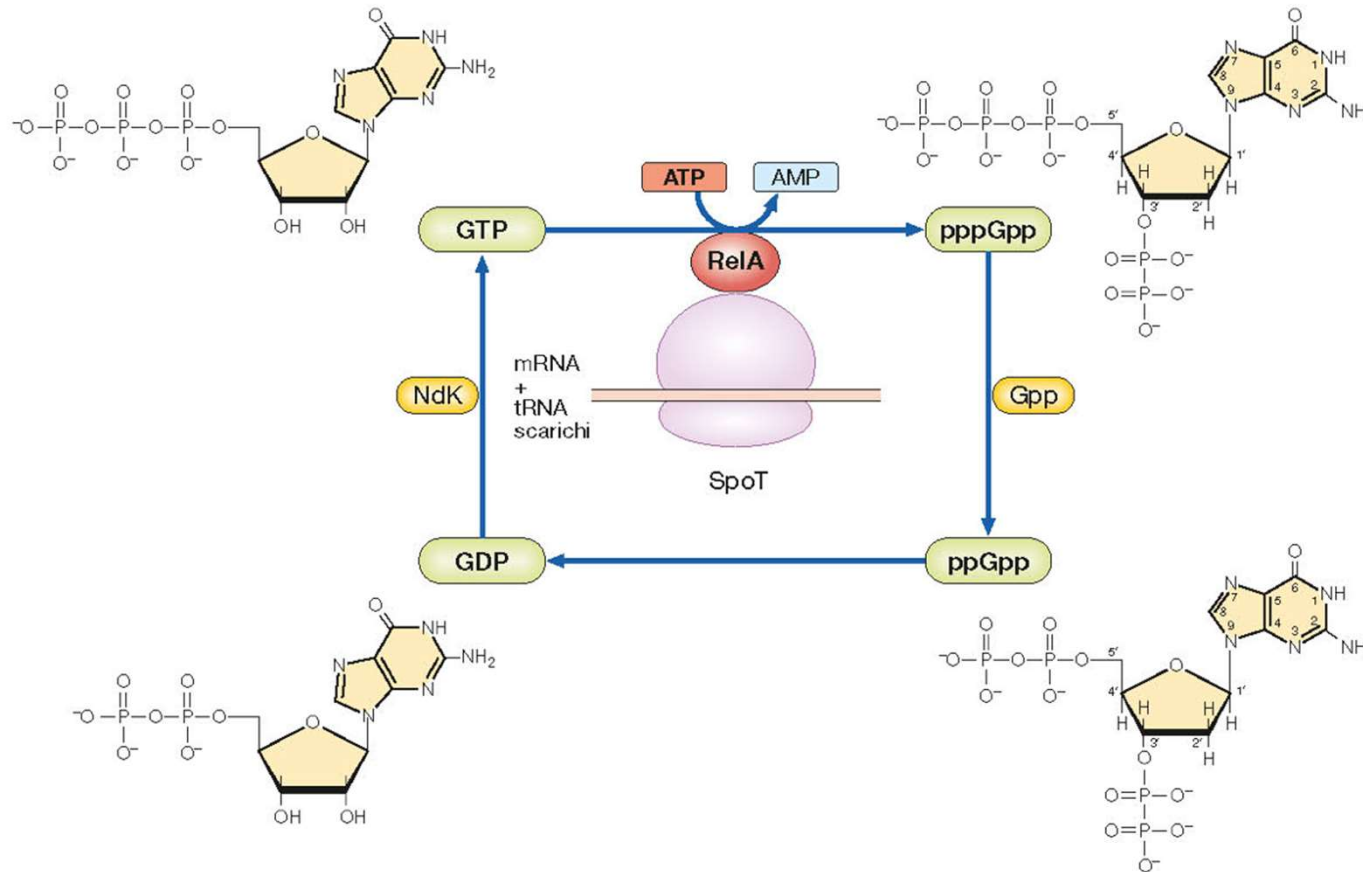
Con chi interagisce ppGpp?

- interagisce con la RNA polimerasi
- inibisce la trascrizione dai promotori degli RNA ribosomiali.

RelA e SpoT direttamente coinvolti nella regolazione intracellulare di ppGpp

RelA è una ppGpp sintetasi associata al ribosoma che risponde all'accumulo di tRNA non carichi.

SpoT è una proteina bifunzionale ppGpp sintetasi ed una idrolasi e regola il livello di ppGpp in risposta a molti stimoli.



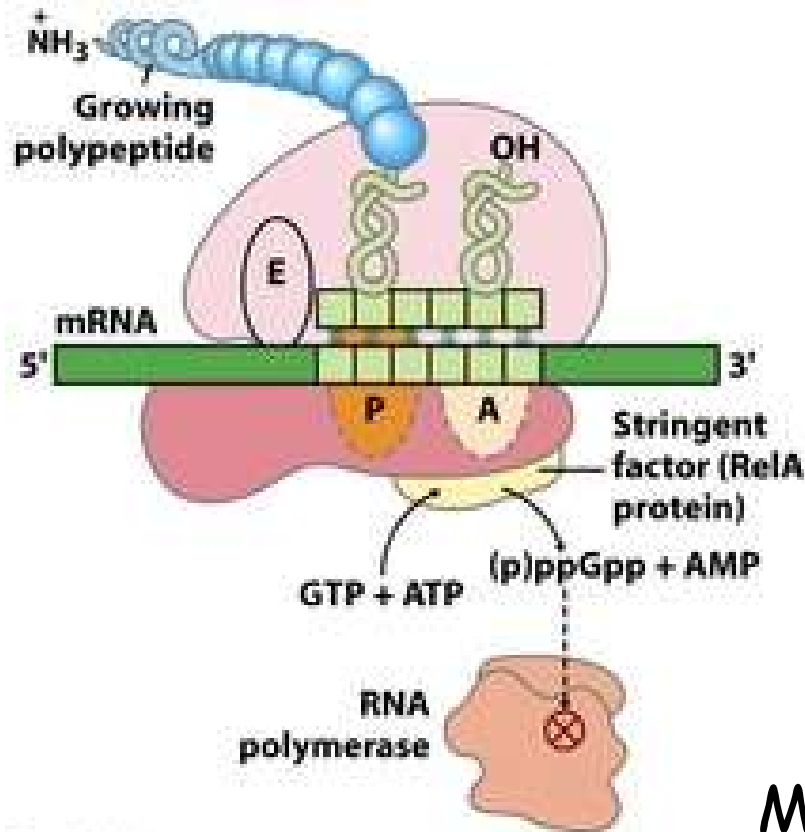
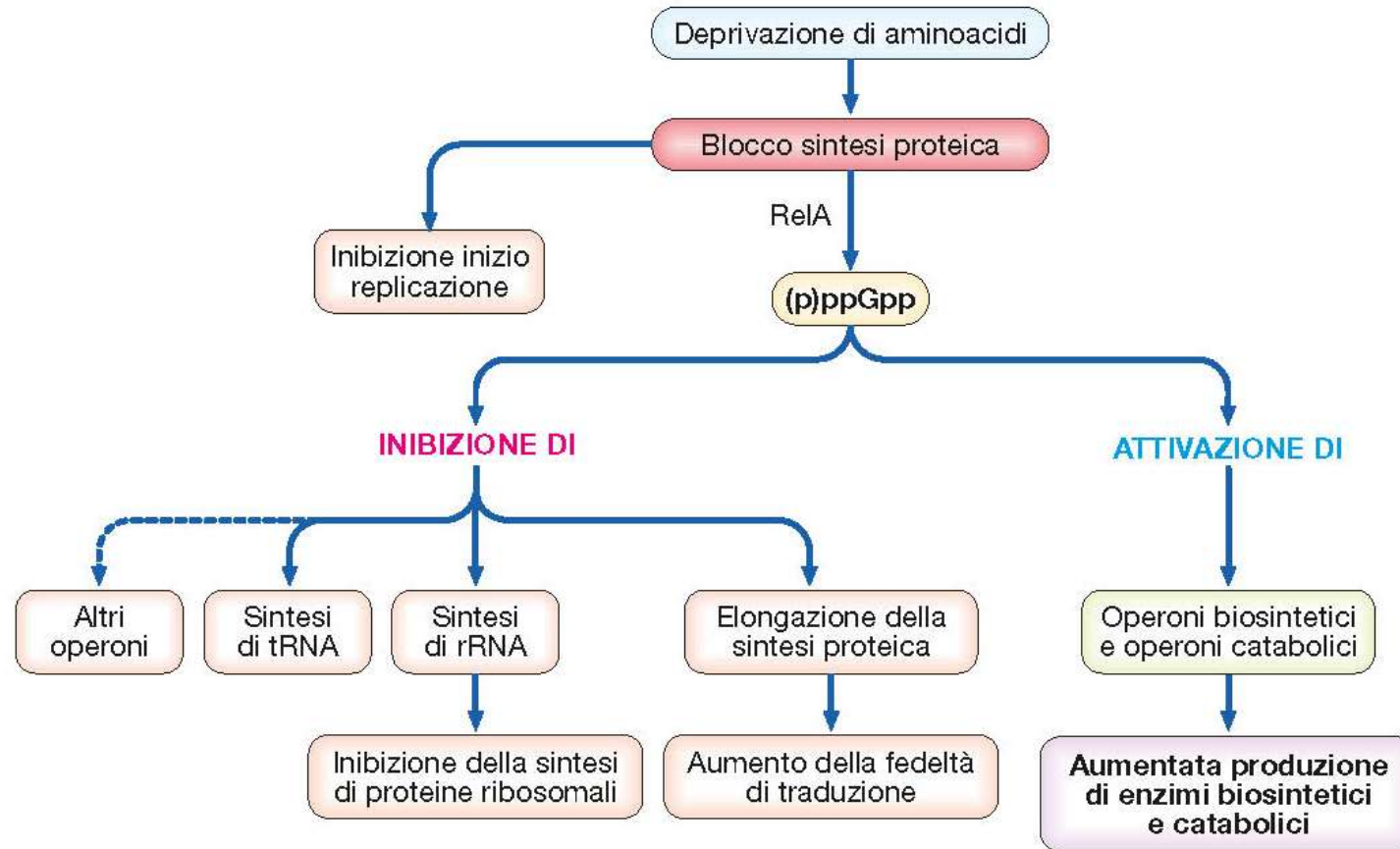


Figure 28-24  
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

La carenza di AA comporta un accumulo di tRNA non caricati che si legano con debole affinità al sito A bloccandone l'attività.

La proteina RelA stimolata dal 3' mRNA si lega al ribosoma determinando la sintesi di ppGpp

Mutazioni in *relA* hanno diversi fenotipi , in alcuni batteri come *M.tuberculosis* , i ceppi dimostrano ridotta virulenza.





## 2. RpoS un fattore sigma alternativo

In molti batteri la risposta a condizioni avverse nota come General Stress Response o GSR si basa sulla riprogrammazione dell'attività trascrizionale mediata dal fattore sigma RpoS.

Come abbiamo visto la GSR può essere indotta in fase stazionaria da mancanza di nutrienti, dal ppGpp, dallo stress da temperatura, formazione di biofilm, pH estremi, stress ossidativo.

Queste condizioni si ritrovano nell'ospite per molti batteri patogeni

RpoS svolge dunque un duplice ruolo

- riprogramma la trascrizione della cellula per aumentare la tolleranza allo stress
- promuove la formazione delle cellule persisters.

### 3. Il sistema SOS

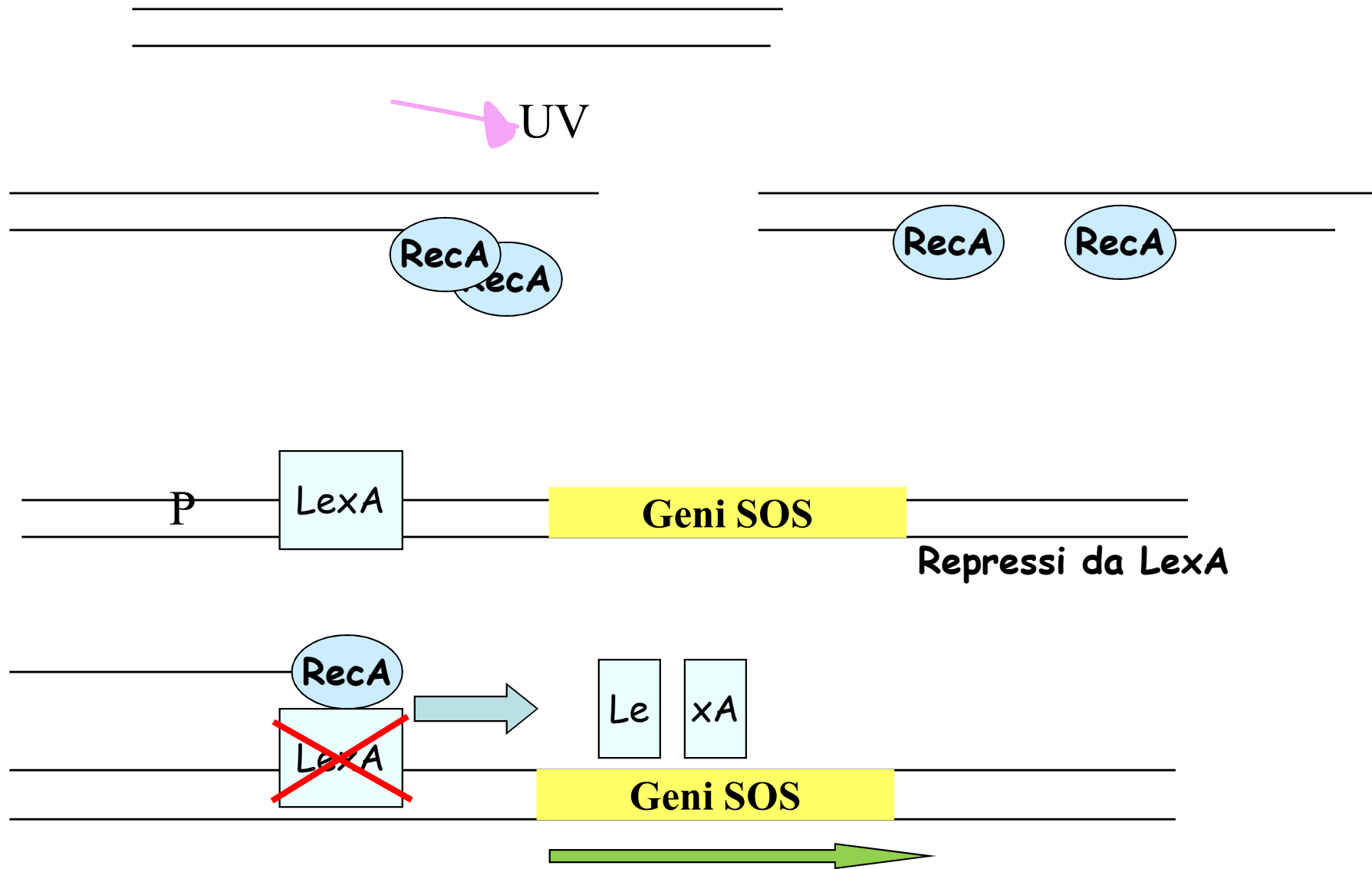
Il sistema SOS comprende molti geni che sono coinvolti nel riparo del DNA ed è indotto in risposta ai danni al DNA provocati o in maniera casuale o da varie condizioni quali stress ossidativo, pH estremi o blocco della replicazione .

Il sistema SOS è indotto dalla proteina RecA che si attiva in presenza di DNA a SS.

Vari ruolo del sistema SOS nella formazione di persisters

- Come pathway di segnalazione di stress favorisce la formazione di persisters
- fornisce diverse funzioni di riparo del DNA importanti per la “resurrezione” dei persisters
- Incrementa l'insorgenza di mutanti

# Attivazione del sistema SOS



## 4. il QUORUM SENSING

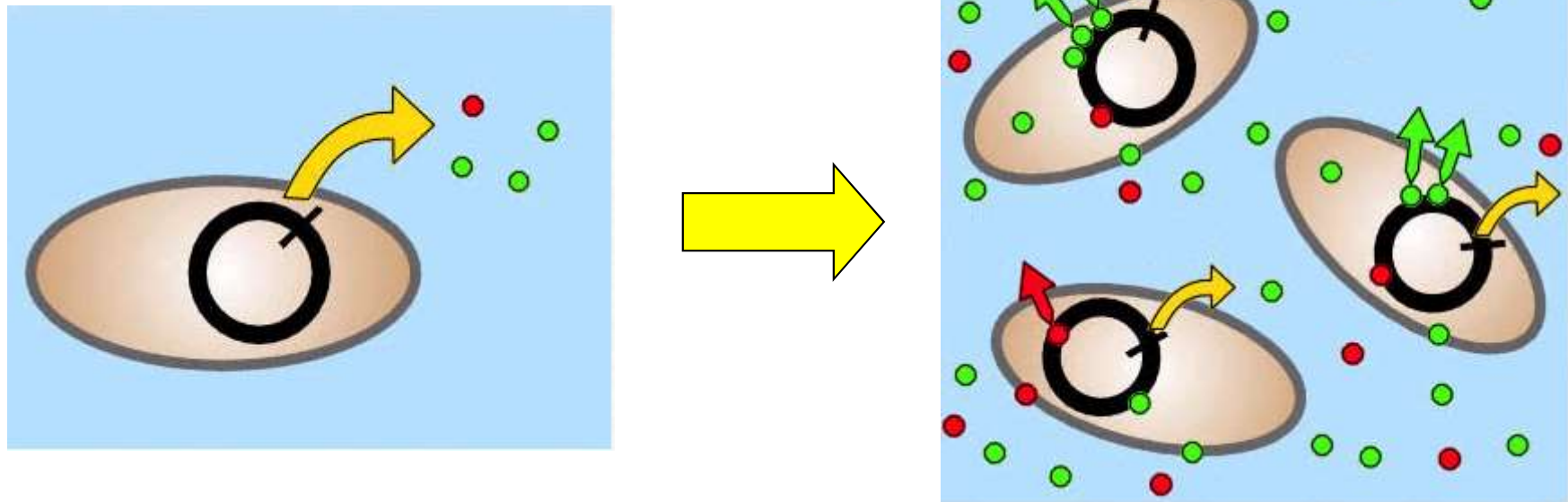
Le comunità batteriche ottimizzano la formazione di persister con l'aiuto di molecole di segnalazione intercellulare.

Per esempio molecole segnale come la piocianina o l'acil omo-serina lattone o il peptide (CSP Competence Stimulating Peptide) possono indurre la formazione di persister in *P.aeruginosa* e in *S.mutants*

# QUORUM SENSING

Nel quorum sensing la molecola segnale viene sintetizzata dal batterio stesso che dispone anche del sensore

La secrezione della molecola segnale fa sì che questa raggiunga una concentrazione funzionale solo quando la densità cellulare raggiunge elevati livelli.



## Formazione dei PERSISTERS mediata dai moduli Toxin Antitoxin (TA)

I moduli tossina antitossina sono degli elementi genetici costituiti da

la TOSSINA una proteina in grado di interferire con processi essenziali della cellula batterica

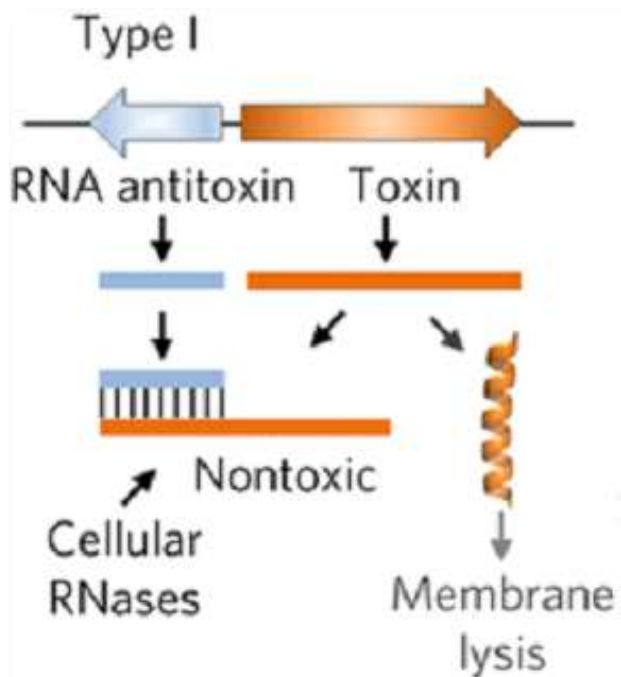
L'ANTITOSSINA che previene la sintesi della tossina o ne ostacola la funzionalità

Sulla base della natura dell' antitossina e del suo meccanismo di azione sono classificati

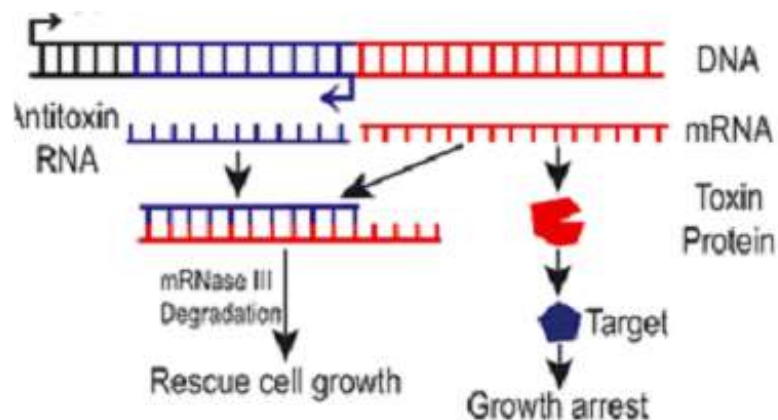
Tipo I se viene inibita la sintesi della tossina tramite sRNA

Tipo II se viene sintetizzata un antitossina di natura proteica in grado di bloccare direttamente la tossina

## Meccanismo d'azione delle Tossine di Tipo I

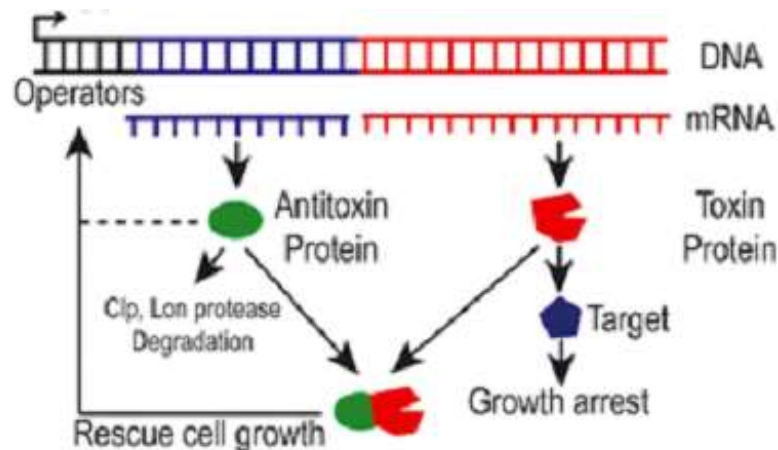
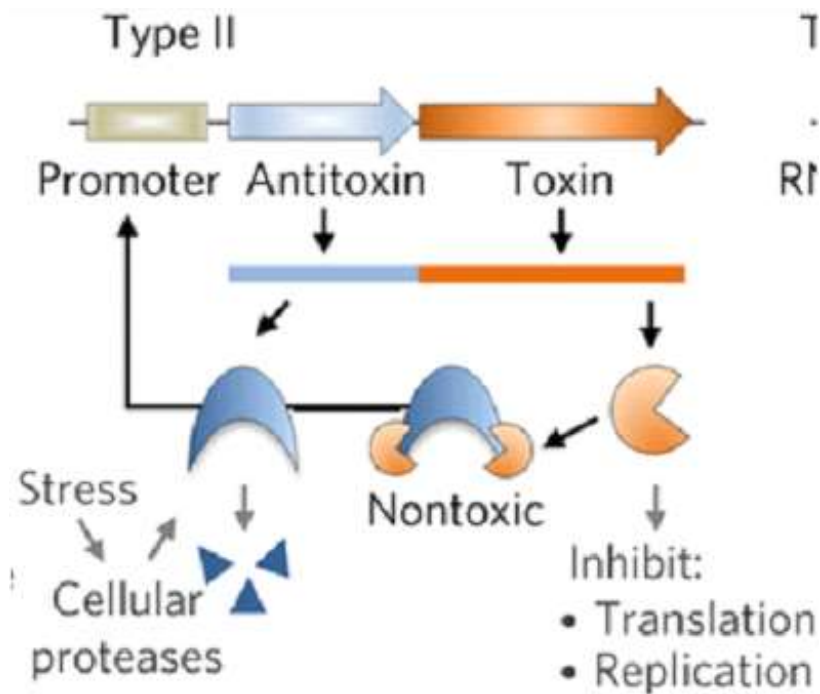


Tossine di tipo I sono generalmente piccole proteine che formano pori nella membrana citoplasmatica facendo collassare la forza proton motrice e la produzione di ATP



L'antitossina è costituita da un RNA antisense che legandosi al mRNA della tossina ne facilita la degradazione da parte delle RNase

## Meccanismo d'azione della tossina di Tipo II



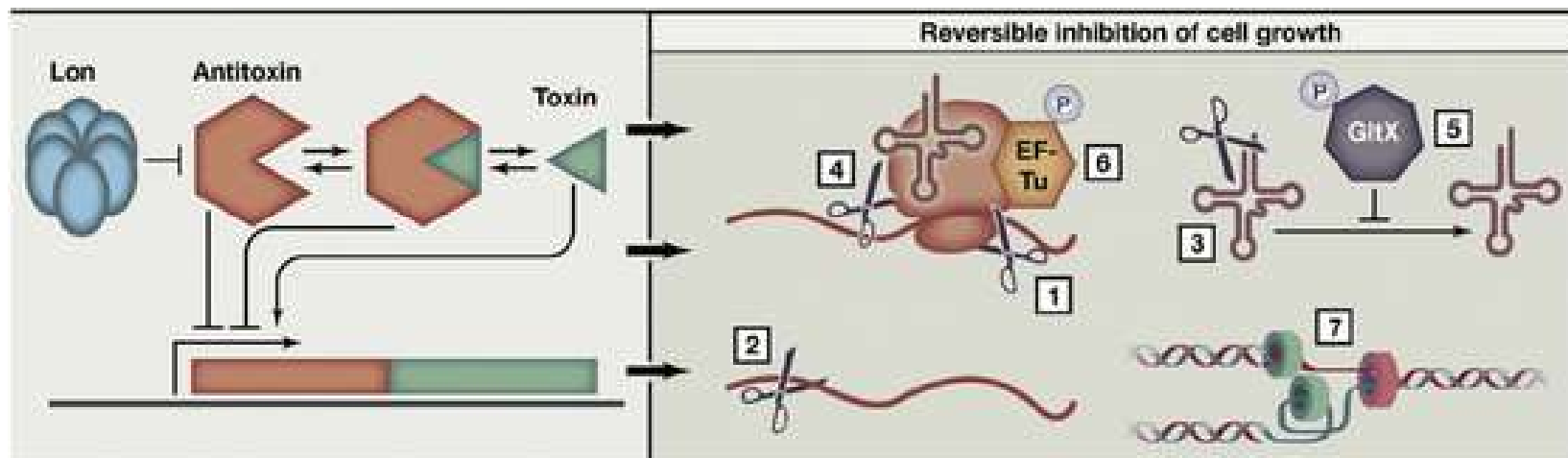
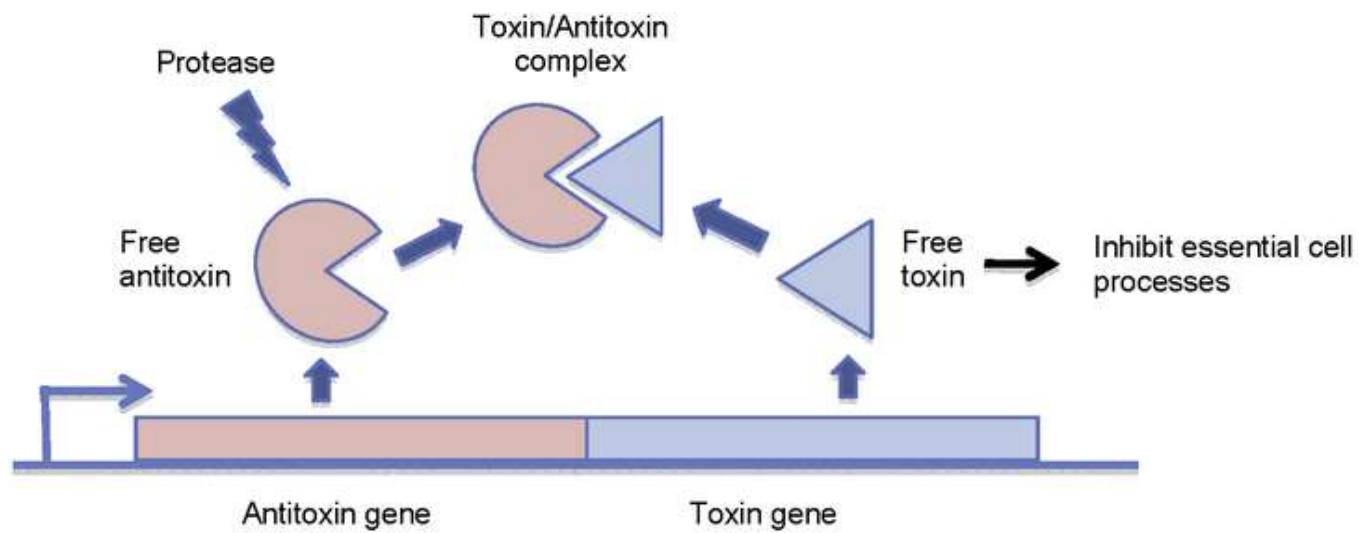
Le tossine di tipo II possono avere diverse funzioni ma nella gran parte dei casi inibiscono la traduzione.

Per inibire la traduzione possono:

- agire come mRNA endonucleasi ribosoma dipendenti ( tipo RelE) o indipendenti (tipo MazF,)
- tagliare le molecole di rRNA o di tRNA (tipo VapC)
- inattivare i fattori di elongazione (tipo Doc) , tRNA sintetasi ( tipo HipA) o gli stessi tRNA ( tipo TacT) con modificazioni post traduzionali.

In questo caso l'antitossina è una proteina che forma un complesso con la tossina inattivandola. Le proteasi Lon, Clp degradano l'antitossina che è più instabile.







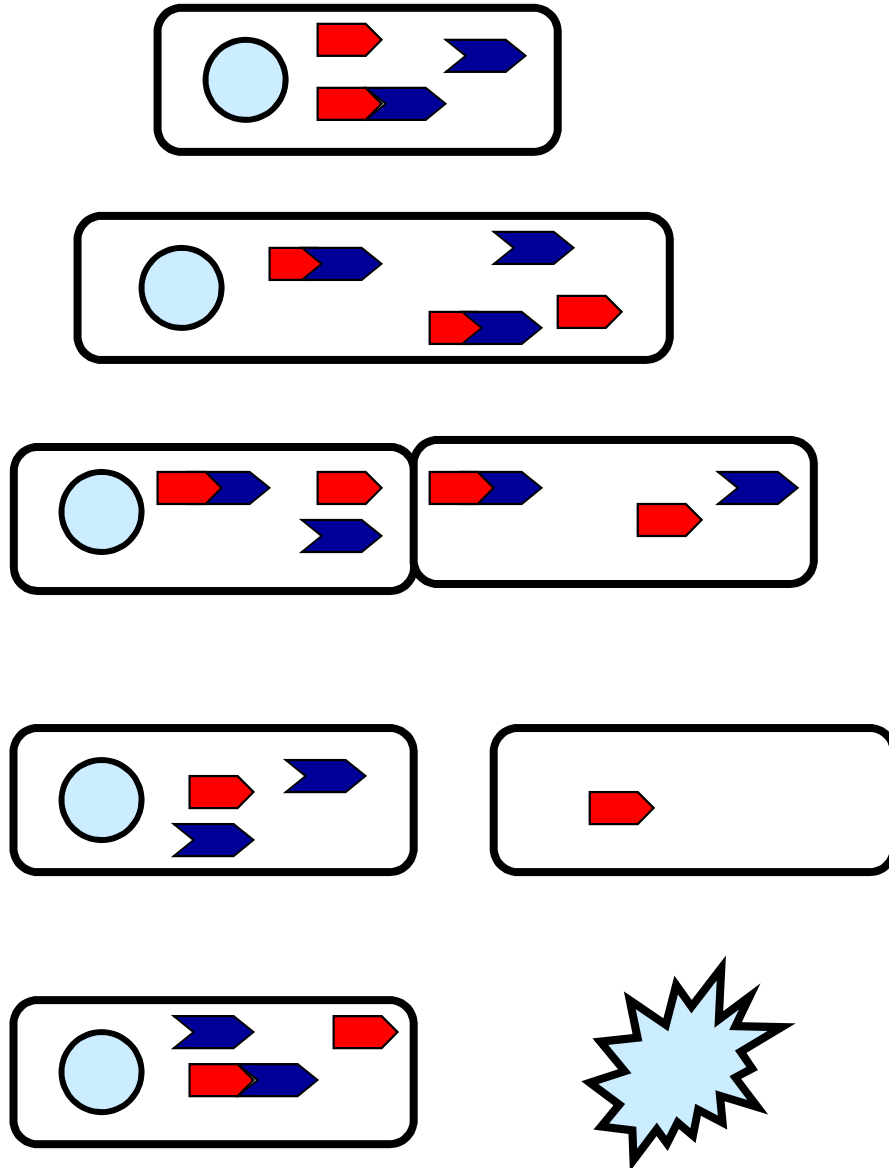
Come fanno i plasmidi a basso numero di copie ad assicurarsi di essere trasmessi stabilmente alle cellule figlie?

Alcuni plasmidi sintetizzano due proteine ParA e ParB che si legano ad un sito specifico sul plasmide parS mantenendo i plasmidi nel centro delle cellule in divisione (vicino al setto) fintanto che il processo di divisione non si sia concluso.

Un'altra strategia risiede nella capacità di alcuni plasmidi di produrre delle sostanze tossiche che uccidono le cellule che non hanno ereditato il plasmide. Nel caso di F il sistema **ccdAB** sintetizza una tossina che agisce come inibitore della topoisomerasi

 Tossina stabile  
 Antitossina labile

## I sistemi TA di tipo II



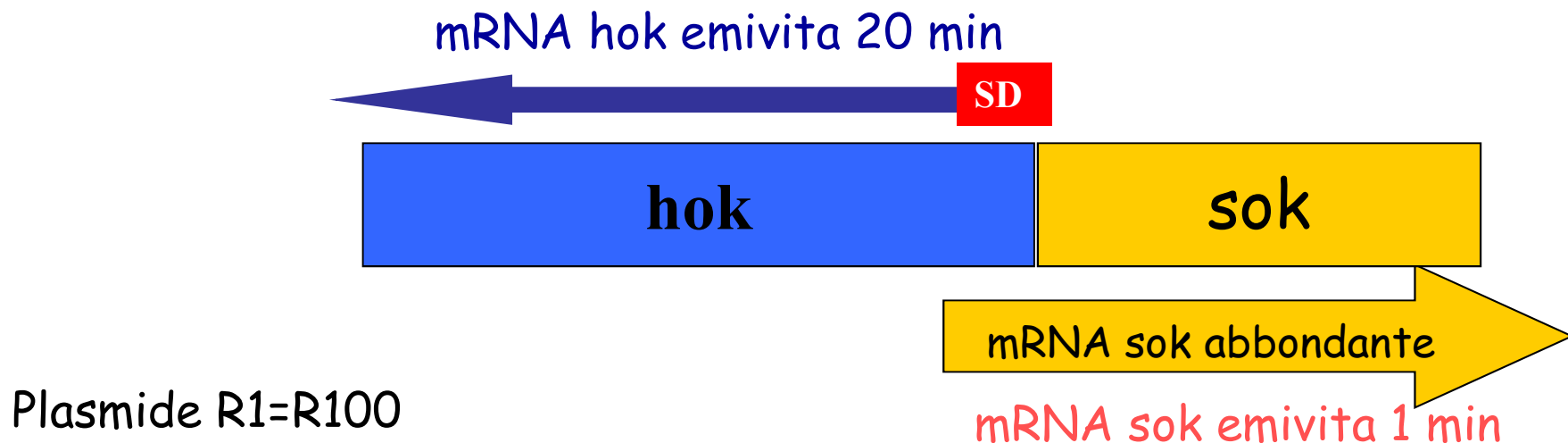
Il plasmide F sintetizza un sistema basato su tossina-antitossina in grado di eliminare le cellule che, in seguito ad un errore nella divisione cellulare non hanno ricevuto almeno una copia del plasmide F. La proteina CcdB è una tossina stabile (con bersaglio la DNA girasi) la cui funzione viene bloccata dal legame con un antitossina CcdA più facilmente degradabile. Se il plasmide è presente la continua sintesi di CcdA inibisce CcdB. Se non vi è plasmide invece CcdA verrà degradata + velocemente di CcdB che rimarrà quindi libera e potrà inibire la girasi provocando la morte delle cellule.

Ccd= control of cell death

## Sistema hok -sok (TA di tipo I)

Il plasmide R1(o R100) porta un gene letale *hok* ( host cell killing) che codifica per una tossina in grado di provocare depolimerizzazione delle membrana.

Sull'elica complementare del DNA di *hok* viene trascritta il mRNA del gene *sok* che ha una una regione di 128 nt complementare con la regione SD di *hok*. I 2 RNA hanno diversa emivita 20 min e 1 min. Hok non viene mai tradotto per azione del mRNA di *sok* e la cellula con R1 rimane pertanto vitale. Se una cellula non eredita R1 in seguito a divisione allora mRNA<sub>sok</sub> che ha una lunga emivita verrà tradotto perchè mRNA sok avendo un emivita più breve non sarà più presente.



## Che ruolo svolgono i moduli TA nella formazione dei persisters?

L'attivazione dei moduli TA richiede un'espressione adeguata della tossina e la distruzione dell'equilibrio tra complesso tossina-antitossina a favore della tossina.

In *E.coli* i moduli di tipo I *tisB/istR* oppure *hokB/sokB* sono attivati dalla risposta SOS e dall'allarmone (p)ppGpp.

Le antitossine di tipo II sono in genere degradate dalla proteasi Lon in risposta a (p)ppGpp o allo stress ossidativo o dalla proteasi Clp.

Una graduale attivazione dei moduli TA in modo che non venga completamente abrogata la crescita batterica permette di modificare il ritmo di crescita e modificare la fisiologia per aumentare la tolleranza allo stress.

L'attivazione dei moduli TA determina la TRANSIZIONE verso la DORMIENZA una volta che i livelli di tossina libera hanno superato una certa soglia .

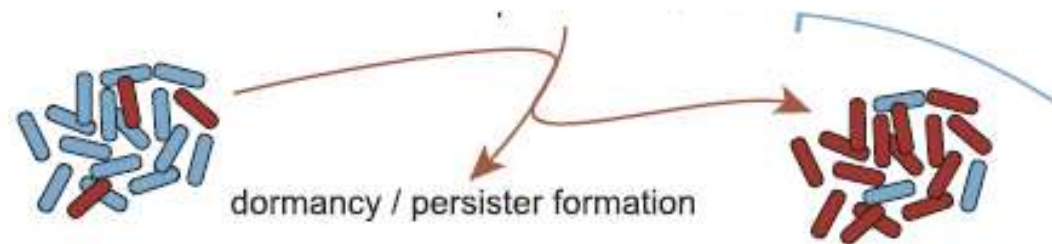
Se avviene un 'incremento dell'espressione delle tossine sia di Tipo I che II spesso si ha inibizione della crescita con aumento della tolleranza agli antibiotici.

Nei trascrittomi di persisters si osserva un incremento dell'espressione dei TA.

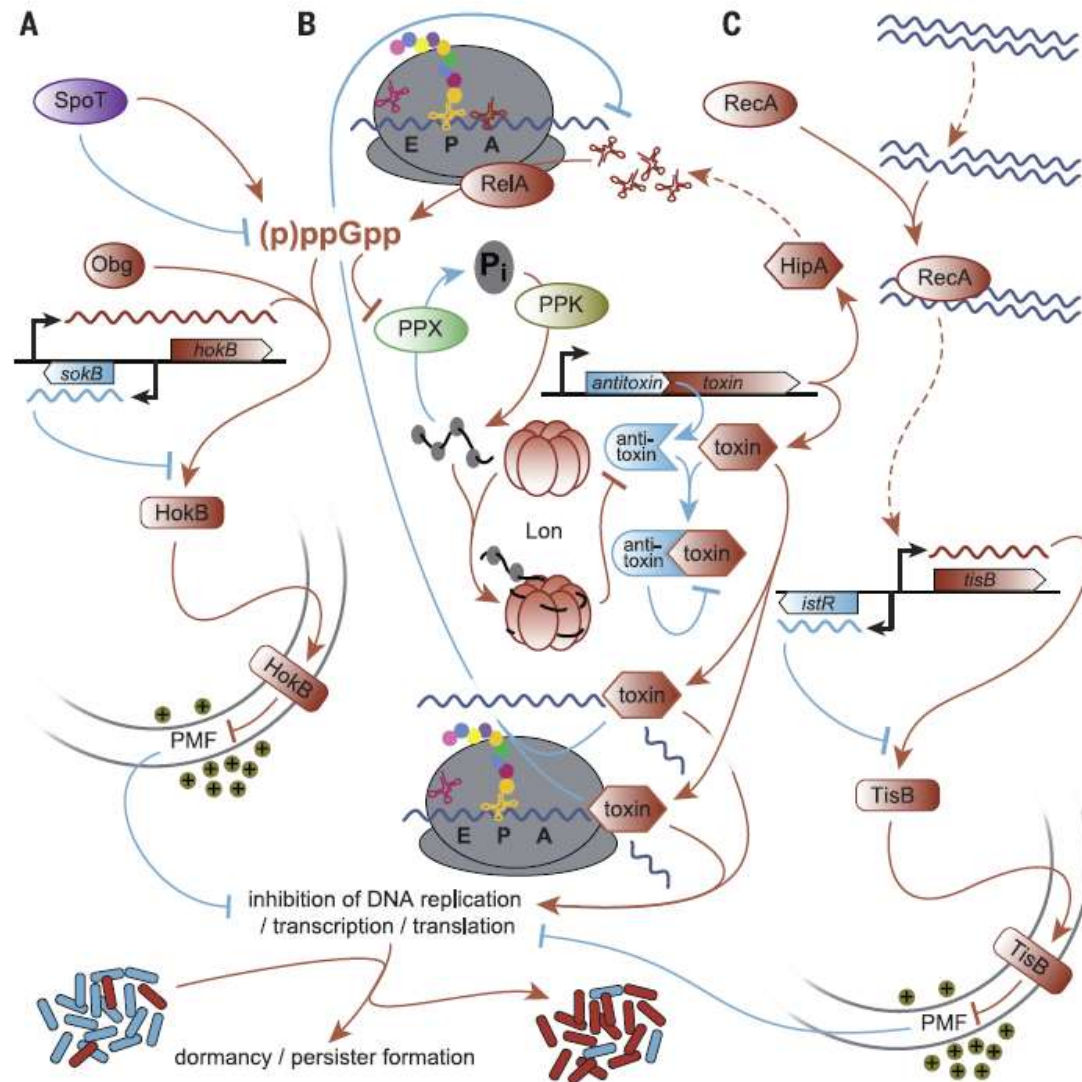
Ma che succede se si effettua una delezione dei moduli TA ?

I moduli sono ridondanti ( p.e. in E.coli 30 moduli divisi equamente tra tipo I e di tipo II e alcuni di altri tipi minoritari) e quindi solo una delezione di almeno 5 moduli ha un effetto sull'incremento formazione di persisters.

L'accumulo di moduli TA particolarmente in microorganismi che hanno un adattamento dinamico all'ambiente incluse le infezioni croniche o acute può favorire l'eterogenità dei meccanismi nella formazione di persisters.



## Ruolo cruciale del (p)ppGpp nella formazione di persisters.

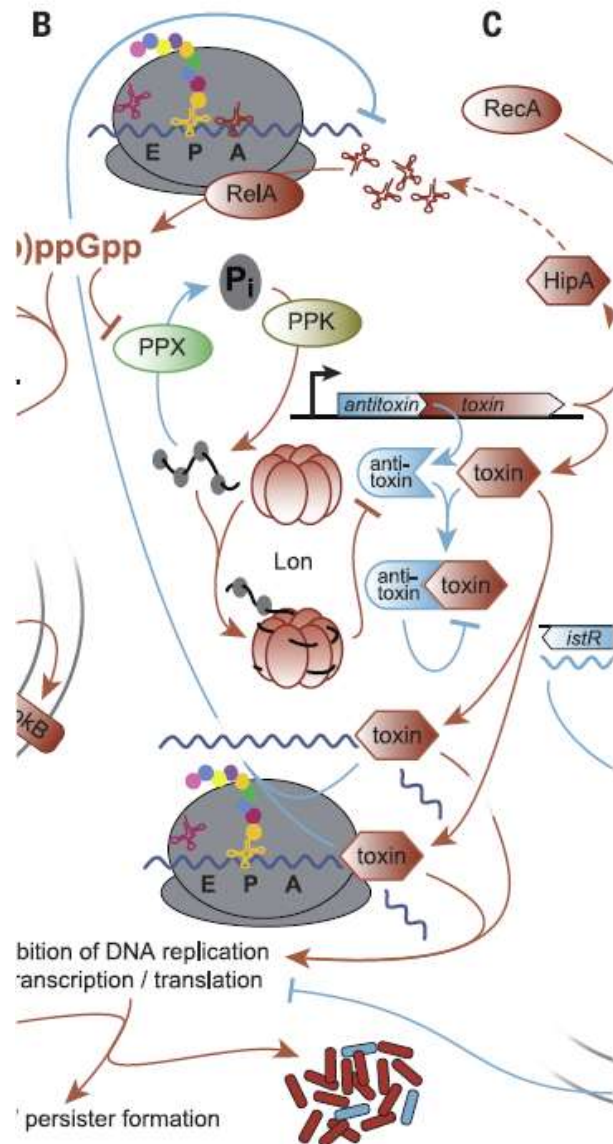


I tre principali meccanismi che vedono coinvolti i moduli TA nella formazione dei persisters prevedono nei primi due casi A e B un ruolo cruciale dei ppGpp mentre nel terzo di RecA.

Promozione dei persisters in rosso  
Ostacola la formazione in blu

Vediamo il pathway polifosfati/Lon/mRNA interferenza.

Una serie di mRNA endonucleasi (tossine tipo I) e tossine di tipo II sono sotto il controllo del ppGpp, del livello di polifosfati e della proteasi Lon.



In alcune cellule si accumula ppGpp, questo provoca un'inibizione competitiva sulla polifosfato idrolasi PPX causando un accumulo di polifosfati, prodotti dalla polifosfato chinasi PPK, che a sua volta stimolano la proteasi Lon a degradare l'antitossina di tipo II.

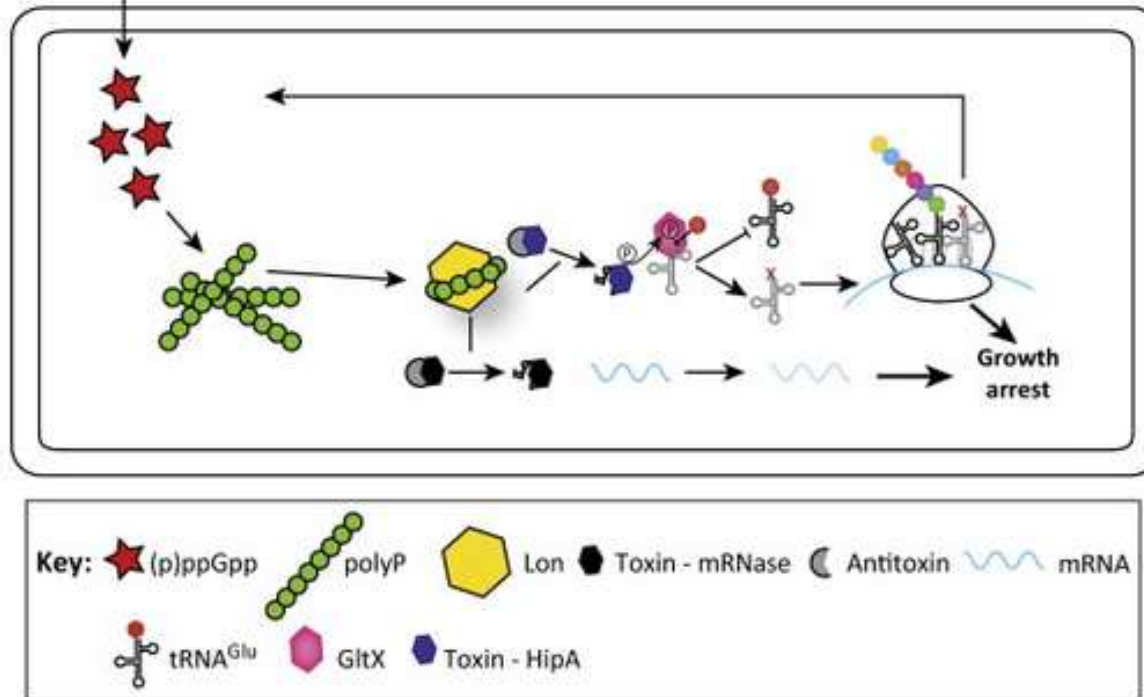
Nel caso del modulo HipAB, la degradazione dell'antitossina HipB libera la tossina HipA la quale inattiva l'aminoacil-tRNA sintetasi GtlX fosforilandola sul sito attivo. Questo provoca la presenza di tRNA non carichi sui ribosomi situazione che stimola la sintesi di ppGpp da parte di RelA causando l'attivazione di altre endonucleasi di moduli TA.

Il modulo HipAB ha un ruolo di **master TA** modulo e si ritrova ad alta frequenza nei persister e attivato.

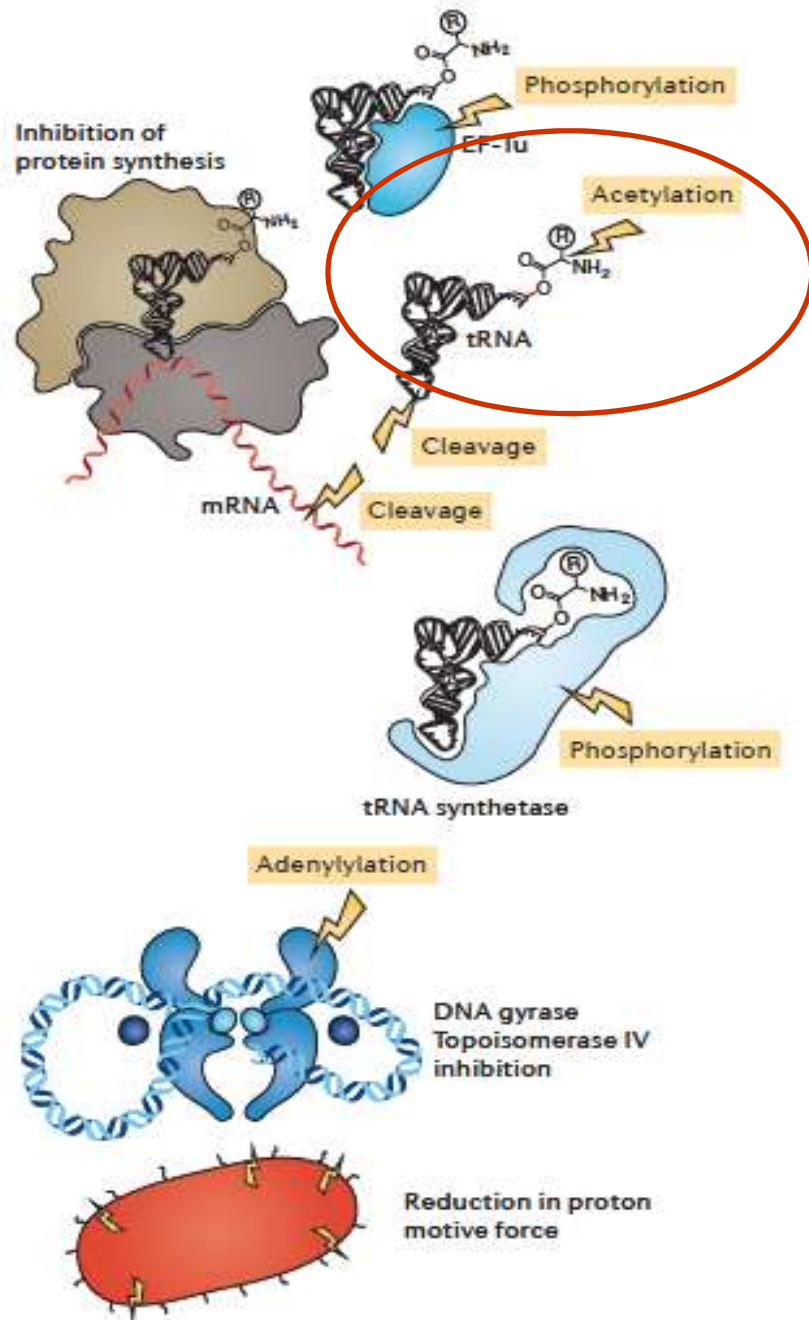


Starvation o altri stimoli

## Pathway polifosfati/Lon / interferenza con mRNA



Il legame dei polifosfati a Lon la indirizzano a degradare l'antitossina  
Si libera la tossina che va a fosforilare l'aminoacil-tRNA- sintetasi GltX  
provocando l'accumulo di tRNA privi di aminoacido che bloccano la  
traduzione



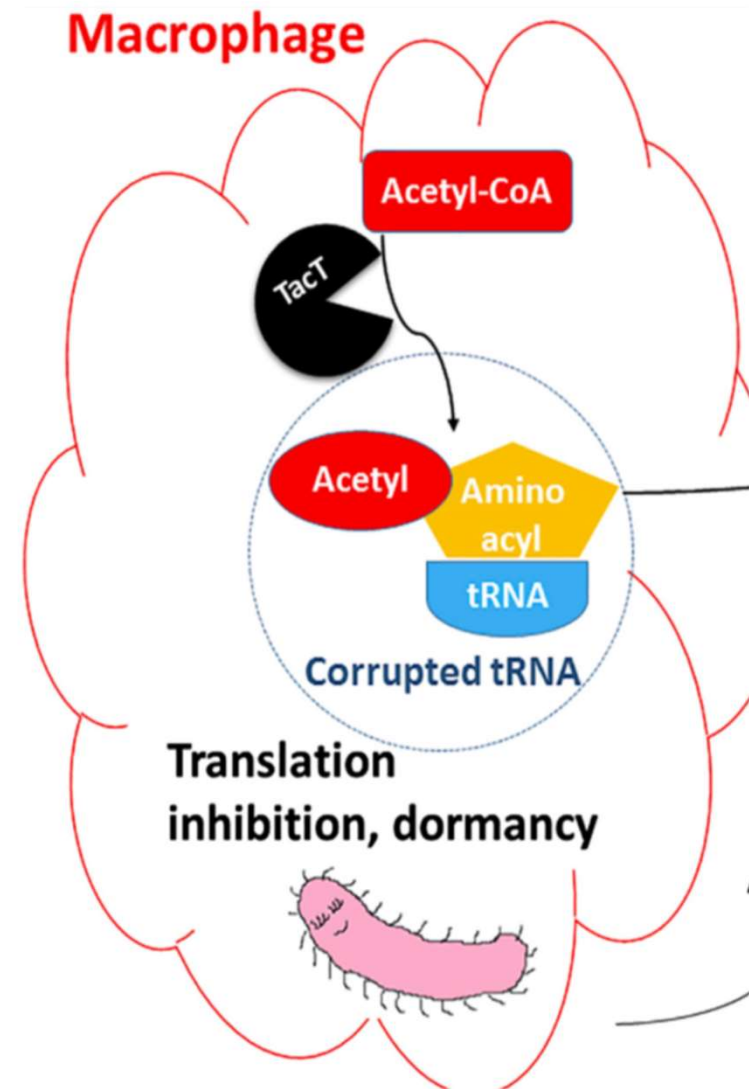
Schematic depicting the various mechanisms known to be involved in persister formation. Toxin-antitoxin(TA)-mediated mechanisms of persister formation include the inhibition of protein synthesis, DNA metabolism and *proton motive force*. Protein synthesis is inhibited by various toxins through the phosphorylation of EF-Tu by Doc<sup>94</sup> (pink), the acetylation of aminoacylated tRNA by TacT<sup>98</sup> (light blue), the phosphorylation of GltX by HipA<sup>86</sup> (dark blue), and the cleavage of mRNA by RelE<sup>89</sup> for example (purple) or tRNA by VapC<sup>92</sup> (orange). DNA gyrase and TopoIV activity is inhibited by Fic<sup>97</sup> and pore-forming toxins such as TisB are able to reduce the *proton motive force* of the bacterial cell<sup>134</sup>. Non-TA-mediated mechanisms include a decreased metabolism (red), increased efflux pumps<sup>108</sup> and possibly ATP depletion<sup>111</sup>. FIGURE

## I moduli TA in *Salmonella typhimurium*. : meccanismo d'azione delle Gnc5 N acetiltrasferasi

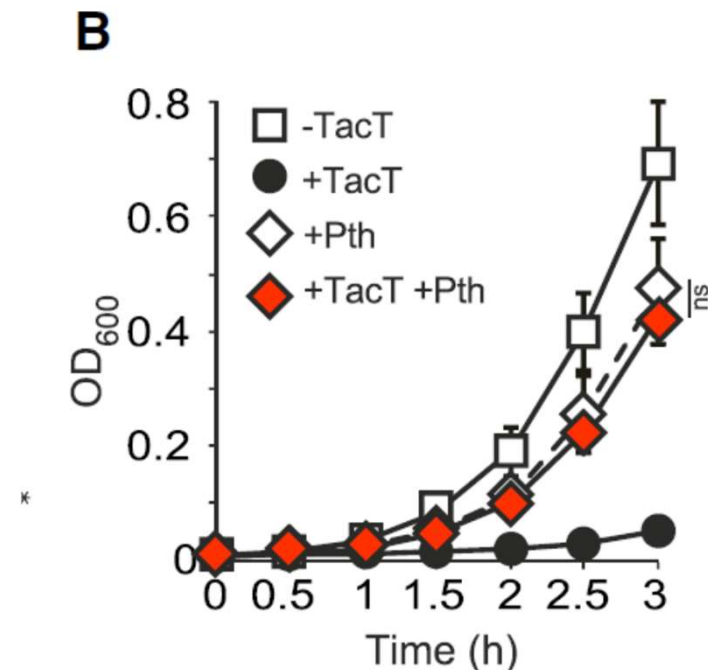
L'analisi bioinformatica ha messo in evidenza nel genoma di *Salmonella typhi* la presenza di 14 moduli TA di classe II.

11 moduli appartengono a famiglie di TA già conosciute e caratterizzate mentre 3 moduli appartengono ad una famiglia non ancora pienamente caratterizzata la cui tossina condivide omologia con la Gcn5 N-acetyltransferases (GNATs). La famiglia degli enzimi GNAT catalizza il trasferimento di un Gruppo acetile dal acetyl CoA (AcCoA) ad un' ampia gamma di substrati.

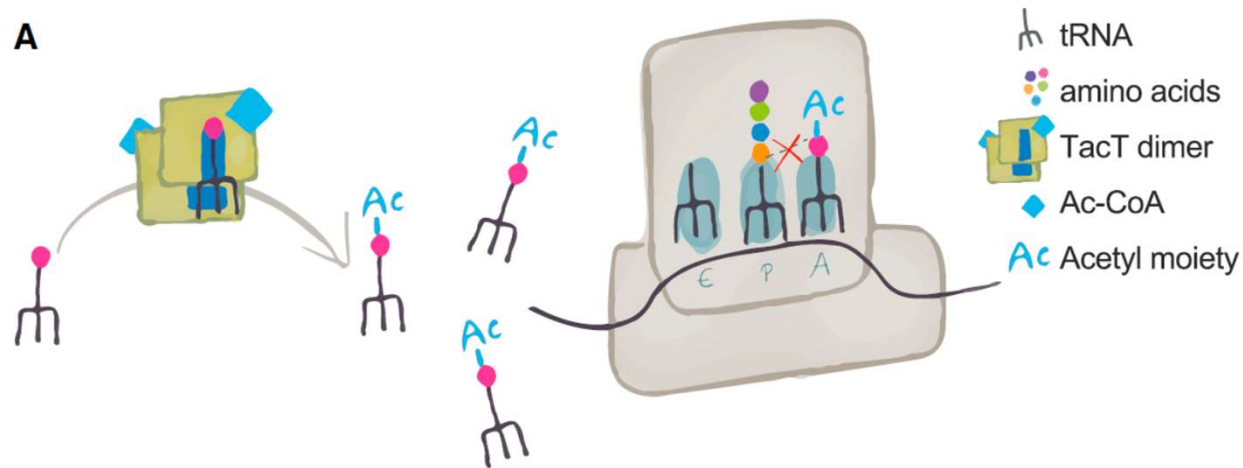
L'analisi di una di queste 3 tossine T8 ha messo in evidenza come questa tossina sia in grado di controllare l'entrata delle cellule di *Salmonella* nello stato di persistere tramite acetilazione dell'aminoacyl tRNA bloccando la traduzione. In base alla sua funzione è stata rinominata TacT (tRNA (tRNA-acetylating toxin)).



Se il blocco della crescita è determinato da un'acetilazione del tRNA può una deacetilasi far uscire le cellule dallo stato di latenza e ripartire? La perdita della deacetilasi CotB prolunga l'azione di TacT ma una sua iperespressione non elimina la latenza delle cellule. Effettuato uno screening con una library di plasmidi in grado di iperesprimere geni batterici osservando il recupero di crescita delle cellule TacT bloccate (la presenza di TacT rallenta la formazione di colonie). Con questo screening si è osservato che un plasmide contenente il gene pth Peptidyl-tRNA hydrolase (Pth) era in grado di far ripartire la crescita.



## Modello d'azione di TacT



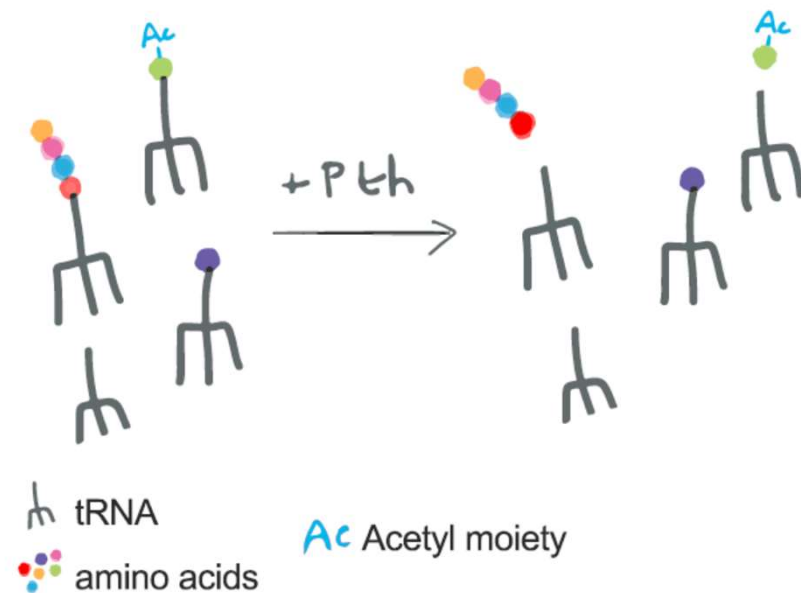
Proposed model of action of TacT. TacT inhibits translation by acetylation of the primary amine group of amino acids charged onto tRNA molecules. The negatively charged tRNA molecule binds to TacT through its positive surface residues such that the primary amine group of the amino acid carried by the tRNA sits in the active site of the acetylase. Upon acetylation, the alpha amine group engaged with the acetyl moiety is blocked and cannot react for peptide bond formation with the carboxyl group of the amino acid loaded on the tRNA in the ribosomal P site.

**TacT inibisce la traduzione tramite l'acetilazione del gruppo aminico dell' aminoacido caricato sul tRNA .**

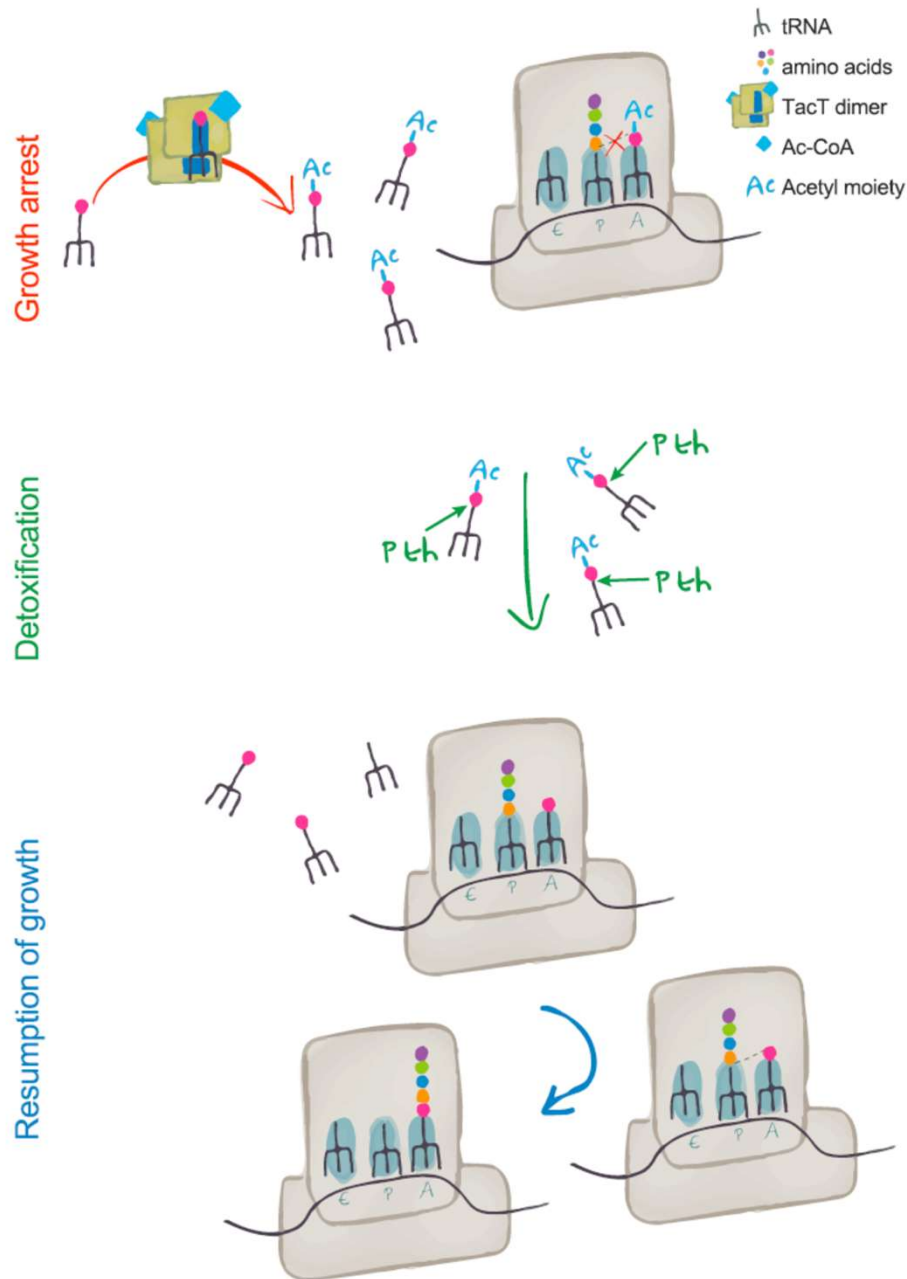
**Dopo l'acetilazione il gruppo aminico acetilato è bloccato e non può formare il legame peptidico con il gruppo carbossi-terminale dell'aminoacido presente sul tRNA nel sito P del ribosoma.**

Pth è un esterase essenziale che ricicla le molecole di peptidyl-tRNA rilasciate durante la premature terminazione della traduzione. Vi possono essere vari fattori che portano ad un blocco della traduzione e le molecole di peptidyl tRNA potrebbero avere un effetto tossico sulla cellula.

In questi casi Pth idrolizza il legame estere tra l'estremità carbossi terminale del peptide e l'estremità 3-OH del tRNA prevenendo un eventuale carenza di tRNA e di aminoacidici che potrebbero determinare un blocco della traduzione e della crescita



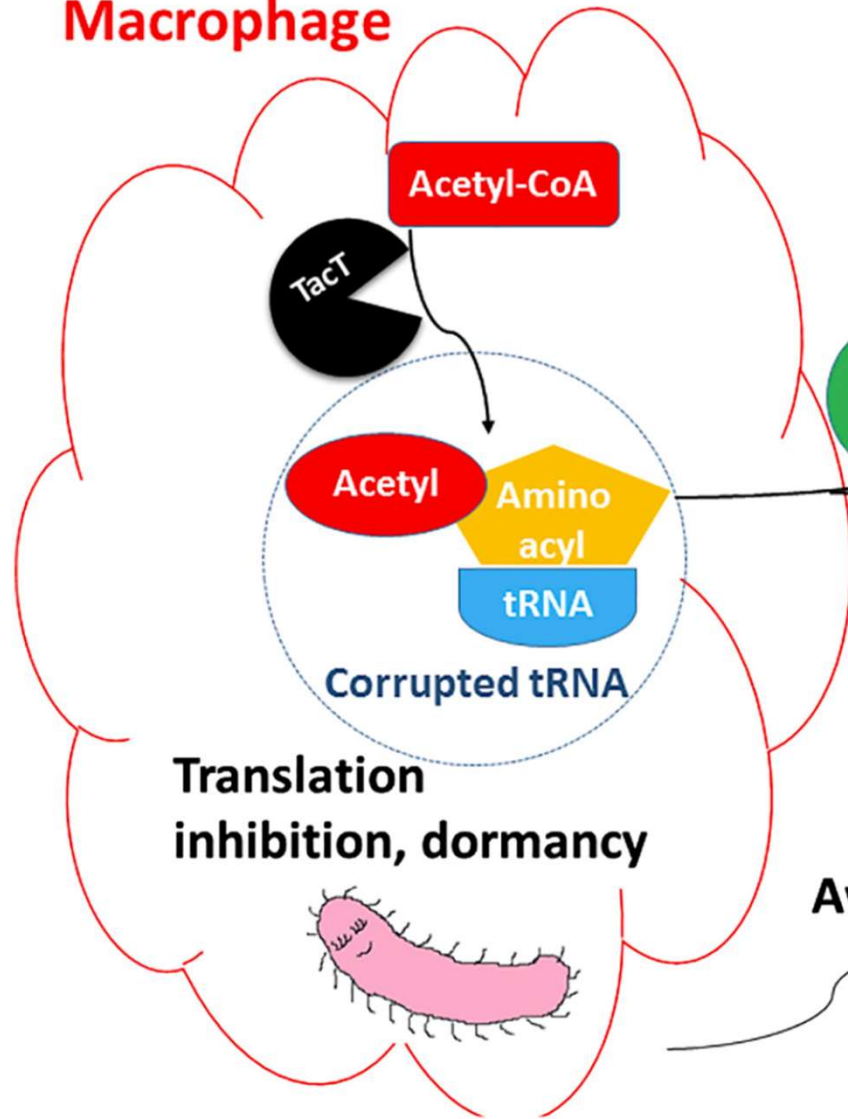
## Model of TacT-Dependent Persister Formation and Resumption of Growth



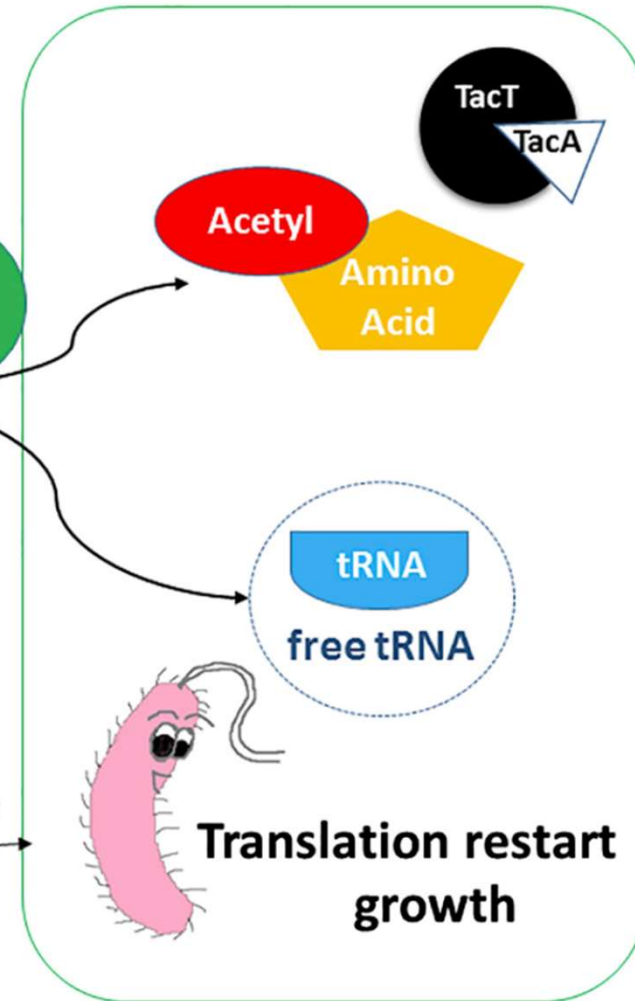
TacT, an acetyltransferase, inhibits translation by modification of the primary amine group of amino acids charged onto tRNA molecules. Upon acetylation (red arrow), the alpha amine group is blocked and cannot form a peptide bond with the nascent peptide, and bacteria stop growing.

TacT activity on translation is counteracted by the action of Pth, which detoxifies the corrupted tRNAs (green arrow). When the effect of Pth is greater than that of TacT and detoxification is complete, translation resumes (blue arrow) and persisters regrow.

## Macrophage



## Resuscitation

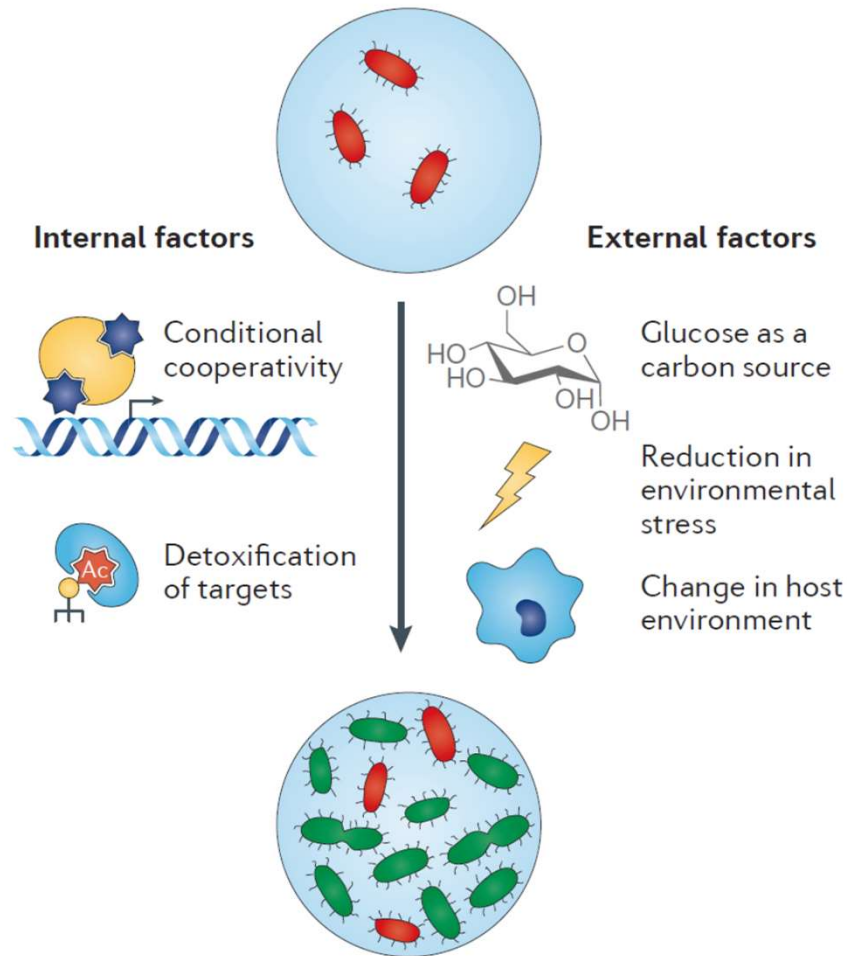


Awake

Translation restart  
growth



## Come può ripartire la crescita dei persisters?

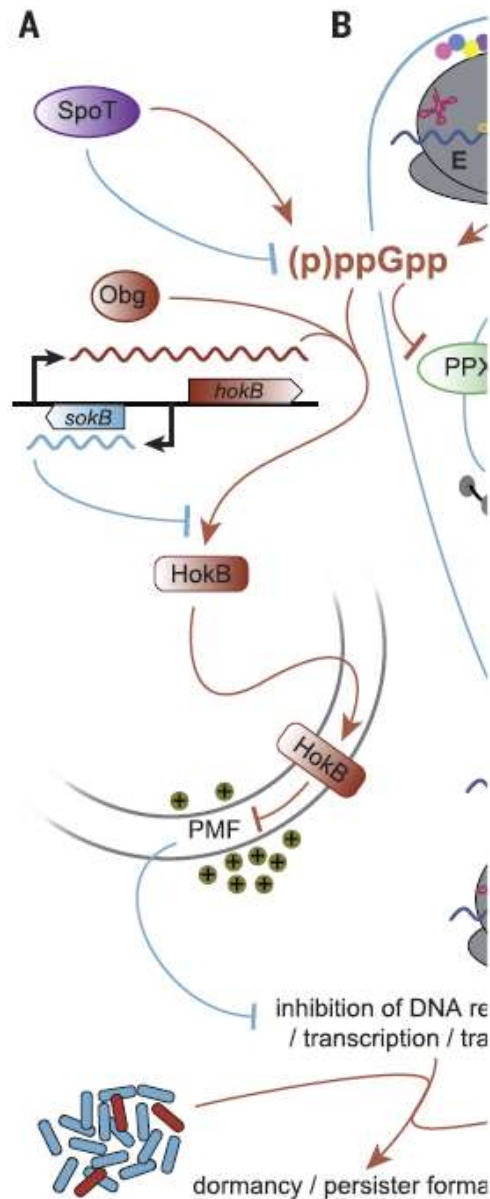


Possiamo distinguere fattori interni e fattori esterni che facilitano la ricrescita dei persisters.

I fattori interni includono:  
la repressione dei moduli tossina-antitossina abbassando p.e. il rapporto tossina /antitossina.  
Modificazioni post traduzionali causate dalla tossina devono essere rimosse da fattori cellulari, p.e. TacT and Pth<sub>99</sub>.

I fattori esterni includono :  
aggiunta di fattori nutritivi che prima potevano essere limitanti, o  
la riduzione o rimozione di stress ambientali con effetto limitante sulla crescita.

Modificazioni nella cellula ospite



## Pathway Obg/Hok sotto controllo di ppGpp

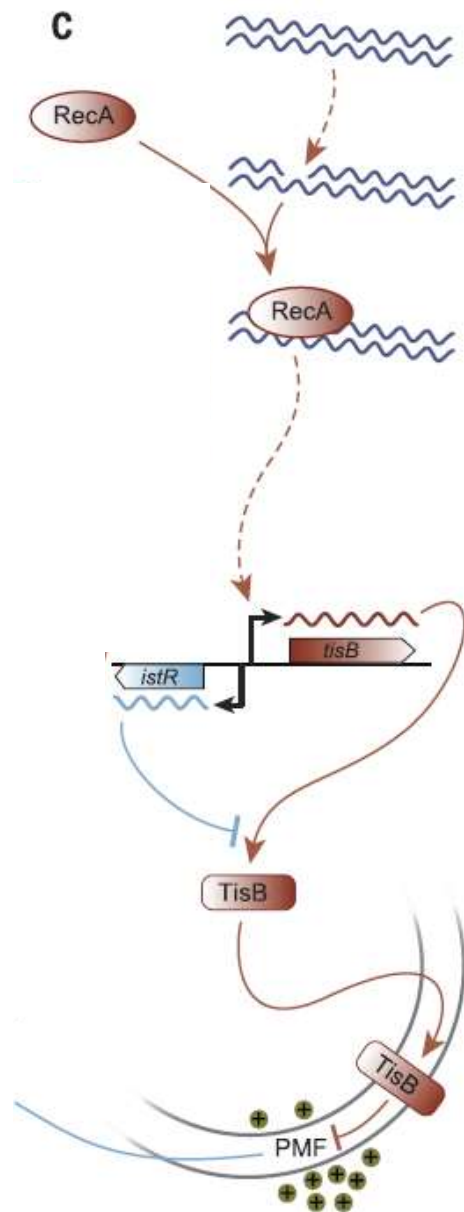
Obg è una guanosin trifosfatasi (GTPase) coinvolta nell'adattare il funzionamento dei ribosomi, la replicazione e la risposta allo stress allo stato energetico della cellula.

Il livello di Obg è correlato all'insorgenza dei persisters

Come avviene ?

In presenza di ppGpp il livello di Obg è in grado di up-regolare l'espressione di *hokB* che codifica per una tossina in grado di alterare la forza proton motrice della membrana distruggendo la sintesi di ATP.

Un aumento delle tossine di tipo I favorisce entro certi livelli la formazione di persister.



## Pathway attivato dal sistema SOS

La risposta SOS è in grado di attivare dei moduli TA sia tipo I che II.

In genere la risposta SOS si è visto che è necessaria per stimolare la sopravvivenza al fluorochinoloni

Caso sistema di tipo I *tisB/istR*.

La tossina TisB è una piccola proteina che forma pori nella membrana alternandone il potenziale e la sintesi di ATP. L'over espressione di TisB dovuta all'attivazione del sistema SOS facilita la formazione di persister tolleranti ad alte dosi di fluorochinoloni (acido nalidixico).